

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE SORONEUTRALIZAÇÃO E IMUNODIFUSÃO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY EM SUÍNOS¹

CARLOS H. ROMERO², CHERYL ANN ROWE², ROBIS S. FLORES³, LIANA BRENTANO³ e JOSÉ LUIZ MARQUES⁴

ABSTRACT.- Romero C.H., Rowe C.A., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1985. [Comparison between the serum neutralization and the immunodiffusion tests for the detection of antibodies for Aujeszky's disease virus in swine.] Comparação entre os testes de soroneutralização e imunodifusão na detecção de anticorpos para o vírus da doença de Aujeszky em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 5(3): 39-44. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves, Embrapa, Cx. Postal D-3, Concórdia, SC 89700, Brazil.

A comparison was made between the plate immunodiffusion (ID) test and the micro-serum neutralization (SN) test in the detection of antibodies for Aujeszky's disease virus (ADV) in pig sera, using a total of 813 sera derived from five infected herds. The plate ID test was as sensitive and specific as the micro SN test in detecting positive sera that possessed neutralizing activity only when tested undiluted. Sera with this titer generally reacted by bending the precipitation line formed between the antigen and the reference serum. Sera with SN titers equal to or greater than eight, usually gave two lines of precipitation. The plate ID test was equally efficient and specific in detecting antibodies resulting from a natural infection or from vaccination with an inactivated oil-emulsion vaccine, as well as maternally-derived antibodies in the sera of piglets from vaccinated sows. Of 813 sera assayed in the micro SN test, 295 (36.3%) contained ADV antibody, 382 (47%) were negative and 136 (16.7%) were toxic. The same sera assayed in the plate ID test showed 347 (42.7%) positive for precipitating antibodies and 466 (57.3%) negative. The major limitation of the SN test was the excessive percentage of sera (16.7%) that were toxic for the indicator cells (chicken embryo fibroblasts), due mainly to bacterial contamination and/or hemolysis as a result bad handling and storage of samples before arriving to the laboratory. The disagreement between the number of positive sera detected by the two tests in favor of the plate ID test, was due to the fact that 52 sera that were positive by this test were toxic when assayed by SN.

Under the experimental conditions, the plate ID test was both sensitive and specific for the detection of antibodies for ADV, and as well as being economic, simple and rapid to perform, there is the advantage that it can be used to test moderately contaminated and/or hemolysed sera that are toxic for the indicator cells in the SN test.

INDEX TERMS: Serum neutralization, immunodiffusion, diagnosis, Aujeszky, swine.

SINOPSE.- A comparação do teste de imunodifusão (ID) em placa e o microteste de soroneutralização (SN), na detecção de anticorpos para o vírus da doença de Aujeszky (VDA) em soros suínos, foi realizada em 813 soros oriundos de cinco plantéis infectados com o VDA. O teste de ID em placa foi altamente sensível e específico, detectando como positivos soros que, no micro-teste de soroneutralização, apenas reagiam quando eram testados sem diluir. Os soros com este título reagem, geralmente, dobrando a linha de precipitação formada entre o antígeno e o soro de referência. Soros com títulos SN de oito

ou superiores apresentavam freqüentemente duas linhas de precipitação. O teste de ID foi igualmente eficiente e específico na detecção de anticorpos da infecção natural, da vacinação com vacina inativada oleosa, bem como de anticorpos transferidos da porca para os leitões via colostro. De 813 soros submetidos ao teste de SN, 295 (36,3%) revelaram anticorpos, 382 (47%) eram negativos e 136 (16,7%) eram tóxicos. Os mesmos soros submetidos ao teste de ID, revelaram 347 (42,7%) positivos para anticorpos precipitantes enquanto que, 466 (57,3%) eram negativos. A maior limitação do teste de SN foi a excessiva percentagem de soros tóxicos (16,7%) para as células indicadoras (fibroblastos de embrião de galinha), principalmente, devido a contaminação bacteriana e/ou hemólise causada por deficiente dessoragem e estocagem antes de serem enviados ao laboratório. A discordância entre o número de soros detectados como positivos para anticorpos em favor do teste de ID, foi devido ao fato de que 52 soros positivos por este teste foram tóxicos

¹ Aceito para publicação em 3 de fevereiro de 1986.

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

³ Bolsista da Embrapa-CNPSA.

⁴ Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), Concórdia, SC 89700.

no teste de SN. Nas atuais condições, o teste de ID foi sensível e específico na detecção de anticorpos para o VDA e tem a vantagem de ser econômico, simples e rápido de realizar, além de poder testar soros moderadamente contaminados e/ou hemolisados que são tóxicos para as culturas celulares utilizadas no teste de SN.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Soroneutralização, imunodifusão, diagnóstico, Aujeszky, suínos.

INTRODUÇÃO

A doença de Aujeszky (DA) ou pseudorraiva, tem adquirido, recentemente, maior importância econômica, especialmente em países com indústria suína intensiva e moderna (Akkermans et al. 1975, Leunen et al. 1975, Solorzano & Thawley 1979, Toma et al. 1983), devido ao incremento da incidência e da severidade da doença, não somente em leitões e em porcas gestantes, mas também em suínos de 14-18 semanas de idade (McFerran et al. 1979).

No Brasil, em áreas de exploração suínica intensiva, os transtornos causados pela infecção e pela doença parecem ser de idêntica gravidade aos relatados em outros países. Surto com alta mortalidade de leitões tem acometido diversos plantéis no Estado de Santa Catarina (Rowe & Romero 1986) e Paraná (Romero C.H., resultados não publicados).

Para a avaliação epidemiológica sobre a prevalência e distribuição da infecção pelo herpes vírus da doença de Aujeszky (VDA), utilizam-se testes sorológicos que visam a detectar anticorpos específicos para o VDA. Testes sorológicos são também utilizados em programas de erradicação, os quais tem como base a testagem, identificação e a eliminação de suínos com anticorpos (Wright et al. 1982). O teste diagnóstico ideal deve ser sensível, específico, rápido e econômico e, que possa ser realizado em laboratórios de diagnóstico não necessariamente sofisticados.

Diversos testes sorológicos foram já desenvolvidos para detectar anticorpos para o VDA. Os testes que tiveram maior aceitação, a julgar pela frequência com que eles são utilizados são: o teste de soroneutralização realizado em microplacas, utilizando-se diversas células indicadoras e diferentes condições de incubação (Bitsch & Eskildsen 1976, Hill et al. 1977, Gutekunst et al. 1978, McFerran et al. 1979, Van Oirschot & Gielkens 1984), o ensaio imunoenzimático ou ELISA, desenvolvido para o VDA por Moutou et al. (1978) e modificado através da incorporação de antígeno controle (Todd et al. 1981), o microteste de imunodifusão (Gutekunst et al. 1978) e o teste de contraímunoelctroforese (Banks & Cartwright 1983).

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a especificidade e sensibilidade do teste de imunodifusão em placa desenvolvido no Laboratório de Virologia do CNPSA (Romero et al. 1984) comparado com o microteste de soroneutralização (Hill et al. 1977), na detecção de anticorpos para o VDA, em suínos naturalmente infectados ou vacinados contra a DA e de anticorpos maternos em leitões filhos de porcas vacinadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Imunodifusão

Para determinar a presença de anticorpos precipitantes no soro, foi utilizado o teste de imunodifusão (ID) dupla, em placa, realizado em gel de ágar, utilizando-se antígeno, soro de referência e condições de testagem similares àquelas previamente descritas (Romero et. al. 1984).

Soroneutralização

Com o objetivo de avaliar o título de anticorpos neutralizantes no soro, foi utilizado o teste de soroneutralização (SN) em microplacas, levando em consideração os padrões mínimos recomendados para o diagnóstico da pseudorraiva (Hill et al. 1977) com pequenas adaptações as nossas condições laboratoriais. O diluente utilizado em todas as fases do teste de SN era uma mistura de partes iguais dos meios de cultura Ham F10 e 199, adicionado de 5% do soro bovino, penicilina potássica cristalina (500 U/ml), sulfato de dihidroestreptomicina (500 µg/ml) e micostatina (50 U/ml). Os soros eram inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e testados na quantidade de 25 µl, sem diluir e em diluições duplas até a diluição final de 1:256. A cepa viral utilizada foi o VDA 438/83 (Rowe & Romero 1986) isolada no CNPSA, contendo 100 doses infectantes médias para culturas celulares (DICC₅₀) de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) para cada 25 µl. As diluições de soro eram realizadas diretamente na microplaca, e, após adição de igual volume (25 µl, da suspensão contendo 100 DICC₅₀ de vírus, a microplaca era incubada a 37°C durante uma hora. Ao final deste período de incubação, eram adicionadas 100.000 células primárias de FEG preparadas segundo a técnica de Solomon (1975) e, contidas em 200 µl de diluente. As placas eram logo incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, ou lacradas com fita adesiva não tóxica e incubadas em estufa convencional a 37°C. Simultaneamente às titulações dos soros em teste, titulavam-se também soros de referência com e sem anticorpos para o VDA. Como controle intrínscio das 100 DICC₅₀, o vírus era testado em octuplicata em diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁵ partindo da diluição de trabalho utilizada no teste. A leitura dos testes era realizada após três e cinco dias de incubação, quando a leitura da titulação viral indicava 100 DICC₅₀.

Soros para os estudos comparativos

O sangue foi colhido com agulha por punção da veia jugular, da veia cava anterior ou da veia marginal da orelha de suínos de cinco granjas localizadas nos estados do Paraná e Santa Catarina. Após coagulação, o soro era separado, centrifugado e congelado a -20°C até seu processamento para ambos os testes. Outras vezes, o sangue era dessorado a nível de campo e, após dias ou semanas da colheita, os soros eram enviados a nosso laboratório, não raramente acusando diversos graus de contaminação e/ou hemólise. A origem dos soros foi a seguinte:

Soros da Granja A. Obtiveram-se 149 soros de suínos adultos não vacinados contra a DA pertencentes a uma granja de terminação localizada no Município de Ipumirim, Santa Catarina. Esta granja tinha recentemente sido acometida de surto da DA, confirmado através de isolamento viral (VDA 879/84) no CNPSA.

Soros da Granja B. Foram obtidos 304 soros de suínos adultos não vacinados contra a DA pertencentes a uma granja de terminação localizada no Município de Toledo, Paraná. Apesar de se haver introduzido nesta granja suínos de um outro plantel que tinha sofrido surto da DA, os suínos desta granja não apresentaram sintomas indicativos da DA.

Soros da Granja C. Obtiveram-se 110 soros de suínos adultos não vacinados contra a DA, pertencentes a uma granja de reprodutores localizada no Município de Nova Santa Rosa, Paraná, e que tinha sido afetada com surto da DA clínica dois meses antes.

Soros da Granja D. Estes soros foram obtidos de 44 porcas e de 45 leitões de uma granja multiplicadora localizada no Município de Faxinal do Guedes, Santa Catarina. Alguns meses atrás, a granja tinha sido acometida de surto da DA clínica cujo diagnóstico foi realizado no Laboratório de Virologia do CNPSA, com isolamento viral (VDA 607/83).

Com o objetivo de diminuir as perdas econômicas, tinha-se iniciado programa de vacinação contra a DA com vacina inativada oleosa; as porcas foram vacinadas a partir da 2ª semana de gestação, enquanto que os leitões eram vacinados às seis semanas de idade.

Soros da Granja E. Obtiveram-se soros de 80 porcas, 25 leitões e de 56 cachos pertencentes a uma granja de reprodutores localizada no Município de Xanxerê, Santa Catarina. Alguns meses atrás, esta granja tinha sido afetada por surto da DA clínica, com isolamento viral de encéfalo de leitões doentes (VDA 467/83) e, com o intuito de diminuir as perdas econômicas devidas a DA, as porcas tinham sido imunizadas com vacina inativada oleosa entre os 70 e 80 dias de gestação. Os cachos e os leitões não foram vacinados. Estes últimos tinham entre 3 e 4 semanas de idade quando foram sangrados para a avaliação de anticorpos.

RESULTADOS

O teste de ID em placa foi comparado ao microteste de SN, teste quantitativo considerado como de referência para a detecção de anticorpos para o VDA, para determinar a sua sensibilidade e especificidade. Os resultados correspondentes às granjas A, B e C foram analisados juntos por corresponder a soros oriundos de suínos não vacinados e, são apresentados no Quadro 1. Os resultados indicaram que quando os soros são negativos no teste de SN, eles são também negativos no teste de ID (100 por cento de especificidade) e, quando o título de anticorpos neutralizantes é, igual ou maior que dois, o teste de ID é sempre positivo (100 por cento de sensibilidade). Por outro lado, 43 (45,3%) de 95 soros que foram tóxicos no teste de

SN, continham anticorpos precipitantes detectáveis no teste de ID.

Quando ambos os testes foram utilizados para avaliar a presença de anticorpos no soro de porcas vacinadas das granjas D

Quadro 1. *Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de suínos adultos não vacinados mas naturalmente infectados com o VDA, das granjas A, B e C.*

Título SN	Nº de soros com título SN indicado	Nº de ID soros +/testados	ID(c)	
			Sensibilidade %	Especificidade %
Tóxico(a)	95	43/95	NA(d)	NA
Negativo(b)	344	0/344	NA	100
	2	8/8	100	100
	4	17/17	100	100
	8	25/25	100	100
	16	21/21	100	100
	32	21/21	100	100
	64	14/14	100	100
	128	17/17	100	100
	256	1/1	100	100

(a) Soro tóxico para as células indicadoras entre as diluições 1:2 a 1:128. Títulos expressos com a recíproca da diluição que neutralizou 100 DICC₅₀ do VDA.

(b) Correspondente a soro não diluído.

(c) Sensibilidade e especificidade do teste de ID quando comparado ao teste de referência de SN.

(d) Não aplicável.

Quadro 2. *Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de porcas vacinadas das granjas D e E*

Vacinação	Testagem	Título SN	Nº de soros com título SN indicado	ID +	Nº de soros testados	ID(c)	
						Sensibilidade %	Especificidade %
Gestação 2 semanas	Gestação 14 semanas	2	1	1/1	100	100	
		4	2	2/2	100	100	
		8	3	3/3	100	100	
		16	2	2/2	100	100	
		32	4	4/4	100	100	
		64	1	1/1	100	100	
Gestação 4 semanas	Gestação 12 semanas	4	1	1/1	100	100	
		8	3	3/3	100	100	
		16	3	3/3	100	100	
		32	3	3/3	100	100	
		64	2	2/2	100	100	
		128	2	2/2	100	100	
≥ 256	1	1/1	100	100			
Gestação 10 semanas	Gestação 13-16 semanas	Tóxico(a)	4	1/4	NA(d)	NA	
		2	1	1/1	100	100	
		4	5	5/5	100	100	
		8	8	8/8	100	100	
		16	10	10/10	100	100	
		32	23	23/23	100	100	
		64	22	22/22	100	100	
		128	6	6/6	100	100	
256	1	1/1	100	100			
Gestação 14 semanas	Lactação 2 semanas	4	2	2/2	100	100	
		8	2	2/2	100	100	
		16	4	4/4	100	100	
		32	4	4/4	100	100	
		64	3	3/3	100	100	
		128	1	1/1	100	100	

(a, c, d) Vide Quadro 1.

Quadro 3. Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de leitões vacinados (Granja D) e não vacinados (Granja E) contra a doença de Aujeszky

Granja	Idade Semanas	Título SN	Nº de soros com título SN indicado	ID +	Nº de soros testados	ID(c)	
						Sensibilidade %	Especificidade %
D Vacinados	10	Tóxico(a)	8	6/8		NA(d)	NA
		2	5	5/5	100	100	
		4	3	3/3	100	100	
	14	Tóxico	14	2/14		NA	NA
	18	Tóxico	14	0/14		NA	NA
		4	1	1/1		100	100
E Não vacinados	3-4	4	3	3/3		100	100
		8	4	4/4		100	100
		16	8	8/8		100	100
		32	8	8/8		100	100
		64	1	1/1		100	100
		128	1	1/1		100	100

(a, c, d) Vide Quadro 1.

Quadro 4. Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de cachaços da granja E

Título SN	Nº de soros com título SN indicado	ID + / Nº de soros testados	ID(c)	
			Sensibilidade %	Especificidade %
Tóxico(a)	1	0/1	NA(d)	NA
Negativo(b)	38	0/38	NA	100
ND(e)	2	2/2	100	100
8	3	3/3	100	100
16	5	5/5	100	100
32	3	3/3	100	100
64	3	3/3	100	100
≥128	1	1/1	100	100

(a, b, c, d) Vide Quadro 1.

(e) Não diluído.

e E, todos os soros com títulos de anticorpos neutralizantes igual ou maior que dois continham anticorpos precipitantes detectáveis no teste de ID (Quadro 2). Um (25%) de quatro soros tóxicos no teste de SN foi positivo no teste de ID.

Os resultados de ambos os testes realizados utilizando-se soros de leitões indicaram também que soros com níveis de anticorpos neutralizantes iguais ou maiores que dois são sempre positivos no teste de ID (Quadro 3). Alguns soros de leitões que foram tóxicos no teste de SN, foram positivos no teste de ID. Quando a avaliação foi realizada em soros de cachaços da granja E, verificou-se que todos os soros positivos no teste de SN, também o foram pelo teste de ID (Quadro 4). Os 38 soros com resultados negativos no teste de SN, também foram negativos no teste de ID.

Finalmente, considerando os resultados globais fornecidos pelos testes de SN e ID, verificou-se que de 813 soros testados

Quadro 5. Resultados globais do estudo comparativo entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros suínos

Granja	Suínos	Tipo de infecção	Nº de soros testados	Soroneutralização			Imunodifusão	
				+	-	Tóxicos	+	-
A	Adultos	Natural(a)	149	77	55	17	81	68
B	Adultos	Natural	304	6	289	9	6	298
C	Adultos	Natural	110	41	0	69	80	30
D	Porcas	Vacinação(b)	44	44	0	0	44	0
D	Leitões	Vacinação	45	9	0	36	17	28
E	Porcas	Vacinação	80	76	0	4	77	3
E	Leitões	Antic. maternos(c)	25	25	0	0	25	0
E	Cachaços	Natural	56	17	38	1	17	39
Total			813	295	382	136	347	466
				(36,3%)	(47%)	(16,7%)	(42,7%)	(57,3%)

(a) Anticorpos correspondentes à infecção natural.

(b) Anticorpos formados como consequência da vacinação com vacina inativada oleosa.

(c) Anticorpos transferidos via colostro.

em ambas as provas, o teste de SN detectou 295 (36,3%) soros com anticorpos, 382 (47%) soros sem anticorpos e 136 (16,7%) soros foram tóxicos para as células indicadoras e, conseqüentemente, ficaram sem resultado (Quadro 5). Por outro lado, o teste de ID permitiu a detecção de 347 (42,7%) soros com anticorpos enquanto que 466 (57,3%) foram negativos.

DISCUSSÃO

O teste de ID em placa utilizado no presente estudo comparativo, difere consideravelmente do microteste de ID em lâmina, previamente desenvolvido (Gutekunst et al. 1978) e avaliado (Johnson et al. 1983) frente ao teste de SN para o VDA. A extrema sensibilidade de nosso teste em placa pode ser conseqüência do procedimento utilizado para preparar o antígeno de referência. Acredita-se que, a concentração das proteínas virais através da diálise em polietilenoglicol (Romero et al. 1984), seja mais eficiente na recuperação dos dois antígenos virais reagentes do VDA, quando comparada com o método de precipitação com sulfato de amônia (Gutekunst et al. 1978). Todavia, no teste de ID em placa, os soros e o antígeno são utilizados em volumes de 100 μ l, aproximadamente quatro vezes os volumes utilizados no microteste de ID em lâmina. Este fator quantitativo poderia também ter sido determinante na obtenção dos bons resultados.

A sensibilidade do teste de ID em placa foi de 100% para todos os soros que possuíam anticorpos neutralizantes para 100 DICC₅₀, independentemente do título. Soros que somente neutralizavam quando testados não-diluídos, reagiam geralmente dobrando a linha de precipitação formada entre o soro e o antígeno de referência. Este resultado contrasta com os obtidos por Johnson et al. (1983), que encontraram no teste de ID em lâmina somente sensibilidade de 100% com soros com títulos de anticorpos de 64 ou mais. Esses autores verificaram que o teste em lâmina era de baixa sensibilidade com soros de título neutralizante igual ou menor que oito. No trabalho original, Gutekunst et al. (1978) observaram que o teste em lâmina tinha uma correlação perfeita com o teste de SN apenas no caso de soros com título neutralizante igual ou superior a 16. Uma segunda linha de precipitação era geralmente observada em soros com título igual ou superior a oito. Esta é a primeira vez que se reporta esta segunda antigenicidade e, que provavelmente, é devida a qualidade do antígeno utilizado. Banks & Carwright (1983) indicaram que o teste de ID em lâmina não era tão eficiente como os testes de ELISA e o de SN na detecção de anticorpos para o VDA, porém, esses autores utilizaram água destilada em vez de tampão Tris (Gutekunst et al. 1978), o que poderia ter afetado os resultados significativamente.

O teste de ID em placa foi sensível tanto na detecção de anticorpos da infecção natural com o VDA e da vacinação com vacina inativada oleosa. Estes resultados são diferentes dos obtidos por Johnson et al. (1983), que verificaram ser o teste de ID em lâmina, mais eficiente na detecção de anticorpos produzidos na infecção natural com vírus de campo do que na vacinação com uma cepa viral viva modificada.

O teste de ID foi também altamente específico na detecção de anticorpos para o VDA de origem materna, da vacinação ou da infecção natural. Em nenhum caso foi encontrado um soro que fosse positivo para anticorpos precipitantes e negativo para anticorpos neutralizantes.

Poucos foram os soros suínos que reagiram com componentes do soro bovino contido no antígeno de referência no teste de ID. Esta reação, de uma maneira geral, não interferia com a leitura da prova. Resultados de ensaios preliminares demonstraram que antígenos preparados de culturas celulares com aproximadamente 1% de soro bovino, possuíam, constantemente, maior potência que antígenos preparados de culturas celulares isentas de soro.

O soro de referência utilizado no teste de ID é da maior importância para facilitar a leitura da prova. Deve-se escolher soros que forneçam uma ou duas linhas de precipitação claras, mas não exageradamente fortes. Como recomendado por outros autores (Gutekunst et al. 1978), não devem ser utilizados como referência soros de suínos hiperimunes, por reagirem estes com linhas múltiplas que não reagem em comum com linhas de precipitação formadas por soros fracamente positivos ou com título neutralizante menor que dois.

O teste de ID em placa utilizado no presente estudo, é um teste simples, que requer de pouca destreza e nenhuma sofisticação. É um teste rápido e relativamente econômico, que fornece resultados preliminares em 24 horas e definitivos em 72 horas. Além disso, pode ser implementado em laboratórios que não manipulam culturas celulares e que não possuem equipamento sofisticado. A maior vantagem sobre o teste de SN, é a de poder avaliar soros tóxicos devido a contaminação e/ou hemólise, sem perder em sensibilidade e especificidade.

A principal limitação do teste de SN é, sem dúvida, a qualidade do soro a ser testado. No presente estudo, muito soros provinham de áreas relativamente distantes, e não tinham sido adequadamente processados e/ou estocados antes do envio ao laboratório. A percentagem de soros tóxicos foi excessivamente alta (16,7%) e, em todos os casos, somente no teste de SN, não teria sido possível um diagnóstico. Em todo programa de controle e erradicação, o diagnóstico sorológico rápido e acurado de todos os suínos infectados é um requerimento essencial e, quando suínos infectados não são propriamente identificados devido a toxicidade do soro, é imperativo utilizar um segundo teste para se obter um resultado que permita o diagnóstico em 100% dos suínos testados. O teste de ID preencheu os requisitos deste segundo teste. Enquanto que a SN permitiu a detecção de 295 soros com anticorpos dos 813 testados, o teste de ID detectou 347 soros positivos. A diferença em todos os casos foi devida a toxicidade dos soros, provavelmente com anticorpos neutralizantes de baixo título, e não a falta de sensibilidade do teste de SN. Problemas similares foram encontrados no Estado de Missouri, EUA, no início da implementação do teste de SN (Solorzano & Thawley 1979). Acredita-se que através da divulgação da necessidade da utilização de técnicas assépticas mais rigorosas para a sangria de suínos, assim como do processamento e estocagem rápida dos soros obtidos, possa-se num futuro próximo, obter índices mais reduzidos de toxicidade no teste de SN.

Agradecimentos.- Agradecemos a excelente assistência técnica de Auria Dartora e Ivane Müller.

REFERÊNCIAS

- Akkermans J.P.W.M., Rondhuis P.R. & Wirahadiredja R.M.S. 1975. Observations on Aujeszky's disease in the Netherlands. *Bull. Off. Int. Epiz.* 84: 179-194.
- 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.
- Bitsch V. & Eskildsen M. 1976. A comparative examination of swine sera for antibody to Aujeszky virus with the conventional test and a modified virus-serum neutralization test and a modified direct complement fixation test. *Acta. Vet. Scand.* 17: 142-152.
- Gutekunst D.E., Pirtle E.C. & Mengeling W.L. 1978. Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am. J. Vet. Res.* 39: 207-210.
- Hill H.T., Crandell R.A., Kanitz C.L., McAdaragh J.P., Seawright G.L., Solorzano R.F. & Stewart W.C. 1977. Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc. 20th Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.*, p. 375-390.
- Johnson M.E., Thawley D.G., Solorzano R.F. & Wright J.C. 1983. Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 44: 28-30.
- Leunen J., De Meurichy W. & Pensaert M. 1975. La maladie d'Aujeszky en Belgique. *Bull. Off. Int. Epiz.* 84: 171-178.
- McFerran J.B., Dow C. & McCracken R.M. 1979. Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 327-334.
- Moutou F., Toma B. & Fortier B. 1978. Application of an enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of Aujeszky's disease in swine. *Vet. Rec.* 102:264.
- Romero C.H., Rowe C.A., Provenzano G.I., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1984. Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky em plantéis suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 4(4): 123-127.
- Rowe C.A. & Romero C.H. 1986. Isolamento e identificação do vírus da doença de Aujeszky de surtos em suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* (Submetido para publicação)
- Solomon J.J. 1975. Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Ass. Man.* 1: 7-11.
- Solorzano R.F. & Thawley D.G. 1979. Laboratory studies of pseudorabies. *Proc. 22nd Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diag.*, p. 157-168.
- Todd D., McNair J., McNulty M.S. & McFerran J.B. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs. *Vet. Rec.* 109: 534-537.
- Toma B., Lorant J.M., Ursache R., Vígouroux A., David C., Bijlenga G., Rose R., Duee J.P., Alamagny A., Laurent J., Goyon M. & Le Gardinier J.C. 1983. La maladie d'Aujeszky en France en 1982. *Rec. Méd. Vét.* 159(5): 493-498.
- Van Oirschot J.T. & Gielkens A.L.J. 1984. In vivo and in vitro reactivation of latent pseudorabies virus in pigs born to vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.* 45: 567-571.
- Wright J.C., Thawley D.G. & Solorzano R.F. 1982. Field evaluation of test-and-removal and vaccination as control measures for pseudorabies in Missouri swine. *Can. J. Comp. Med.* 46: 420-425.