



Alejandro Ramirez
M. Veterinário
Iowa State University
ramireza@iastate.edu

Diagnóstico de doenças de suínos: Ferramentas e Interpretações

O objetivo deste artigo é enfatizar pontos importantes no uso de ferramentas de diagnóstico. É importante recordar porque são coletadas amostras, o que é que as provas nos dizem e – do mesmo modo – o que é que elas não nos dizem, com a finalidade de nos prepararmos melhor para interpretar os resultados.

Porque coletar amostras?

Um dos pontos mais críticos é lembrar que a amostragem não deve ser feita, caso não haja um plano de como utilizar os resultados. O objetivo sempre deve ser que a amostragem indique a direção. Neste caso, devem ser feitos planos para ambos os resultados (positivos ou negativos). Preferencialmente, seria desejável que tivesse isso por escrito, antecipado e aprovado por todos aqueles interessados. Por exemplo, é comum se analisar uma amostragem de fêmeas de reposição na entrada da área de isolamento, com a idéia de comprovar que não tem anticorpos contra PRRS (Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína). Isso tem um enfoque sanitário de não introduzir animais positivos no rebanho, podendo ser justificado apenas se forem tomadas medidas específicas caso os resultados sejam



Para melhor interpretação dos resultados das amostras, é imprescindível definir o tipo de prova e selecionar adequadamente os animais para a coleta dos mesmos.

positivos (sendo que a expectativa é que sejam negativos). O tempo para tomar este tipo de decisão é antes que aconteça, quando todos os participantes no processo estão pensando em todas as opções e ainda não há pressão para se tomar uma decisão imediata. Isso dá tempo para discutir todas as consequências de cada decisão. Uma vez que todos estejam de acordo, isso facilita a futura implementação do programa de biossegurança.

A meta da amostragem determina como será feita, definindo a frequência, o número e as etapas de produção do enfoque. Tudo isso vai

depende da pergunta a responder. As marrãs estão infectadas com PRRS (detectar a doença)? Deve-se vacinar contra ileíte ou tratar (determinar a prevalência)? Qual o momento adequado para vacinar os suínos de crescimento contra a influenza (definir o tempo de infecção)? O protocolo da amostragem é determinado pela meta?

O que se procura?

Basicamente as provas podem

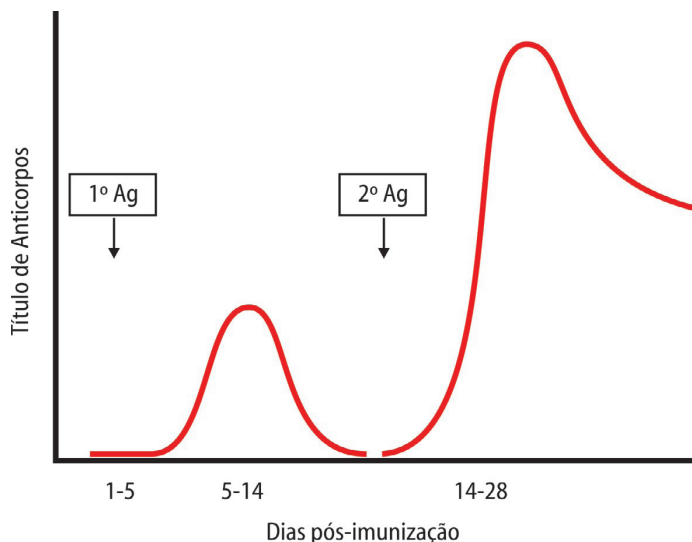
ser classificadas em dois tipos. As provas de anticorpos e as provas de antígeno.

As provas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay / análise imuno-enzimática), SN (Serum Neutralization / soro-neutralização), CF (Complement Fixation / fixação de complemento) e HI (Hemagglutination inhibition / inibição da hemaglutinação), são os tipos mais comuns para a detecção de anticorpos.

Quanto às provas mais comuns para a detecção de antígenos, temos o PCR (Polymerase Chain Reaction / reação de cadeia da polimerase), o sequenciamento genético, o cultivo ou isolamento viral, a IFA (Immuno Fluorescent Antibody Test / prova de anticorpos imuno-flourescentes) e a IHC (Immunohistochemical Test / prova imuno-histoquímica).

É obrigação dos médicos veterinários estarem cientes de todas estas provas, além daquelas novas que estarão disponíveis no futuro. Mantendo comunicação frequente com o labora-

Gráfico 2



tório de diagnóstico, há a oportunidade de fazer a prova disponível mais adequada.

O que dizem as provas?

É interessante recordar que a resposta de anticorpos contra antígenos

celulares pode ser classificada em quatro fases, como ilustrado na figura 01.

Neste caso, a fase LAG é definida como o período compreendido entre a exposição do animal ao antígeno e o início da produção de anticorpos. Segue-se a fase LOG, onde há um incremento muito rápido (logarítmico) dos anticorpos. Esta fase de incremento logarítmico culmina com a fase PLATEAU, a qual é seguida pela fase DECLÍNIO, que é quando o nível de anticorpos circulantes começa a declinar.

Estas mesmas fases ocorrem na resposta de anticorpos após a segunda dose (ou dose de reforço), como demonstrado no gráfico 2. A diferença é que, na segunda resposta, a produção de anticorpos é mais rápida e os valores obtidos são maiores.

Também é importante lembrar que em uma população, nem todos os animais se encontram ao mesmo tempo na mesma fase. O gráfico 3 ajuda

Figura 1

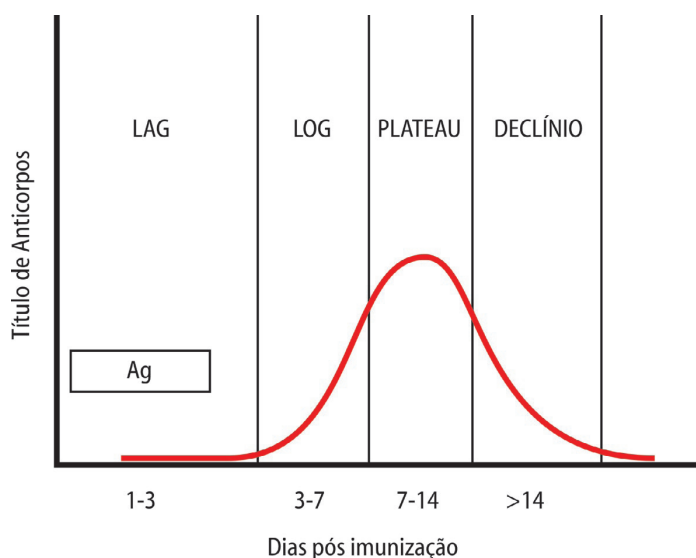
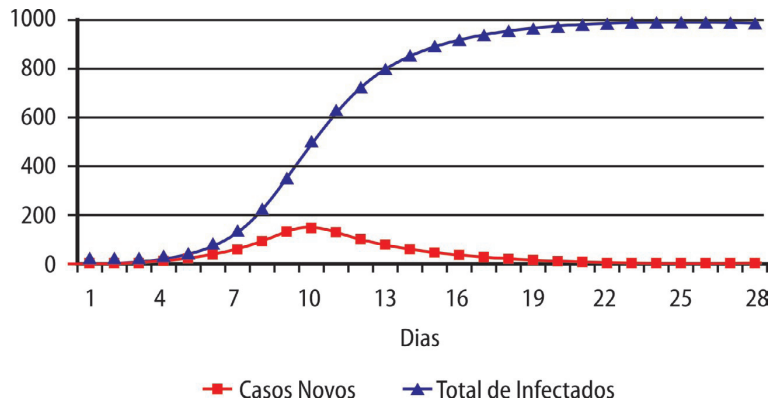


Gráfico 3



a identificar visualmente a quantidade de casos novos, além do total de casos, que ocorrem em um ponto específico de um surto infeccioso presente em uma recria de 1.000 suínos:

Ainda que de modo apenas demonstrativo, este gráfico ajuda a entender a importância do tempo na identificação de um novo surto. Usualmente é difícil identificar a causa do surto em sua fase inicial, já que há muito poucos animais infectados, o que torna mais complicado a seleção dos mesmos para a amostragem. Depois de duas ou três semanas a mais, é mais fácil realizar uma amostragem ao acaso.

As provas são 100% exatas?

Ao fazer provas diagnósticas, os laboratórios costumam dar detalhes da sensibilidade e especificidade diagnóstica de cada prova. No caso da sensibilidade diagnóstica, está re-

lacionada à capacidade da prova em identificar corretamente um caso positivo, dentre um grupo de amostras sabidamente positivas. Já a especificidade diagnóstica é a capacidade da prova em identificar corretamente uma amostra negativa dentre um grupo de amostras sabidamente negativas. Em ambos os casos, buscam-se provas que tenham resultados 100% corretos. Ocorre que, usualmente, estas duas características trabalham uma contra a outra. O que equivale a dizer que, ao melhorar a especificidade de uma prova, piora sua sensibilidade.

O problema é que, no campo, não sabemos o *status* real do animal e, portanto, não sabemos a sensibilidade ou especificidade da prova. Na realidade as decisões são embasadas no que se chama o valor preditivo da prova. Isto significa que o valor preditivo positivo (VPP) da prova indica qual é a probabilidade de que um resultado positivo seja realmente positivo. O mesmo se diz de um valor

predicativo negativo (VPN), por meio do qual é preciso saber quão real é o resultado negativo.

Com base na tabela 01, é possível calcular os valores preditivos do seguinte modo:

Valor preditivo positivo

$$VPP = A / (A + B)$$

Valor preditivo negativo

$$VPN = C / (C + D)$$

É considerado que o valor preditivo, seja positivo ou negativo, é dependente da prevalência. Sabe-se que a prevalência de uma doença varia entre populações, consequentemente, o valor preditivo das provas irá variar entre populações.

As tabelas 2a e 2b representam duas populações de 10.000 animais, onde se manteve a mesma sensibilidade e especificidade de uma prova (99,5 e 98,5 respectivamente) e onde mudou apenas a prevalência de 10% para 1%:

Quando a infecção é rara (prevalência muito baixa) pode-se dizer que há maior probabilidade de um resultado positivo ser, na realidade, um resultado falso. No exemplo anterior, com uma prevalência de 1% pode-se dizer que há apenas uns 40% de probabilidade de que o resultado seja real e uns 60% de probabilidade de que seja um resultado falso positivo. O que recorda que os resultados de provas nunca são 100% corretos.

Tabela 1	Estado da doença	
	Positiva (+)	Negativa (-)
Prova positiva (+)	A	B
Prova negativa (-)	C	D

Como são estabelecidos os limites?

Tabela 2a

10% prevalência	Infeção Positiva	Infeção Negativa		
Prova Positiva	995 (TP)	135 (FP)	$\frac{995}{995 + 135}$	VPP 0,88
Prova Negativa	5 (FN)	8865 (TN)	$\frac{8865}{8865 + 5}$	VPN 0,999
	$\frac{995}{995 + 5}$	$\frac{8865}{8865 + 35}$		
	Sensibilidade 99,5	Especificidade 98,5		

Tabela 2b

1% prevalência	Infeção Positiva	Infeção Negativa		
Prova Positiva	99,5 (TP)	148,5 (FP)	$\frac{99,5}{99,5 + 148,5}$	VPP 0,40
Prova Negativa	0,5 (FN)	9751,5 (TN)	$\frac{9751,5}{9751,5 + 0,5}$	VPN 0,999
	$\frac{99,5}{99,5 + 0,5}$	$\frac{9751,5}{9751,5 + 148,5}$		
	Sensibilidade 99,5	Especificidade 98,5		

O ideal é que, ao realizar a leitura dos resultados das provas, fosse estabelecido um ponto limite para separar os resultados positivos dos negativos. Também é ideal agrupar todos os resultados positivos à direita (ou à esquerda, dependendo da prova) e que todos os resultados negativos à esquerda (ou à direita) deste ponto estabelecido. Infelizmente, na prática há variação suficiente de resultados a ponto de – ainda que sejam poucos – alguns resultados de ambos os grupos (positivos e negativos) cruzarem o limite. Por esta razão há um grupo pequeno de resultados que serão classificados de modo inadequado, simplesmente com base no ponto limite selecionado. Por exemplo, no ELISA para PRRS ficou estabelecido que o ponto limite fosse o valor de 0,400. Por definição, estabeleceu-se então que todo resultado igual ou maior que 0,400 é classificado como positivo e todo valor menor é negativo. Será que, na realidade, há muita diferença entre um valor de 0,399 (negativo) e um valor de 0,400 (positivo)? Isso alerta o fato dos pontos limite não serem assim tão exatos.

Tempo oportuno

A ênfase é sobre a resposta imune de cada animal, a qual varia com o tempo. Por exemplo, no caso da PRRS, primeiro é encontrado o vírus circulando e depois de 10 ou 14 dias encontram-se os anticorpos. Os anticorpos IgM são os primeiros a aparecer, seguidos pelos IgG. O tipo de componente a ser encontrado (antígeno, IgM, e/ou IgG) vai depender do ponto onde se inicia a amostragem. Muitas vezes, com apenas um resultado sorológico não é possível determinar em que fase da resposta imune se encontra a população. Por esta razão, para se definir melhor a fase da resposta imune dos animais e – com esse resultado – estabelecer com maior certeza o estado do surto da doença, é comum a necessidade de coletar uma série (mais de uma) de amostras.

O que mais é preciso saber?

Na avaliação dos resultados de um diagnóstico é preciso ter acesso a informações adicionais pertinentes,

tais como o nível de proteção por anticorpos maternos. O uso de vacinas inativadas em fêmeas, ou nos animais que compõem a amostragem, pode resultar em valores positivos para anticorpos, mas não devem gerar resultados positivos relativos a antígenos. Já o uso de vacinas vivas modificadas pode resultar em valores positivos, tanto para anticorpos quanto para antígenos. Para que se possa resolver essas complicações diagnósticas relativas ao uso de vacinas, é importante não esquecer da utilização de animais sentinelas. Identificar animais negativos e não vaciná-los, transformá-los em sentinelas. Ao misturar esses animais com os grupos de onde fará a amostragem, é preciso monitorar estes sentinelas periodicamente.

Outras provas

Há uma variedade de outras provas que é possível utilizar, em termos de diagnóstico. O isolamento viral tem a desvantagem de ser uma prova lenta, especialmente naqueles casos negativos, onde é preciso esperar vários dias antes de sua confirmação como tal. O cultivo bacteriano é

usualmente mais rápido, requerendo apenas 24 ou 48 horas de cultivo. Outro problema com relação ao cultivo viral, é que ele requer uma antecipação relativa ao tipo de vírus com o qual está sendo usado, uma vez que cada agente viral demanda um meio de cultura específico.

O uso da sequenciação de organismos está se tornando frequente, embora seja um processo demorado (duas a quatro semanas), caro (US\$150,00) e de interpretação ainda não muito clara. Na maioria dos casos só se obtém uma sequência de parte

do vírus. Por exemplo: usualmente é obtida a sequência ORF5 do vírus da PRRS, o que resulta na sequência de apenas 600 bases, entre as mais de 15.000 bases do vírus completo. As sequências ajudam a interpretar a epidemiologia viral, auxiliando a estabelecer sua possível origem. A sequência **NÃO** informa sobre a similaridade imunológica viral e, portanto, não serve para indicar qual cepa ou vacina funcionará melhor contra o agente em questão. Os dendogramas são úteis apenas para agrupar cepas com possibilidade de origens similares, não implicando, porém, em proteção.

A possibilidade da necropsia

Um tipo de prova diagnóstica que se pode fazer todos os dias é a necropsia. Havendo a oportunidade é possível aproveitar, pois uma necropsia fornece informações que poderão ajudar a concluir o diagnóstico relativo à possível causa do surto. É importante seguir sempre os mesmos passos durante a necropsia, para poder identificar as condições anormais. A coleta de amostras de tecidos apropriados incrementa a possibilidade de fazer um diagnóstico definitivo. O laboratório de diagnóstico em questão poderá identificar o antígeno no mesmo local onde se concentra o dano histológico, confirmando assim a causa e o seu efeito (diagnóstico definitivo).


Coleta de sangue

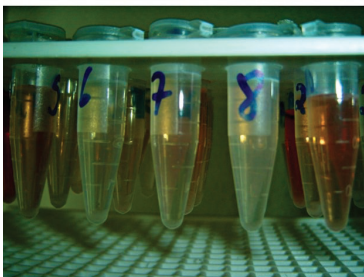
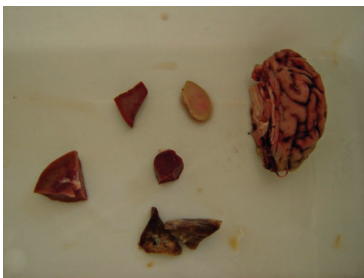
Para calcular o tamanho da amostra é necessário saber três coisas: primeiro, o número de animais do

grupo (plantel, lote, etc.); Segundo, o limite mínimo de detecção (05, 10 ou 20%) e finalmente, a probabilidade de detecção (usualmente 90 ou 90%). Conhecendo estes três valores use os livros de textos, folhas de cálculo ou um programa de computador específico para a obtenção do número desejado.

Se o objetivo for obter uma amostragem populacional com, pelo menos, 10% de prevalência da doença e a pretensão for 95% de confiança de que será encontrado, pelo menos, um animal positivo no grupo, usualmente será necessária uma amostragem de 30 animais, ao acaso. Isso se refere a uma amostragem de 95 – 10, resultando em 30 animais.

Se o objetivo for obter uma amostragem populacional com, pelo menos, 05% de prevalência da doença e com 95% de confiança de que será encontrado, pelo menos, um animal positivo no grupo, usualmente será necessária uma amostragem de 60 animais, ao acaso. Isso se refere a uma amostragem de 95 – 05, resultando em 60 animais.

A amostragem de 14 animais assegura 95% de confiança de que será encontrado, pelo menos, um animal positivo sempre e quando a doença tiver uma prevalência de, ao menos, 20%. Já a amostragem de 10 animais assegura 90% de confiança de que será encontrado, pelo menos, um animal positivo sempre e quando a doença tiver uma prevalência de, ao menos, 25%. 



As amostras utilizadas para auxílio de diagnóstico devem ser enviadas corretamente, para que o processamento do material seja realizado em tempo hábil garantindo assim a qualidade e precisão dos resultados.

Amostragem de tecidos

Os dados seguintes servem como guia para a coleta de amostras dos tecidos mais utilizados na investigação de casos gerais, na suinocultura:

Aborto suíno

- **Cérebro:** ½ a fresco, ½ fixado em formol;
- **Coração:** ½ a fresco, ½ fixado em formol;
- **Rins:** um a fresco, um fixado em formol;
- **Fígado:** ½ a fresco, corte de 0,5 cm fixado em formol;
- **Pulmão:** um lado a fresco, vários pedaços de 0,5 cm fixados em formol;
- **Umbigo:** pedaços de 1 cm. de áreas hemorrágicas fixados em formol;
- **Conteúdo estomacal:** 3 mL por suíno;
- **Fluido torácico:** 2 mL/suíno, a fresco, podendo-se juntar amostras por lote;
- **Placenta:** uma parte a fresco, três partes fixadas em formol.

Doenças do sistema nervoso central (SNC) suíno

- **Hisopo Meningeo e/ou líquido cefalorraquidiano:** Deverá ser obtido antes de remover o cérebro;
- **Cérebro:** ½ a fresco/refrigerado, ½ fixado em formol;

- **Medula espinhal:** várias peças de 10 cm a fresco, várias secções de 1,5 cm – de 4 a 5 níveis diferentes – fixadas em formol;
- **Baço:** a fresco/refrigerado e fixado em formol;
- **Tonsilas:** ½ a fresco/refrigerada, ½ fixada em formol;
- **Íleo:** duas peças de 10 cm a fresco, 4 peças de 1,0 cm fixadas em formol.

Enterite suína – leitões

A amostragem ideal seria de vários leitões doentes, em estado agudo e sem tratamento.

- **Colon e ceco:** órgão inteiro a fresco/refrigerado, várias peças de 1,0 cm fixadas em formol;
- **Íleo:** dois segmentos de 10 a 15 cm a fresco/refrigerados, quatro peças de 1,0 cm fixadas em formol;
- **Jejuno:** dois segmentos de 10 a 15 cm a fresco/refrigerados, quatro peças de 1,0 cm fixadas em formol;
- **Secções intestinais com lesões macroscópicas:** segmentos de 10 a 15 cm a fresco, peças de 1,0 cm fixadas em formol;
- **Fezes:** 10 ml a fresco/refrigeradas, origem ceco/colon.

Enterite suína – desmame e crescimento

- **Íleo e jejuno:** dois cortes de 10 cm a fresco/refrigerados, quatro cortes de 1,0 cm fixados em formol;

- **Colon e ceco:** órgãos inteiros ou dois segmentos de 10 cm do colon espiral a fresco/refrigerados, quatro peças de 1,0 cm fixadas em formol;
- **Intestino com lesões:** cortes de 10 a 15 cm a fresco/refrigerados, vários cortes de 1,0 cm fixados em formol;
- **Fezes:** 10 mL a fresco/refrigerados;
- **Nódulos linfáticos mesentéricos:** a fresco e fixados em formol;
- **Fígado:** ¼ do órgão a fresco, três cortes fixados em formol;
- **Estômago:** examinar e enviar caso haja lesões.

Pneumonia suína

- **Cérebro:** ½ a fresco/refrigerado, ½ fixado em formol;
- **Trato respiratório superior:**
 - Esmregaço (*swab*) de cornetos
 - Esmregaço (*swab*) de brônquios
 - Cornetos fixados em formol
- **Pulmão:**
 - Lavado de fluido brônquio-alveolar, caso necessário o isolamento viral para PRRS
 - Um lado inteiro a fresco, sem perfurações ou uma porção de ±10 cm³ com lesões
 - Cinco cortes de 1,0 cm fixados em formol .
 - Nódulo linfático tráqueo-bronquial: ½ a fresco, ½ fixado em formol
- **Tonsilas:**
 - ½ a fresco, ½ fixadas em formol