

A importância do diagnóstico laboratorial na medicina veterinária

Adrienny Trindade Reis, MV, MS

IPEVE- Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas Veterinárias

Rua Esmeralda, 786, Bairro Prado, Belo Horizonte, Minas Gerais , Brasil

INTRODUÇÃO

A medicina veterinária tem evoluído continuamente ao longo dos últimos anos em termos de eficiência , oriundos da melhoria genética, programas nutricionais modernos, desenvolvimento de novos produtos biológicos, incluindo vacinas autógenas e farmacêuticos, que geraram aumentos substanciais no desenvolvimento do suporte laboratorial, este voltado principalmente para a identificação precoce dos agentes patogênicos.

Por outro lado, os desafios continuam crescentes, especialmente no controle de doenças , seja no setor de produção quanto na área de criação de animais domésticos.

A boa sanidade é um dos pilares de sustentação para a cadeia veterinária, como exemplo disto citamos a importância do diagnóstico de algumas doenças emergentes e reemergentes em animais , como segue abaixo.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Um dos principais entraves no controle adequado das doenças infecciosas, é a falta de um diagnóstico laboratorial e diferencial consistente e preciso. A seleção de número significativo de animais para diagnóstico é ponto crucial , para animais de produção.

O conhecimento das patologias primárias, secundárias, associações que participam do quadro clínico é essencial para o estabelecimento de programas de controle específicos e efetivos.

Apesar do domínio das diferentes técnicas modernas para identificação precoce dos patógenos, a falta de aprofundamento e uso destas técnicas tem levado a erros ou aplicação inadequada em programas preventivos de antimicrobianos e vacinas. É essencial ampliar e introduzir como rotina o diagnóstico laboratorial como a base técnica para estabelecimento de programas dinâmicos de controle das doenças .Protocolos bem definidos e

padronizados, quanto no uso da metodologia de coleta e eleição das técnicas laboratoriais devem ser mantidas de forma regular, no exercício profissional.

O monitoramento laboratorial possui vários objetivos e a estratégia ótima para alcançar cada um pode ser diferente. Como não existe um teste perfeito, a escolha do mesmo, tipos de amostra, disponibilidade do teste, custo, rapidez, facilidade de execução, precisão, sensibilidade, especificidade, repetibilidade, reprodutividade são variáveis de pouco domínio pelo veterinário de campo, mas que devem ser de seu conhecimento para seleção adequada. Neste capítulo, são abordados os princípios necessários para uso correto dos testes disponíveis e interpretação dos resultados. Atualmente o número de testes disponibilizados aumenta cada vez mais de forma que há necessidade do conhecimento dos princípios de cada um, além de uma cuidadosa avaliação dos seus pontos fortes e fracos. A seguir serão apresentadas as **principais razões para o uso de testes laboratoriais** como ferramenta de monitoramento.

Identificar as doenças ou agentes patogênicos responsáveis por mortalidade e produção sub-ótima

Para um rebanho negativo, resultados positivos permitem um diagnóstico presuntivo de uma doença. Uma condição importante é conhecer o estado sanitário inicial da granja. Em quarentenas, por exemplo, é essencial testar para aquelas doenças cuja granja receptora é negativa e de preferência fazer duas amostragens, sendo a primeira no momento da chegada dos animais e a segunda antes da entrada dos animais. Além disto, é essencial associar os resultados encontrados com os achados clínicos e lesões para analisar criticamente se os animais foram contaminados antes ou após a chegada na granja. Um certificado de um rebanho negativo para determinada doença pode ser necessário para comercializar, movimentar, demonstrar para autoridades oficiais, bem como para documentação dos rebanhos. Nestes casos, o ideal seria trabalhar com testes altamente sensíveis, para detectar o mais precoce possível os animais positivos.

Determinar a distribuição da doença nos vários grupos etários

O monitoramento de rebanho deve ser feito diferentemente do diagnóstico. Analisa a prevalência e incidência da doença por grupo de animais. Existem doenças idade dependentes ou associadas ao manejo, que podem ser avaliadas através deste estudo.

Determinar a prevalência e a incidência das doenças

Prevalência é a proporção estimada de animais infectados numa população em determinado tempo, enquanto incidência refere-se a taxas de novas infecções estimadas num determinado período. Isto permite estudar a evolução da doença ao longo do tempo em função das medidas implementadas.

Monitorar a resposta sorológica aos programas de vacinação

Nas doenças cuja imunidade é humoral, mediada por anticorpos, a avaliação dos títulos de anticorpos oferece elementos importantes para os programas sanitários. É essencial o contato direto entre o produtor da vacina e o veterinário responsável pela granja para solicitar o teste mais adequado, visando obter informações seguras para a interpretação dos resultados. O monitoramento dos programas vacinais pode ser analisado criticamente, através dos resultados dos títulos e coeficiente de variação encontrada na população vacinada. Estes resultados podem fornecer informações sobre a qualidade da vacina, ou mesmo evidenciar a ocorrência de falhas vacinais, avaliar esquemas de vacinação e a duração da imunidade. À exemplo do que ocorre em aves, a sorologia regular é utilizada na monitoria dos programas sanitários. São inúmeras as vezes em que suinocultores ou veterinários promovem mudanças nos seus programas, sem analisar criticamente o que está ocorrendo com a resposta imune.

Monitorar o progresso ou sucesso dos programas de controle ou erradicação

Isto se aplica, em especial, aos programas de teste e remoção dos positivos como no caso da doença de Aujeszky, onde o uso de vacinas deletadas permite diferenciar animais infectados de vacinados.

Monitoramento Sorológico em Grandes Sistemas de Produção

Este tipo de monitoria permite a classificação de pirâmides sanitárias dentro dos sistemas. É essencial conhecer o tipo de rebanho (multiplicador, comercial ou central de inseminação), para definir os tipos de testes e a frequência mais adequada do seu uso. É imprescindível determinar protocolos específicos de testes com as devidas interpretações para o sucesso do programa.

Estabilidade dos rebanhos

É feito após um surto de determinada doença ou em projetos contínuos de monitoramento de mudanças ao longo do tempo. Para tal, devemos conhecer as curvas esperadas de anticorpos nos rebanhos vacinados e infectados. No caso da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), esta é uma metodologia muito utilizada, visando manter o rebanho infectado com títulos uniformes, sem picos de replicação viral e conseqüentemente com maior disseminação do vírus. A estabilidade do rebanho de reprodução assegura que o PRRSV não esteja circulando em leitoas, matrizes e cachaços.

Avaliar a qualidade sanitária da carne e matérias primas

Este é o caso da *Salmonella*, onde os testes de Elisa em sucos de carne têm sido usados para classificar o grau de contaminação das granjas, visando ao controle das propriedades infectadas e garantindo níveis sanitários mais favoráveis à exportação dos produtos de origem suína.

Notificação de doenças.

Algumas doenças são de notificação compulsória e seguem programas oficiais de controle ou erradicação. O uso de testes laboratoriais tem sido essencial no controle e eliminação destas doenças.

CONCEITOS

“Gold Standard” – Teste-ouro - Teste de referência ou Teste definitivo

Um teste-ouro é um método ou combinação de métodos que determinam de maneira absoluta e sem erros, se o suíno está infectado ou doente. Para algumas doenças, o verdadeiro estado sanitário pode ser determinado somente pela necropsia e para outras não há teste-ouro. Em outros casos, o método perfeito não é prático ou é muito caro e trabalhoso, enquanto outros testes, mais econômicos são mais práticos e podem ser usados, porém são menos sensíveis e específicos. Para a Síndrome da Circovirose, por exemplo, não existe um teste – ouro e neste caso a histopatologia compatível de vários órgãos, associada à imunohistoquímica, pode ser usada para diagnóstico laboratorial. Para comércio internacional, recomenda-se o uso de testes prescritos pela OIE no Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Às vezes o teste - ouro é determinado pela comparação entre testes. Aquele com maior número de resultados positivos passa a ser o teste ouro. Pesquisadores compararam diferentes meios para isolamento de *Salmonella* à partir de fezes de suínos. A incubação no caldo Rappaport - Vassiliadis por 24 horas em combinação com o plaqueamento em ágar verde brilhante detectaram 88% dos isolamentos, comparado com o caldo selenito que detectou 51% . Neste caso, o primeiro seria considerado o teste ouro. PCR do nervo trigêmeo pode ser o teste de escolha para detecção do vírus da Doença de Aujeszky latente em suínos, por ser mais sensível. Culturas negativas de *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* de um suíno de rebanho sem sintomas e lesões seria mais confiável do que culturas negativas de um suíno pertencente a um rebanho infectado ou de um rebanho de estado sanitário desconhecido. Os usos de métodos estatísticos oferecem alternativas promissoras para obter sensibilidade e especificidade estimadas para doenças crônicas. Estes métodos tem sido aplicados na sorologia para *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 2, avaliação da precisão na detecção de lesões ao abate na Dinamarca e identificação do vírus da Peste Suína Clássica nas tonsilas.

Sensibilidade e especificidade

Numa curva de distribuição de resultados de um teste laboratorial, temos quatro categorias de reagentes:

- ✦ **Positivo verdadeiro:** Positivo ao teste e infectado
- ✦ **Falso negativo:** Negativo ao teste e infectado
- ✦ **Falso positivo:** Positivo ao teste e não infectado
- ✦ **Negativo verdadeiro:** Negativo ao teste e não infectado.

Sensibilidade

É a probabilidade do teste de identificar corretamente os suínos infectados, ou seja, os verdadeiramente positivos (positivos verdadeiros + falsos negativos). Por exemplo, um teste com 80% de sensibilidade identifica corretamente uma média de 80% de suínos infectados e incorretamente cerca de 20% dos suínos infectados (falsos negativos). O teste de Elisa é mais sensível para revelar anticorpos mais precocemente do que a soroneutralização, mas pode não ser o mais indicado, quando a prevalência é moderada ou alta e os suínos estão em diferentes estágios de infecção. A sensibilidade do PCR para *M. hyopneumoniae* no lavado traqueo-alveolar é da ordem de 87,1%, sendo capaz de detectar de 400 a 500 organismos por teste. No caso do *M. hyopneumoniae*, a sorologia é o método de triagem mais adequado para rebanhos infectados ou para avaliação da resposta vacinal. Três testes de Elisa são comumente usados: Tween 20, Elisas Idexx e Dako. Estudos recentes, usando soro de suínos infectados experimentalmente mostraram que todos apresentaram excelente especificidade no reconhecimento dos negativos e, portanto, poucos falsos positivos. Por outro lado, as sensibilidades dos testes variaram de 39 a 46%. Esta baixa sensibilidade resulta em um baixo valor preditivo e alta percentagem de resultados falsos negativos. Embora todos terem apresentado baixa sensibilidade, o Elisa DAKO foi o mais consistente na identificação dos suínos infectados. Todavia uma combinação de testes parece melhorar a habilidade preditiva dos testes, incluindo também observações clínicas e de lesões.

Especificidade

É a probabilidade do teste identificar corretamente os suínos não infectados: negativos verdadeiros (falsos positivos + negativos verdadeiros). Um teste com 90% de especificidade classificaria corretamente 90% dos suínos não infectados, em média, como negativos e ainda classificaria erradamente 10% dos suínos como infectados (falsos positivos), indicando possibilidade de reação cruzada com outros agentes relacionados. Em condições de campo, é altamente desejável testes com elevadas sensibilidade e especificidade no mesmo teste. Isto, no entanto, é pouco comum. Compradores de suínos e órgãos oficiais de importação desejam testes de quase 100% de sensibilidade para minimizar riscos de introdução de doenças. O mesmo raciocínio se aplica a testes para identificação de doenças de importância em saúde pública como *Salmonella*, *Trichinella* e resíduos de antibióticos. Tipicamente, multiplicadores de genética desejam testes de alta especificidade para maximizar sua chance de vender animais de reposição, varrões e leitoas. Alta especificidade é também desejável para produtores comerciais, participando de programas de erradicação, baseado em teste e sacrifício, onde as perdas econômicas resultantes de reações falsos positivas podem ser substanciais.

Seleção do ponto de corte – cut off

Trata-se do valor do resultado do teste selecionado para diferenciar entre resultados negativos e positivos. Pode incluir zona suspeita ou indeterminada. O ponto de corte é definido pelo teste usado. Este ponto poderá ser alterado em função do objetivo do teste (triagem x confirmação), custo relativo de resultados falsos positivos

ou falsos negativos, disponibilidade de testes confirmatórios de alta especificidade e a prevalência da doença. Dependendo da situação, um diagnóstico de falso positivo pode ser mais danoso do que um falso negativo e vice versa. Por exemplo, um veterinário confia nos resultados de um teste para tomar uma decisão sobre descarte de porcas. Provavelmente deseja minimizar a chance de diagnóstico falso positivo, usando um teste altamente específico, particularmente se a porca é assintomática e prenhe e não há outra razão para descarte. Por outro lado, quando se faz triagem de suínos de reprodução para introdução no rebanho, um resultado falso positivo seria menos danoso para um cliente do que um falso-negativo, que pode permitir suínos infectados entrar em rebanhos não infectados. O ideal seria que o veterinário tivesse a informação para escolher o *cut off* que melhor atenda sua necessidade, num dado momento. Uma possível solução seria ter dois *cut offs*, um valor 100% sensível (ausência de falsos negativos e outro 100% específico (ausência de falsos positivos). Estes *cut off* definem uma faixa intermediária de valor, onde falsos positivos e falsos negativos podem ocorrer. Usando esta estratégia, os resultados são reportados como negativos, se eles são menores do que o valor do *cut off*, que é 100% sensível, e positivos se os valores são maiores do que o valor do *cut off*, que é 100% específico e como suspeito ou indeterminado, se eles estão entre estes valores. Suspeito ou valor indeterminado pode ser esclarecido por testes adicionais, caso seja justificado.

Grau de confiança

Usado em muitas tabelas como 90 e 95%. É a certeza relativa que em uma população com uma dada prevalência, um teste irá detectar os animais realmente positivos e identificar corretamente o rebanho positivo em 90 ou 95% dos casos.

Prevalência

É a proporção estimada de animais infectados numa população num determinado tempo.

Incidência

Taxa de novas infecções estimadas em uma população susceptível num período de tempo definido.

Exatidão

Taxa de concordância entre o teste e o valor esperado para um padrão de referência de título conhecido.

Repetibilidade

Taxa de concordância de resultados entre repetições de uma amostra dentro e entre análises do mesmo teste em um dado laboratório.

Reprodutibilidade

Habilidade do teste de fornecer resultados consistentes, quando a alíquota da mesma amostra é testada entre laboratórios.

MONITORAMENTO SOROLÓGICO

As provas sorológicas têm sido usadas com muita frequência em vários países. A razão desta popularidade é que as amostras de sangue são facilmente colhidas e as provas de laboratório podem liberar resultados rapidamente. O papel do médico veterinário e do profissional ligado a produção suína têm mudado rapidamente e o mesmo tem ocorrido com a indústria suína. Neste contexto, torna-se cada vez mais importante a ênfase no controle e prevenção de doenças, diferentemente do enfoque tradicional, que contemplava identificação e tratamento de doentes. A sorologia em suinocultura ainda é subutilizada. É essencial estar em contato com o laboratório de diagnóstico, pois este pode auxiliar e recomendar os testes mais adequados a serem aplicados em diferentes situações. Os tipos de testes e para quais doenças testar deverão ser definidos em conjunto com a empresa ou granja, dependendo dos objetivos e características das mesmas. Para tal, é importante estar familiarizado e conhecer as vantagens e desvantagens de cada teste, os testes oficiais e teste-ouro. Outro fator essencial no sucesso do programa sorológico é a amostragem. Selecionar os animais e a faixa etária irá depender do objetivo do programa. Pode-se utilizar a monitoria em animais de quarentena ou em granjas, por faixa etária (gestação, maternidade, creche, recria e terminação) e esta sorologia pode ser de corte/ seccionada ou seqüencial. Atualmente, existem diversos métodos sorológicos para diferentes doenças respiratórias, entéricas, sistêmicas, que devem ser analisados junto com os monitoramentos clínico, de produtividade e de abate, fornecendo dados fundamentais para conclusão do diagnóstico. É um método de rebanho, que nos possibilita um retrato fidedigno da situação sanitária atual de um plantel e estabelecimento de um banco de dados sobre a granja. Quando utilizado para diagnóstico, principalmente em quarentenas, pode prevenir a entrada de agentes infecciosos indesejáveis.

INFLUENZA SUINA A

A influenza suína, é um patógeno muito significativo para a indústria suína. Desde sua introdução em 2009, o H1N1 pandêmico tem sido repetidamente transmitido de humanos para suínos. No Brasil, diferentes subtipos tem sido relatados, embora poucos trabalhos de isolamento e caracterização dos vírus circulantes tem sido realizados. Os exames de PCR e imunistoquímica frequentemente utilizados no diagnóstico diferencial do complexo das doenças respiratórias, muitas vezes não realizados, subestima o número de casos no Brasil. Por outro lado, a grande diversidade genética das amostras deste vírus,

tem limitado o uso de vacinas disponíveis no mercado. Mundialmente, o uso de programas com vacinas, especialmente autógenas, contendo as amostras circulantes, tem sido realizado, em diferentes programas, para fêmeas ou leitões, dependendo do quadro clínico, com resultados promissores.

SALMONELOSE AVIARIA

A salmonelose é uma das doenças bacterianas de maior impacto na suinocultura, haja visto que pode participar tanto dos problemas respiratórios quanto entéricos e quadros de morte súbita.

CONCLUSOES

O modelo industrial de produção de suínos não deverá seguir o mesmo para os próximos anos. A indústria de suínos precisará se reinventar, visando a produção de carne de alta qualidade, em ambiente e instalações satisfatórios, seguindo os padrões de comportamento animal. Programas preventivos baseados na identificação dos problemas e orientados para a saúde do rebanho serão a chave para o sucesso. A grande pergunta que nos faz refletir é por que os vírus antigos de repente se tornaram tão importantes, como o caso do PCV2, Senecavírus ? Porque se tornaram tão patogênicos para a espécie suína? E o porque da reemergência dos vírus nas últimas décadas? Mais uma vez temos que estar preparados tecnicamente para enfrentar os desafios que poderão vir pela frente. Hoje o Brasil, ainda é livre de alguns destes vírus, porém a manutenção do status de livre depende de trabalhos fortes em biossegurança, com protocolos rígidos de entrada de animais de fora do país, com controle de trânsito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

15.OIE standard commission. (2000) . Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines, 4 th eEdn., OIE Publication .PP : 446 – 456.

17.Code of Federal Regulations, Title 9, Government Printing Office, Washington, DC , 2003.

23. Culberton Jr R, Osburn BI (1980) The biologic effects of bacterial endotoxin: a short review. *Veterinary Scientific Communications* 4, 3-14

24.European Pharmacopoeia (1997) *European Pharmacopoeia*, 3rd edn. Council of Europ