



Uso de perfis sorológicos e bacteriológicos em suinocultura

Serological and bacteriological profiles in pig production

David Emilio Santos Neves Barcellos¹, Brenda Maria Ferreira Passos Prado Marques¹,
Tiago José Mores¹, Franciele Centenaro¹ & Jurij Sobestiansky²

INTRODUÇÃO

Na produção industrial de suínos, as doenças podem ser responsáveis por uma série de prejuízos, como redução da eficiência da conversão alimentar, baixo ganho de peso diário, ineficiência reprodutiva, condenações ao abate, elevados custos com medicamentos e vacinação, além de representarem riscos para a saúde pública. As enfermidades, no entanto, nem sempre cursam com sintomatologia típica, problemas subclínicos ou aqueles que se manifestam unicamente pela piora de variáveis produtivas podem, muitas vezes, serem os mais relevantes. Dessa forma, são muito importantes na suinocultura ferramentas de diagnóstico e monitoria, que permitam conhecer o *status* sanitário não apenas das enfermidades que se manifestam clinicamente, mas também das infecções subclínicas.

A definição do perfil sanitário de uma granja pode ser obtida pela avaliação clínica dos animais, frequência da ocorrência de lesões em abatedouros, interpretação dos resultados de exames laboratoriais e análise das informações que constam dos relatórios informatizados de índices. O conhecimento preciso dos perfis sanitários é um dos componentes capazes de garantir que a produção não sofra influência negativa das doenças, assegurar bons índices produtivos e segurança alimentar ao consumidor [6].

Uma das mais importantes fontes de informações para obtenção de dados sobre a situação da saúde dos suínos é através das monitorias sanitárias. Dentre essas, destaca-se a monitoria laboratorial, onde se inclui o uso de testes sorológicos e bacteriológicos. Na presente revisão serão analisados os principais métodos de monitorias sorológicas e bacteriológicas e a sua aplicação à sanidade e produção de suínos.

MONITORIA SOROLÓGICA

A monitoria sorológica por meio de amostragem estratificada ou longitudinal pode ser útil para estabelecer a dinâmica dos patógenos circulantes, de acordo com o fluxo dos animais nos vários estágios da produção. Testes sorológicos são utilizados para a detecção de anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro em resposta a infecções virais ou bacterianas. Através da demonstração da presença de anticorpos ou de alterações em seus níveis, podem ser obtidas informações quanto ao estado imunológico do (s) animal (is) [1].

A detecção de anticorpos é a melhor opção para diagnosticar uma infecção prévia, uma vez que o agente infeccioso tende a ser eliminado com a evolução do quadro; apenas anticorpos permanecem e servem como prova de que a infecção ocorreu. Logo, podemos dizer, que a sorologia representa um método indireto para o diagnóstico de infecções [8]. Essa técnica é usada frequentemente para o diagnóstico de infecções por vírus, uma vez que o isolamento viral geralmente é difícil, além de não ser amplamente disponível.

Muitos patógenos dos suínos podem ser diagnosticados por vários testes, entretanto, devido ao custo, acurácia e praticidade, há testes específicos que são considerados como os mais eficientes, denominados “padrão-ouro”. O Quadro 1 apresenta os testes laboratoriais que são utilizados rotineiramente para diagnosticar as principais doenças dos suínos.

¹ Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil. ²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO/Brasil. CORRESPONDÊNCIA: D.E.S.N. Barcellos [davidbarcellos@terra.com.br].

Quadro 1. Diagnóstico laboratorial das principais doenças dos suínos.

DOENÇA	Idade	Monitoria clínica	Abate	Bacteriológico	Sorológico/Viroológico	Histo-patológico	Parasitológico	Molecular (DNA)	Outros
Aujesky	REP				SN, ELISA, Aglut látex			PCR	
Brucelose	REP				SAR, SAL, Card, 2ME				
Eperitrozoose	REP				IHA		Microscopia		
Infecção urinária	REP	X	X	X					Exame urina
Leptospirose	REP			IFD	Microaglutinação			PCR	
Parvovirose	REP				HI (IFD)			PCR	
PRRS	REP				IFI, ELISA				Bioensaio
Toxoplasmose	REP				IFI, ELISA, HI				
Citomegalovirus	C	X				X			
RA - Bordetella	C-R	X	X	Isolamento	Soroaglutinação tubo			PCR	
RA - PM tipo D	C-R	X	X	Isolamento	Soroneutralização			PCR ToxA	
Glässer	C-R-T		X	Isolamento				PCR	
Influenza (gripe)	PL				HI, ELISA				
Pleuropneumonia	R-T		X	Isolamento	ELISA, IHQ	X		PCR	
PM tipo A	R-T		X	Isolamento		X		PCR	Inoculação
Pneum. enzoótica	C-R-T	X	X	IP, IF	ELISA	X		PCR	
Coronavírus	PL				SN, IP			PCR	
Criptosporidiose	L_MAT					X		Exame de fezes	
Disenteria/Colite	C-R-T			Isolamento		X		PCR, PCR/RFLP	
EPS	C-R-T		X		IFI, IHQ	X		PCR	
Rotavirose	L_MAT				PAGE			PCR	

Quadro 1 (continuação)

DOENÇA	Idade	Monitoria clínica	Abate	Bacteriológico	Sorológico/Viroológico	Histo-patológico	Parasitológico	Molecular (DNA)	Outros
Salmonelose	R-T			Isolamento	ELISA			PCR	
Úlcera gástrica	R-T	X							
Erisipela	PL			Isolamento					
PSC	PL				IFD, SN, ELISA	X		PCR	
Aftosa	PL				ELISA, Isolamento				
<i>Streptococcus suis</i>	C-R-T			Isolamento	Tipagem/ coaglutinação	X			
Tuberculose	REP -T		X					PCR	Tuberculina
Coccidiose	L_MAT					X		Exame de fezes	
Piolho	PL							Microscopia	
Sarna	PL	X						Microscopia	
Verminoses	PL							Exame de fezes	

C = creche, R = recria, T = terminação, L_MAT = leitões na maternidade, PL = plantel.

RA = rinite atrófica, PM = *Pasteurella multocida*, PSC = peste suína clássica, PSA = peste suína africana, SRRS = síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos. ELISA = ensaio imunoenzimático, FC = fixação de complemento, HI = inibição da hemoaglutinação, IFD = imunofluorescência direta, IFI = imunofluorescência indireta, IHA = hemoaglutinação indireta, IP = imunoperoxidase, PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida, PCR = reação em cadeia da polimerase, RFLP = polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, SAR = soroaaglutinação rápida, SAL = soroaaglutinação lenta, SN = soroneutralização, 2ME = 2 mercaptoetanol.

Idealmente, todos os testes para o diagnóstico das doenças dos animais deveriam ser rápidos, precisos e com a melhor relação custo-benefício. Nem todos possuem estas características e cada teste deve ser avaliado de acordo com o objetivo do seu uso. No sentido de realizar um adequado perfil sorológico, deve-se ter os objetivos definidos e a informação de quais patógenos podem estar presentes antes da amostragem. Um bom diagnóstico da situação sanitária da granja pode dar um indicativo para auxiliar a definição das coletas, como grupos etários, setores do plantel ou o melhor momento para obter os materiais. Também, deve ser conhecido o estágio da doença, se é aguda ou crônica, no sentido de utilizar os testes apropriados [3].

Através da sorologia pode-se determinar o perfil sorológico de um rebanho. A partir daí, pode-se avaliar se o mesmo esteve exposto a algum agente infeccioso, determinar o momento em que ocorreu a infecção, ou em que fase do ciclo do plantel cada agente infeccioso está circulando. Deve-se levar em consideração o fato de que certas infecções são subclínicas, daí que o conhecimento dos perfis sorológicos pode ser uma forma de reconhecer a sua presença.

A monitoria sorológica quando realizada em populações com doenças endêmicas ajuda a selecionar e definir as formas de uso das estratégias de controle que são usadas para reduzir o impacto da ocorrência do agente na população afetada. Em rebanhos de alto nível sanitário, o monitoramento sorológico é uma ferramenta valiosa de vigilância epidemiológica, que em conjunto com a biossegurança, pode ajudar a prevenir o ingresso de agentes infecciosos em plantéis livres.

Perfil sorológico como ferramenta de controle sanitário tem sido usado com diferente frequência nos países com suinocultura evoluída, mas, de maneira geral, ainda tem sido subutilizados. Atualmente, existem métodos sorológicos para diferentes doenças (respiratórias, entéricas, sistêmicas, etc...) que devem ser analisados juntamente com monitorias clínicas, de dados produtivos e de abate, fornecendo uma base sólida para uma definição diagnóstica [1].

1. Usos da sorologia em suinocultura

Os principais usos para a monitoria sorológica na suinocultura são:

- Identificar agentes patogênicos responsáveis por mortalidade e mau desempenho produtivo;
- Determinar a distribuição da doença nos vários grupos etários;
- Determinar a prevalência e/ ou incidência de doenças;
- Avaliar programas de vacinação;
- Definir o melhor momento para a aplicação de vacinas;
- Monitorar o *status* sanitário de animais em quarentena;
- Avaliar o progresso ou sucesso de programas de controle ou erradicação;
- Monitorar periodicamente granjas GRSC como parte do programa de certificação.

2. Considerações e alguns conceitos para interpretação de testes sorológicos

A base da sorologia é o sistema imune. Em resposta a uma infecção, o organismo reconhece o material (antígeno) como sendo estranho e produz anticorpos para ajudar a combater a doença.

O uso efetivo da sorologia em rebanhos suínos é complicado e requer o entendimento básico da resposta imune, tipos de testes sorológicos, sensibilidade e especificidade, características epidemiológicas da infecção pelos agentes que infectam os suínos e alguns conceitos de estatística. Os pontos a seguir, que servem como base para a definição de princípios básicos para a interpretação de testes de monitoria sorológica, foram adaptados de Stevenson [8]:

- Os testes sorológicos medem somente a resposta humoral (anticorpos circulantes) e não, a resposta imune celular;
- Os anticorpos circulantes primários são de duas classes principais: IgG e IgM. Anticorpos IgM aparecem primeiramente, atingem o pico mais precocemente e desaparecem relativamente rápido. Já as IgG aparecem mais tarde, aumentam lentamente e permanecem por longo tempo no soro e, dessa forma, devem ser escolhidas para análise em infecções de longo curso;

- A primeira exposição ao antígeno após vacinação ou infecção resulta em uma resposta primária. Todas as exposições subsequentes ao antígeno, resultam em uma marcada resposta secundária, mais rápida e mais duradoura. Assim, títulos relativamente altos que detectam inicialmente IgM sugerem infecção recente ou vacinação. Devido à longa duração da IgG, o mesmo não é necessariamente verdadeiro para testes que detectem altos títulos de IgG;
- Nem todos os testes sorológicos medem igualmente IgM e IgG (Tabela 1). Por isso, na decisão sobre o exame a ser usado e sua interpretação, é necessário que seja conhecido o tipo de resposta imune mais importante na defesa para cada infecção e o tempo para aparecimento e duração da resposta imune humoral para as duas principais imunoglobulinas presentes nesse tipo de resposta nos suínos (IgM e IgG);
- Numa população, há uma variação biológica na intensidade da resposta imune humoral entre os indivíduos (por ex. o título máximo para um idêntico estímulo antigênico poderá diferir entre indivíduos);
- A sensibilidade de um teste pode ser definida como a eficiência em identificar animais verdadeiramente infectados como “positivos”. Especificidade é a probabilidade do teste identificar um animal verdadeiramente não infectado como “negativo”. Um teste 100% sensível não apresentaria falso-negativos e um teste 100% específico não apresentaria falso-positivos. Infelizmente, não há testes 100% sensíveis nem 100% específicos. Muitas vezes, na medida em que aumentamos a sensibilidade, podemos perder em especificidade e vice-versa;

Tabela 1. Eficiência de alguns testes sorológicos na detecção dos anticorpos IgM e IgG.

Teste	Tipo de anticorpo	
	IgM	IgG
Aglutinação	+++	+
Fixação do complemento	+++	+
Neutralização viral	++	+
Precipitação	+	+++
HI	+	+
ELISA**	+	+
IFA**	+	+

HI: inibição da hemaglutinação, ELISA: ensaio imunoenzimático, IFA: imunofluorescência,

**O teste pode ser configurado para detectar um ou ambas as classes de anticorpos.

- Em geral, a sensibilidade é um aspecto importante quando se deseja eliminar uma doença de um plantel ou impedir a sua entrada;
- A especificidade é relevante no caso do primeiro diagnóstico de uma doença até então considerada ausente na granja ou região. Outra aplicação seria para a decisão sobre o sacrifício ou não de animais valiosos ou para doenças cujo controle demande alto investimento [1];
- Um teste positivo detecta anticorpos específicos e pode sugerir diferentes situações: infecção prévia ou recente, vacinação prévia, reações inespecíficas ou reações cruzadas com antígenos similares (falsos positivos);
- Um teste negativo significa a ausência de anticorpos ou título abaixo do nível de detecção em função da baixa sensibilidade do teste. Assim, um teste negativo nem sempre indica ausência de infecção ou de infecção prévia. Animais recentemente infectados podem ser soronegativos, pois ainda não houve tempo para a soroconversão. Adicionalmente, para cada tipo de infecção um tempo variável entre infecção e a possibilidade de detecção das imunoglobulinas nos testes sorológicos pode ocorrer. Por exemplo, usando o teste de ELISA IDEXX para PRRS, a soroconversão pode ser detectada 9 dias após a infecção. Usando o teste ELISA Tween 20 para *M. hyopneumoniae*, seria necessário que a infecção tivesse ocorrido pelo menos 2-3 semanas antes da coleta do soro;

- A sorologia não permite diferenciar entre animais infectados com sinais clínicos, portadores que tiveram anteriormente a infecção e animais curados. Em alguns casos, animais portadores sadios podem não apresentar níveis detectáveis de anticorpos contra alguns agentes. Por exemplo, em animais infectados com o vírus da Doença de Aujeszky e outros herpesvírus, pode ocorrer o fenômeno de latência e, após o declínio dos anticorpos circulantes, os animais podem tornar-se novamente soronegativos. Infecções intra-uterinas por alguns agentes como o vírus da Peste Suína Clássica, podem levar ao aparecimento de animais imunotolerantes, que não apresentam resposta imune após a estimulação antigênica específica. Recentemente, foi sugerido que situação similar poderia acontecer na infecção pelo Circovírus.
- O *status* de vacinação da granja precisa ser conhecido antes da realização de exames laboratoriais. Com poucas exceções, perfis sorológicos são incapazes de diferenciar entre títulos vacinais e os induzidos por infecção natural. Títulos vacinais geralmente não são tão elevados quanto os gerados após infecção natural, mas isso nem sempre é verdadeiro. Portanto, é imperativo conhecer o histórico de vacinação para poder interpretar adequadamente um perfil sorológico;
- Deve ser selecionado um teste adequado para cada agente, pois nem todas as provas sorológicas são capazes de detectar anticorpos vacinais, ou nem todas as vacinas são capazes de induzir títulos detectáveis por determinadas provas. Por exemplo, o teste ELISA DAKO emprega um anticorpo monoclonal que é direcionado contra um epítipo exclusivo para o *Mycoplasma (M) hyopneumoniae*, sendo capaz de detectar anticorpos contra amostras de campo da bactéria e não de outros micoplasmas não patogênicos (como o *M. flocculare*). Infelizmente, algumas vacinas contra *M. hyopneumoniae* apresentam baixa conversão sorológica para o epítipo usado no teste DAKO. Isso significa que os exames podem dar resultados negativos em muitos animais vacinados e, dessa forma, não devem ser usados para avaliar a soroconversão após a vacinação;
- Em casos de surtos, a sorologia nem sempre oferece uma resposta confiável, uma vez que os animais podem não ter desenvolvido imunidade até o momento da coleta. De outra parte, podem apresentar resultados positivos para um agente que não é o causador do surto, induzindo a uma interpretação errada do teste sorológico.

3. Determinação da amostra

Para planejar qualquer tipo de monitoria, a escolha do tamanho da amostra é um fator fundamental. Para obter uma amostra representativa, alguns pontos devem ser seguidos na coleta e armazenamento das amostras:

- número adequado de animais amostrados;
- coleta apropriada das amostras;
- correta identificação dos animais testados;
- boa manutenção dos registros;
- bom manejo da coagulação do sangue e coleta do soro, conservação adequada das amostras durante o transporte e até os exames laboratoriais. Uma revisão detalhada sobre procedimentos para coleta e remessa de materiais consta em Sobestiansky *et al.* [7].

Uma norma geral para a amostragem é a de que para obter uma informação confiável é necessário analisar um número significativo de materiais. Para isso, deve ser usada uma tabela estatística de amostragem, que leve em consideração o tamanho da população a ser estudada, a prevalência estimada e o intervalo de confiança desejado (em geral são usados 95 ou 99%). A prevalência estimada representa a porcentagem esperada de animais com sinais clínicos dentro de uma população infectada. O clínico geralmente encontra dificuldade em definir esse valor para as diferentes doenças dos suínos, nesse caso a informação pode ser obtida a partir de dados de literatura. O Quadro 2 é um modelo que pode ser adotado para definir o número de animais a serem incluídos numa monitoria sanitária. Por exemplo, usando essa tabela para amostrar animais usando a sorologia para pneumonia enzoótica e partindo de um lote com aproximadamente 200 suínos, 27 pulmões seriam suficientes para detectar um pulmão positivo sob uma prevalência estimada de 10% (com 95% de confiança) [1].

Quadro 2. Modelo para determinação do número amostral a partir da prevalência estimada, nível de confiança e tamanho do rebanho.

Tam	Taxa de prevalência estimada %																	
	1			5			10			25			50			75		
Reb	Níveis de confiança %																	
	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	7	8	3	4	5	2	3	4
20	20	20	20	19	20	20	14	16	18	7	9	11	4	5	6	2	3	4
30	30	30	30	24	26	29	16	19	23	8	9	13	4	5	7	2	3	4
40	40	40	40	28	31	36	17	21	27	8	10	14	4	5	7	2	3	4
50	50	50	50	30	35	42	18	22	29	8	10	14	4	5	7	2	3	4
60	59	60	60	32	38	47	19	23	31	8	10	15	4	5	7	2	3	4
70	68	70	70	34	40	51	19	24	33	8	10	15	4	5	7	2	3	4
80	76	79	80	35	42	54	20	24	34	8	10	15	4	5	7	2	3	4
90	84	87	90	36	43	57	20	25	35	8	10	15	4	5	7	2	3	4
100	91	96	100	37	45	59	20	25	36	8	10	15	4	5	7	2	3	4
150	118	130	143	39	49	68	21	26	38	8	11	16	4	5	7	2	3	4
200	137	155	180	41	51	73	21	27	40	8	11	16	4	5	7	2	3	4
250	151	175	210	42	53	76	21	27	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
300	161	189	235	42	54	78	22	28	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
400	175	211	273	43	55	81	22	28	42	8	11	16	4	5	7	2	3	4
700	196	243	336	44	57	85	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
1000	205	258	368	44	57	86	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
Inf	229	298	458	45	59	90	22	28	44	9	11	17	4	5	7	2	3	4

Tam Reb= tamanho do rebanho, Inf= infinito.

Fonte: Adaptado de [2].

3.1 Tipos de amostragem

Em estudos seriados de prevalência, para se estabelecer o perfil sorológico de um determinado rebanho, deve-se optar por testes de baixo custo, pois o número de animais amostrados poderá ser grande. De acordo com Reis & Reis [5] e Janisko [3], para a obtenção de um perfil sorológico de um plantel, dois tipos de estudos observacionais podem ser realizados:

Estudo de Cohort (longitudinal, sequencial): consiste em acompanhar um grupo específico de animais repetindo a amostragem em diferentes datas sucessivas (a cada três a quatro semanas), para obter informações sobre a dinâmica do sistema imune com o passar do tempo (na medida em que o animal cresce). Esse tipo de amostragem é a ideal para avaliação de programas de vacinação implementados em granjas e para estudos da evolução das doenças no rebanho. Recomenda-se uma amostragem de 10 a 20 animais por grupo etário. A presença de uma soroconversão ou aumento de título de anticorpos na ordem de 4 ou mais diluições é altamente indicativa de infecção recente. Este tipo de estudo representa a melhor alternativa para a monitoria sorológica.

Estudo transversal (de corte, seccionado): consiste em amostrar uma granja num determinado momento. São sorologias pontuais, simultaneamente executadas, em diferentes animais em diversas faixas etárias. Em geral, são coletados materiais de 10 a 15 animais por faixa etária. Estudos transversais podem ser utilizados em uma avaliação inicial de granjas desconhecidas ou para monitoria de granjas novas. A partir dessa análise pode-se

conhecer a prevalência de doenças (aguda e/ou crônica) que estejam se manifestando no plantel. No entanto, não pode ser determinado o momento da infecção ou a evolução sorológica através do tempo. No caso de se optar por coletar amostras de animais de diferentes idades no mesmo dia deve-se considerar que cada grupo etário ou mesmo cada prédio da granja pode representar uma população individual dentro do plantel, dificultando ou inviabilizando a interpretação dos resultados dos exames obtidos.

A maioria das doenças requer pelo menos 2 amostragens (sorologia pareada) no sentido de avaliar as mudanças nos títulos de anticorpos. Tem como objetivo o diagnóstico de doença recente, através de duas sorologias em sequência. Se apenas uma amostra individual de soro for testada e for encontrado resultado sorológico positivo, não é possível determinar se os anticorpos são devidos a infecções recentes ou antigas. Porém, quando duas amostras de soro do mesmo animal são examinadas, sendo a primeira colhida durante o evento clínico agudo (abortamento por leptospirose, por exemplo) e a segunda, 7 a 21 dias após e os resultados mostrarem uma elevação do título superior a quatro vezes, conclui-se pelo diagnóstico da doença. Recomenda-se que ambas as amostras sejam testadas, no mesmo dia, no mesmo laboratório, especialmente se o teste não for automatizado. Isto se aplica a doenças agudas, em casos de abortos ou surtos respiratórios recentes [5].

4. Técnicas sorológicas e interpretação para as principais enfermidades

Para interpretar os diferentes testes laboratoriais, é necessário que sejam conhecidos os limites que indicam a significância dos valores numéricos em relação ao início das manifestações clínicas. Segue abaixo, uma seleção de algumas doenças importantes para a suinocultura brasileira e os valores que são indicados para a interpretação das provas laboratoriais de monitoria ou diagnóstico. Estas informações foram adaptadas de Reis & Reis [5].

4.1 Leptospirose

O teste padrão-ouro é o da Microaglutinação (MAT). Este teste detecta anticorpos IgG, que se formam no início da infecção. A prova é realizada com antígenos representativos de 6 a 12 entre os sorovares mais comuns para a espécie. Considerando a prevalência de 10% da doença no rebanho, o número mínimo a ser testado é de 29 animais, independente do tamanho do rebanho. Os resultados e interpretação são analisados da seguinte forma:

Animais vacinados:

Adultos: duas a três semanas após a vacinação, os títulos variam entre 1:100 a 1:400. Não existe correlação entre os títulos e a proteção produzida pela vacina.

Leitões que não mamaram o colostro e fetos abortados e natimortos: um resultado sorológico negativo não descarta a leptospirose como causa do problema reprodutivo. Deve-se testar o fluido torácico ou o soro de fetos ou natimortos. Os títulos sorológicos no soro ou fluidos podem oscilar entre 1:25 (para a sorovar Bratislava) até 1:100 (para as demais sorovares) e são bastante úteis para confirmar o diagnóstico de campo.

Animais não vacinados:

a) Títulos de 1:100 - Significação duvidosa, possivelmente títulos residuais, porém existem casos confirmados de aborto com este título; b) 1:200 - 1:400: Interpretação difícil. Deve-se retestar com outra amostra colhida 10 a 20 dias mais tarde; c) 1:800 ou superior: Possivelmente indica infecção recente. Porcas que acabam de abortar podem ter títulos superiores ou iguais a 1:3200.

4.2 Parvovirose

O teste mais usado é a Inibição da hemaglutinação (HI). Para interpretação, usa-se o seguinte critério:

Animais vacinados - duas semanas após a vacinação, os títulos geralmente variam de 1:40 a 1:320. Títulos vacinais caem a níveis não detectáveis dentro de três a quatro meses, na maioria dos casos.

Animais não vacinados - suínos com menos de seis meses: os títulos de anticorpos passivamente adquiridos podem alcançar valores altos logo após o parto (p. ex., 1:5120). Estes declinam a taxas baixas (não detectáveis) aos três a oito meses de idade, na maioria dos casos. Para animais de reprodução, dentro de uma semana pós-exposição, os títulos podem alcançar valores altos (p. ex., 1:10.000). Após duas semanas, a variação dos valores para porcas previamente expostas em rebanhos endemicamente infectados é de 1:320 a > 1:2560.

4.3 Pneumonia enzoótica

Quatro tipos de testes de ELISA são utilizados rotineiramente para detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*. Dois são do tipo indireto: Tween-20 e o "Herd Chek *Mycoplasma*", Idexx. Os outros dois, são testes

de ELISA de competição (Dako e Hypra). Em estudos realizados por Thacker [9], testes com os Kits Tween-20, "Herd Chek *Mycoplasma*" e Dako apresentaram alta especificidade, mas baixa sensibilidade (entre 37 a 49%). Com o uso desses testes praticamente não foram detectados falsos positivos, mas ocorreram frequentes falsos negativos.

A baixa sensibilidade pode ser atribuída ao fato de que o organismo coloniza os cílios da traquéia, resultando numa interação mínima com o sistema imune e numa variada indução da produção de anticorpos. Além disso, o *M. hyopneumoniae* é reconhecidamente capaz de variar suas proteínas antigênicas de superfície, o que também leva a uma variação da resposta imune [11].

Os níveis de anticorpos presentes após a vacinação com vacinas anti *M. hyopneumoniae* variam em função do tipo de vacina que for usada, do nível de infecção presente no animal e do teste sorológico usado para medir a resposta imune. Não existe correlação entre os níveis de anticorpos e a colonização dos cílios pelo *M. hyopneumoniae* ou a proteção induzida pela vacinação [10].

As características e resultados recomendados para cada tipo de teste para medir a resposta imune frente à infecção pelo *M. hyopneumoniae* são:

ELISA indireto: teste policlonal, que pode ser usado tanto no diagnóstico da doença quanto em programas de monitoramento de vacinas. O teste classifica a positividade da amostra, cujo ponto de corte¹ é 0,4, e correlaciona o título da amostra com a quantidade de anticorpos presentes na amostra. Animais suspeitos devem ser retestados após duas a quatro semanas.

Para interpretação, são usados os seguintes critérios: **Animais vacinados:** duas semanas após a segunda vacinação, as razões s/p² encontradas variam de 0,4 a 1,6. **Animais não vacinados:** a soroconversão começa ao redor de duas a três semanas após a exposição. Razões s/p < 0,3 são consideradas negativas, entre 0,3 a 0,4 suspeitas e > 0,4 positivas. Pode haver reações cruzadas com o *Mycoplasma flocculare*.

ELISA de competição ou bloqueio: os dois testes desse tipo disponíveis tem boa especificidade. Os anticorpos utilizados nos kits são monoclonais, contra o epítipo da proteína 74Kd do *M. hyopneumoniae*. Para interpretação, são usados os seguintes critérios:

No *Kit Dako*, as amostras são testadas em duplicata e os resultados são liberados na forma de percentagem de inibição, sendo as amostras com % de inibição < 50% classificadas como positivas, aquelas entre 50 e 65% suspeitas e maiores que 65% são negativas. O *Kit Hypra* interpreta as amostras entre zero a 40% como sendo negativas, 40 a 50% como sendo duvidosas e maiores que 50% como positivas. Para ambos os testes, as amostras suspeitas devem ser retestadas após duas a quatro semanas.

4.4 Pleuropneumonia suína

O teste usado para o diagnóstico sorológico é o ELISA. Existem três tipos de teste. No primeiro, o antígeno alvo é a toxina Apx IV. Todos os animais infectados contra qualquer sorotipo de App podem produzir anticorpos contra esta toxina. Constitui uma ferramenta valiosa na detecção de animais infectados contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), não ocorrendo reação cruzada com animais vacinados. Para interpretação, são usados os seguintes critérios: < 30% = negativo; entre 30-40% = suspeito; 40% = positivo.

O segundo teste de ELISA detecta o antígeno APX I (presentes nos sorotipos 1, 5, 9, 10 e 11) e Tbp2 (proteínas ligantes da transferrina - presente em todos os sorotipos). É um teste indireto e detecta anticorpos entre 8 e 21 dias após a infecção, dependendo do sorotipo utilizado. É um teste que detecta anticorpos produzidos contra estas toxinas e não identifica os sorotipos envolvidos (não é sorotipo específico), além de ocorrer reações cruzadas com o *Actinobacillus suis*. Para interpretação, são usados os seguintes critérios:

Negativo: IR³ < 20%; Positivo Grupo 1: IR entre 20 a 60% (interpretando como infectados pelos sorotipos menos patogênicos): 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 12; Positivo Grupo 2: IR > 60% (interpretado como infectado pelos sorotipos mais patogênicos): 1, 5, 9, 10 e 11.

O terceiro é o teste ELISA que detecta a cápsula polissacarídeo/específica. O antígeno impregnado é um antígeno lipopolissacarídeo purificado do App por extração fenólica. Os soros são testados em duplicata. Existem

¹ Trata-se do valor do resultado do teste selecionado para diferenciar entre resultados negativos e positivos.

² A razão s/p é determinada pelo valor de densidade ótica da amostra (s=sample) dividida pelo valor da densidade ótica do controle positivo (p=positive).

³ IR = *Intermediate range*. Determinado pelos valores do ponto de corte a 95% de sensibilidade e 95% de especificidade.

atualmente 6 kits diferentes, que são agrupados em razão de reações cruzadas que podem ocorrer entre eles, sendo os seguintes: a) App 4 e 7; b) App 5a e 5b; c) App 3, 6, 8; d) App 1, 9, 11, 2; e) App 10 e 12. A desvantagem é que é um teste de elevado custo, sendo necessários vários testes até que se identifique o sorotipo responsável pela doença ou infecção no rebanho. Para interpretação, são usados os seguintes critérios: OD (densidade óptica) < 0,29 = negativo; OD entre 0,30 e 0,39 = suspeito; OD > 0,40 = positivo.

MONITORIA BACTERIOLÓGICA

1. Perfis bacteriológicos

Foi proposta uma forma de exame bacteriológico de plantéis suínos que consiste da coleta sistematizada de suabes retais, nasais e vaginais de animais de diferentes idades e a realização de exames bacteriológicos nos mesmos [4]. Os resultados são tabulados e usados na forma de “perfis bacteriológicos”.

A amostragem é feita pela tomada de suabes retais de porcas (na semana antes do parto, na semana após o parto e uma semana antes do desmame), leitões (de quatro leitegadas ao acaso, com 0-10 dias e 10-21 dias), leitões desmamados (uma semana após o desmame) e leitões na fase de crescimento (12-16 semanas de idade). São também coletados suabes vaginais de porcas no intervalo desmame-estro, na fase intermediária de gestação e na semana antes do parto e suabes nasais de leitões com 8-14 semanas de idade. O número de animais amostrado em cada fase é variável, com um número máximo de 10 suabes por grupo, sendo que uma análise típica envolve 80 a 90 suabes por granja.

No laboratório, é pesquisada uma seleção das principais bactérias patogênicas para suínos. Com esse procedimento, podem ser diagnosticados os principais agentes presentes no plantel, numa forma de “check up” bacteriológico. Os resultados permitem identificar agentes potencialmente patogênicos e que estejam presentes mesmo numa forma subclínica. Adicionalmente, as bactérias isoladas podem ser monitoradas quanto ao seu padrão de resistência antimicrobiana.

Modernamente, com a disponibilização de exames mais sensíveis e rápidos (como PCR e qPCR), esse tipo de alternativa deve novamente ser considerada, pois possui um bom potencial de uso para monitorar a situação sanitária dos plantéis, principalmente por detectar infecções subclínicas e permitir a identificação dos tipos de agentes patogênicos presentes em suabes retais e nasais nos plantéis investigados. A restrição maior seria o custo, mas a massificação da realização de exames moleculares e a consequente redução dos preços pela escala de uso poderão justificar a sua realização.

2. Monitoria bacteriológica do ambiente

Após a realização de programas de limpeza e desinfecção, ou mesmo durante o período de ocupação com animais, pode ser realizado um exame bacteriológico do ar do interior dos prédios como indicador do nível de poluição bacteriana do ar. A utilidade do processo é limitada, uma vez que os níveis bacterianos do ar são muito influenciados pela taxa de renovação do ar, que por sua vez depende de vários fatores como abertura das cortinas, lotação das instalações, umidade do ar, velocidade do ar externo, altura do pé direito, etc... Como muitas dessas variáveis variam continuamente, fica difícil standardizar condições para a coleta, de modo a poder comparar resultados obtidos em diferentes exames e estabelecer parâmetros realmente representativos para avaliação dos resultados.

Caso seja decidida a monitoria, podem ser usados diferentes sistemas, como:

A) Exposição de placas abertas: usar 30 placas por granja, a cada 60 dias. Expor por 15 minutos, 3 placas em pontos diferentes das maternidades e creche. A análise dos resultados é feita pela contagem bacteriana total. Para interpretação, no início da monitoria, considerar o menor valor obtido como meta. Nas análises subsequentes esse valor poderá ser ajustado, procurando sempre obter um valor representativo para o plantel.

B) Suabe de superfície: usar 10 suabes por granja, a cada 60 dias. Amostrar através de molde de 25 cm², em superfície de maternidade ou creche, após a limpeza e desinfecção. A análise dos resultados será feita pela contagem de bactérias totais e pela pesquisa de *Salmonella*. Para interpretação, no início da monitoria, considerar o menor valor obtido como meta. Nas análises subsequentes esse valor poderá ser ajustado, procurando sempre obter um valor representativo para o plantel.

3. Monitoria da água

A água é um dos pontos chaves para a biossegurança de granjas, principalmente pela possibilidade de veicular bactérias ou vírus exóticos ao sistema. No perímetro interno da granja, a água é considerada como uma das formas importantes de transmissão de bactérias fecais entre indivíduos sadios e doentes. A água a ser usada para bebida dos animais deve ser potável, atendendo aos mesmos parâmetros indicados para a água de consumo humano.

Para a monitoria bacteriológica da água, recomenda-se coletar 1 amostra por granja, a cada 6 meses. As análises efetuadas são contagem bacteriana total, número mais provável de bactérias (NMP), contagem de coliformes/100ml e medida do pH. O padrão de leitura deve ser o preconizado para água potável pelo Ministério da Saúde do Brasil.

4. Monitoria dos resultados de antibiogramas

Materiais são coletados rotineiramente das granjas para realização de exames bacteriológicos, principalmente para o diagnóstico de doenças, mas eventualmente também para fins preventivos, na forma de “check ups” da sanidade do rebanho. Isso acaba gerando uma série de resultados de antibiogramas, que são mantidos arquivados no escritório da granja. Uma forma de monitoria válida consiste em tabular esses resultados a cada 6 meses, e confrontá-los com os produtos antibacterianos que vêm sendo usados no plantel e com os programas de medicação preventiva e/ou curativos recomendados. Com base nessa análise, poderá ser considerada a necessidade de rever o programa de medicação em uso ou de ampliar a coleta e exame de materiais, buscando sempre obter dados numericamente significativos e que sejam capazes de auxiliar na monitoria da eficácia dos programas de medicação dos plantéis.

CONCLUSÕES

O profissional que trabalha com sistemas modernos de produção suinícola deve ter o conhecimento dos patógenos e da epidemiologia das principais infecções dos suínos. É necessário correlacionar o histórico, exame clínico dos animais e dados dos registros de produção para determinar quando, como e quais métodos de diagnóstico utilizar a fim de solucionar um problema sanitário no plantel.

O veterinário deve ter ainda habilidade para interpretar o significado dos resultados laboratoriais para formular um possível diagnóstico e, ao mesmo tempo, explicar através de mecanismos básicos e hipóteses, a participação dos fatores que conduziram ao processo da doença. Logo, com base em uma análise integral da situação, devem ser implementados os fatores corretivos de manejo necessários e estratégias de controle e prevenção.

REFERÊNCIAS

- 1 **Barcellos D.E.S.N., Sobestiansky J., Moreno A.M., Purto R.N.G. & Souza M.A. 2005.** Utilização do diagnóstico laboratorial. In: Sobestiansky J., Barcellos D.E.S.N., Moreno A.M., Sobestiansky A. & Poleze E. (Eds). *Suínos – Coleta e Remessa de Materiais para Laboratórios para fins de Diagnóstico*. Goiânia: os editores, pp.13-46.
- 2 **Cannon R.M. & Roe R.T. 1982.** Livestock disease survey: a field manual for veterinarians. *Canberra*. 6: 4-5.
- 3 **Janisko L.J. 1994.** Serologic profiling: swine pathogens. *Proceedings of North Carolina Healthy Hogs Seminar*, 5p. Disponível em: <<http://www.mark.asci.ncsu.edu/HealthyHogs/book1994/janisko.htm>>. Acessado em: 01/2009.
- 4 **Nagele M.J. 1975.** Bacteriological profiles in pig herds. *Pig Farming*. 4: 52-55.
- 5 **Reis A.T. & Reis R. 2007.** Monitoramento laboratorial. In: Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. (Eds). *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, pp.728-743.
- 6 **Ristow L.E. 2007.** Monitoramento global da sanidade de granjas de suínos. In: *Anais do III Simpósio Internacional de Produção Suína* (Águas de Lindóia, Brasil). pp.50-56.
- 7 **Sobestiansky J., Santin A.P., Pôrto R.N.G., Moreno A.M., Souza M.A. & Barcellos D.E.S.N. 2005.** Coleta de material para exames laboratoriais. In: Sobestiansky J., Barcellos D.E.S.N., Moreno A.M., Sobestiansky A. & Poleze E. (Eds). *Suínos–Coleta e Remessa de Materiais para Laboratórios para fins de Diagnóstico*. Goiânia: os editores, pp.47-67.
- 8 **Stevenson G.W. 1999.** Common Mistakes in Interpretation of Population Serology. In: *Proceedings of 30th American Association of Swine Practitioners* (Saint Louis, U.S.A.). pp.339-343.

- 9 **Thacker E.L. 2004.** Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*. 12: 252-254.
- 10 **Thacker E.L., Thacker B.J., Boettcher T.B. & Jayappa H. 1998.** Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Journal of Swine Health and Production*. 6: 107–112.
- 11 **Young T.F. & Ross R.F. 1987.** Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *American Journal of Veterinary Research*. 48: 651–656.