



## Técnicas de diagnóstico imunológico em suinocultura

André Felipe Streck<sup>1</sup>, Danielle Gava<sup>2</sup>, Herbert Rech<sup>1</sup> & Cláudio Wageck Canal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil.

<sup>2</sup>Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil.

CORRESPONDÊNCIA: Cláudio Wageck Canal [Av. Bento Gonçalves, 9090 CEP: 91540-000; [claudio.canal@ufrgs.br](mailto:claudio.canal@ufrgs.br)].

### 1 – INTRODUÇÃO

#### 1.1 – O que é imunodiagnóstico?

Testes de imunodiagnóstico são aqueles que se baseiam na especificidade da resposta imune para detectar anticorpos, antígenos ou linfócitos. Desta forma, pode-se fazer o diagnóstico de infecções, detectar autoimunidade, processos alérgicos ou neoplásicos e também para a detecção e ou quantificação de hormônios ou drogas [10].

Embora o método mais seguro para se diagnosticar uma infecção seja o isolamento e a caracterização do agente infeccioso, isto nem sempre é possível de ser alcançado. Devido a localização do agente em sítios de difícil acesso (ex.: encéfalo), a não disposição de métodos simples, práticos ou seguros para o isolamento ou cultivo do agente infeccioso (ex.: infecções por vírus) e a administração de drogas antiinfecciosas que impeçam o crescimento do patógeno *in vitro*. Nessas circunstâncias, as técnicas de imunodiagnóstico são muito importantes, já que permitem confirmar a infecção através da presença de antígenos dos agentes infecciosos ou, mais frequentemente, das “pegadas” deixadas por eles ao entrar em contato com o sistema imune [10,12].

#### 1.2 – Princípios e métodos de imunodiagnóstico

Os testes de imunodiagnóstico baseiam-se no princípio da especificidade da resposta imune. Para se detectar anticorpos ou linfócitos utilizam-se como reagentes os antígenos ou seus componentes, enquanto que, para se detectar os antígenos, são usados anticorpos [3].

Os métodos de imunodiagnóstico podem ser divididos em teste sorológicos, quando detectam a presença de anticorpos ou antígenos no soro ou em outros líquidos orgânicos e teste cutâneos (ex.: teste intradérmico com tuberculina), quando detectam a presença de linfócitos. São vários os métodos para a realização dos testes sorológicos: precipitação, floculação, aglutinação, imunofluorescência, testes imunoenzimáticos e radioimunoensaios. Cada método apresenta características, aplicações e limitações próprias [8,12].

#### 1.3 – Interpretação dos testes de imunodiagnóstico

A sensibilidade e especificidade são dois critérios importantes para a escolha de um método de imunodiagnóstico. Um método será considerado mais sensível quanto menor a concentração de anticorpos ou antígenos ele for capaz de detectar. Quanto menos sensível o teste, maior a probabilidade de deixar de detectar anticorpos ou antígenos em concentrações baixas e, conseqüentemente, maior será a probabilidade de obtenção de resultados negativos falsos. A sensibilidade de um teste de imunodiagnóstico depende do método utilizado, da especificidade do anticorpo, da antigenicidade e distribuição dos epítopos do antígeno. Existem métodos muito sensíveis, como os imunoenzimáticos, capazes de detectar concentrações de anticorpos tão pequenas quanto 0,0001 mg/mL, e outros menos sensíveis como os de precipitação, que só detectam anticorpos quando em concentrações superiores a 10 mg/mL. Além da baixa sensibilidade do teste, outras circunstâncias podem causar resultados falso negativos, como o período de “janela imunológica”, o fenômeno de pró-zona e falhas técnicas (reagentes fora do prazo de validade; inativação dos anticorpos ou de reagentes por calor, ácidos ou bases; não utilização de controle positivo; erros de identificação e de procedimento; dentre outros) [10,12].

Os antígenos utilizados nas técnicas de imunodiagnóstico para a detecção de anticorpos variam muito em sua complexidade e grau de pureza. Podem ser empregados como antígenos desde pequenas seqüências peptídicas até componentes bacterianos complexos, formados por muitos antígenos. Quanto mais simples e puro for o antígeno,

maior será a especificidade da técnica, pois haverá menor probabilidade de que ocorram reações cruzadas com outros antígenos e, em conseqüência, menor ocorrência de resultados falso positivos. Diferentemente da sensibilidade, que depende do método de imunodiagnóstico empregado, a especificidade depende das características do antígeno. Além da baixa especificidade do teste, outras situações podem causar resultados falso positivos, como a vacinação prévia, a administração de soros hiperimunes ou imunoglobulinas, a transferência passiva de anticorpos e falhas técnicas (erros de identificação e de procedimento; não utilização de controle negativo; dentre outros) [6,10,12].

Como os agentes infecciosos compartilham seqüências antigênicas entre si, determinado antígeno utilizado em um teste de imunodiagnóstico pode apresentar reatividade cruzada com anticorpos induzidos por outros agentes infecciosos. A ocorrência dessas reações cruzadas pode dificultar a interpretação dos testes de imunodiagnóstico. Entretanto, o teste apresentará sempre títulos mais elevados para anticorpos específicos para o antígeno do que para anticorpos decorrentes de reatividade cruzada. Portanto, existe a necessidade de se estabelecer pontos-de-corte ("cut-off") para cada técnica, ou seja, os títulos (ou outra medida de quantificação) a partir dos quais os resultados positivos indicam a presença de anticorpos específicos [6,10,12].

Já o valor preditivo de um teste de imunodiagnóstico indica seu grau de precisão e depende da sensibilidade e especificidade do método utilizado. A sensibilidade mede a percentagem de indivíduos com testes positivos em uma população sabidamente positiva, enquanto a especificidade indica a percentagem de indivíduos com testes negativos em uma população sabidamente negativa. O valor preditivo do método será melhor quando sua sensibilidade e especificidade se aproximarem de 100%.

A detecção de anticorpos por um teste de imunodiagnóstico, mesmo com títulos altos, não significa que o indivíduo esteja imune. Indica somente que o indivíduo entrou em contato com o antígeno em algum momento de sua vida. Para afirmar que determinado teste positivo corresponde a uma infecção atual ou recente é necessário detectar a elevação do título de anticorpos da classe IgM, já que esta imunoglobulina é a que aparece mais precocemente após o primeiro contato com o antígeno e a que mais cedo desaparece da circulação após cessado o estímulo antigênico (devido à sua curta meia vida). Títulos elevados de IgG ocorrem mais tardiamente e podem permanecer positivos por anos após a infecção. Outro método para se verificar se a presença de anticorpos indica infecção atual ou passada consiste em coletar amostras pareadas de soro com pelo menos três semanas de intervalo. A elevação do título de anticorpos de quatro vezes ou mais na segunda amostra de soro indica infecção atual, desde que testada nas mesmas condições da primeira amostragem [3,5].

## **2 – TÉCNICAS DE IMUNODIAGNÓSTICO**

### **2.1 – Soro-aglutinação rápida em placa (SARP)**

A técnica de soro-aglutinação rápida em placa (SARP) é o método sorológico mais simples e comumente utilizado. Sua realização é efetuada em superfície de vidro, podendo ser uma placa específica para o teste ou lâmina simples. O teste é efetuada com a adição de uma gota de antígeno e uma gota da amostra de soro sobre esta superfície. Este material deve ser homogeneizado, e suavemente agitado por cerca de 1 minuto. A leitura pode ser realizada a olho nu ou com ajuda de lentes e a incidência de luz. Caso existam anticorpos específicos (aglutininas) no soro, irá ocorrer a formação de grumos ou floculação formada pelo complexo antígeno-anticorpo. A presença destes grumos é indicativa de que o soro possui anticorpos específicos para reagir com o antígeno utilizado [1,2,3,12].

Esta aglutinação (grumos) pode ocorrer em distintos graus, sendo possível estimar através de tabelas comparativas se o soro possui concentrações de anticorpos baixas ou altas. Entretanto, se ocorrer um excesso na concentração de anticorpos, pode ocorrer inibição da reação de aglutinação, fenômeno conhecido como pro-zona [12].

O teste de SARP é um método sensível, quantitativo, porém apresenta baixa especificidade. Devido à presença de fenômenos como reações cruzadas e pro-zona, este teste é utilizado apenas como método de triagem em populações suínas. Este teste pode ser utilizado para doenças como Leptospirose, Micoplasmose, Salmonelose, Pasteurelose, Erisipelose, Febre Suína e Reoviruses, dentre outras [8,11].

### **2.2 – Imunodifusão em gel de ágar (AGID)**

A técnica de imunodifusão em gel de ágar (AGID) é uma técnica simples de precipitação de antígenos por anticorpos. Esta técnica permite a visualização do complexo antígeno-anticorpo em uma linha de precipitação. A reação normalmente realizada em laboratórios de diagnóstico é por difusão dupla, método de Ouchterlony & Elek, onde o antígeno e anticorpo podem migrar livremente em um meio semi-sólido, como o ágar ou a agarose [2].

O teste é realizado em camada simples de ágar. Para isto, deve-se cobrir uma placa de Petry ou lâmina com uma solução aquecida de agarose, formando uma camada sólida de 2 a 4 mm de espessura. Após esta camada de gel solidificar, são realizadas perfurações circulares (cavidades), com cerca de 5 mm de diâmetro e 10 mm de espaçamento entre eles. Usualmente, utiliza-se um sistema radial de perfurações, onde existe uma cavidade central e cinco cavidades dispostas periféricamente. Na cavidade central é adicionado o antígeno e nas cavidades periféricas as amostras de soros a serem testadas. A seguir, o material é incubado em câmara úmida por 48 a 72 horas. Anticorpos presentes no soro e antígeno irão migrar radialmente no gel de ágar, conforme sua solubilidade e massa molecular. Quando ambos reagentes se ligarem e atingirem concentrações ótimas (formação de complexo antígeno-anticorpo) aparecerá uma linha de precipitação branca e opaca. A leitura deve ser realizada em uma sala escura e a visualização da precipitação é realizada com incidência de um feixe de luz sob um fundo preto [2,4,12].

Para o teste ser validado, devem ser inseridos nas cavidades periféricas soros hiperimunes e um soro negativo para o antígeno. A linha de precipitação do soro testado é considerada positiva quando esta possui identidade com a linha formada pelo soro hiperimune, podendo estas unir-se e formar uma linha curva contínua. Quando houver excesso de anticorpo, esta linha pode ir a uma posição mais central, e quando houver pouco anticorpo, assumir uma posição mais periférica [2,4,7].

As vantagens mais interessantes desta técnica são sua simplicidade, custo e sensibilidade aceitáveis. A AGID, por não necessitar utilização de equipamentos especiais, pode ser utilizada em laboratórios de pequeno porte e locais com pouca infra-estrutura. Entre os inconvenientes desta técnica, está sua moderada sensibilidade, além do período de realização ser superior a 48 horas. Esta técnica pode ser aplicada ao diagnóstico de Febre Aftosa, Pseudo-raiva, dentre outras doenças [8,11].

### **2.3 – Inibição da Hemaglutinação (HI)**

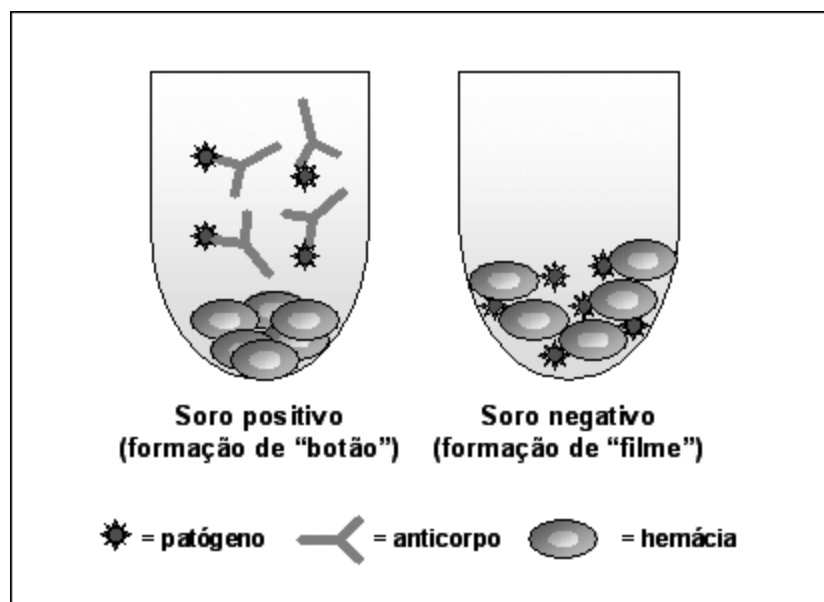
O método de Inibição da Hemaglutinação (HI) é utilizado para mensurar anticorpos, capazes de reagir com antígenos capazes de induzir a aglutinação de hemácias. Alguns microrganismos possuem, em sua superfície, estruturas capazes de se ligar a receptores presentes nas hemácias, produzindo o fenômeno de hemaglutinação (HA). Estas estruturas são denominadas hemaglutininas e são constituídas de glicoproteínas. A ligação da hemaglutinina do patógeno com o receptor da hemácia de suíno é regida primariamente pela especificidade estrutural, contudo, ainda influenciam fatores como pH, temperatura, concentração e composição iônica do meio [2]. Neste método, a presença de anticorpos capazes de inibir a reação de HA do patógeno determina sua identificação sorológica.

Para a execução do HI, é antes necessário revelar a atividade biológica do agente contra o qual o soro será testado, efetuando a constatação da HA. Para isto, uma suspensão de hemácias (usualmente 1%) é incubada em repouso com diluições seriadas do agente por um determinado período de tempo. Geralmente, utilizam-se placas de micro-titulação com 96 cavidades em forma de V, o que torna o processo mais simples e de rápida execução. Após a incubação, é realizada a leitura da hemaglutinação. As hemácias que aglutinarem por ação do agente, irão sedimentar no fundo da cavidade. Devido à aglutinação, formarão uma fina camada de hemácias aglutinadas sob a superfície da cavidade. Por outro lado, as hemácias que não aglutinarem, também irão sedimentar, entretanto formarão um aglomerado de hemácias que irá se deslocar ao verter suavemente a placa. A recíproca da maior diluição capaz de produzir completa hemaglutinação das hemácias corresponde ao título do agente testado a uma unidade hemaglutinante. Após titulada a suspensão antigênica (agente), é comum empregar de quatro a oito unidades hemaglutinantes em um teste [1,2,4,12].

A técnica de HI inicia com a diluição seriada das amostras de soro em placas de micro-titulação. A suspensão antigênica é adicionada aos soros em quantidades constantes e a mistura é incubada em repouso, por determinado período e temperatura. Ao término da incubação, adiciona-se a suspensão de hemácias e é realizada uma nova incubação nas mesmas condições. Se na amostra de soro houver a presença de anticorpos específicos contra o agente, os mesmos irão se ligar na hemaglutinina do patógeno e impedir que ocorra a hemaglutinação. Caso não haja anticorpos no soro, a hemaglutinina ficará ativa e irá ocorrer a hemaglutinação (Figura 1).

A reação positiva deste teste indica a presença de anticorpos e também pode ser utilizada para quantificar (titular) os anticorpos, se forem testadas diluições seriadas do soro. As vantagens mais interessantes desta técnica são sua elevada sensibilidade e especificidade, o que proporciona a esta prova sorológica ser considerada prova “padrão-ouro” mesmo em comparação a outros métodos mais modernos e custosos (Tabela 1).

O método de HI pode ser utilizado para detecção de anticorpos contra Parvovirose, Circovirose, Influenza, Micoplasmose e Reovirose, dentre outros [8,11].



**Figura 1.** Esquema ilustrativo do teste de HI, demonstrando a ação esperada das hemácias frente a um soro positivo e um soro negativo para um determinado patógeno.

**Tabela 1.** Características mais relevantes dos métodos de SARP, AGID, HI, ELISA e SN.

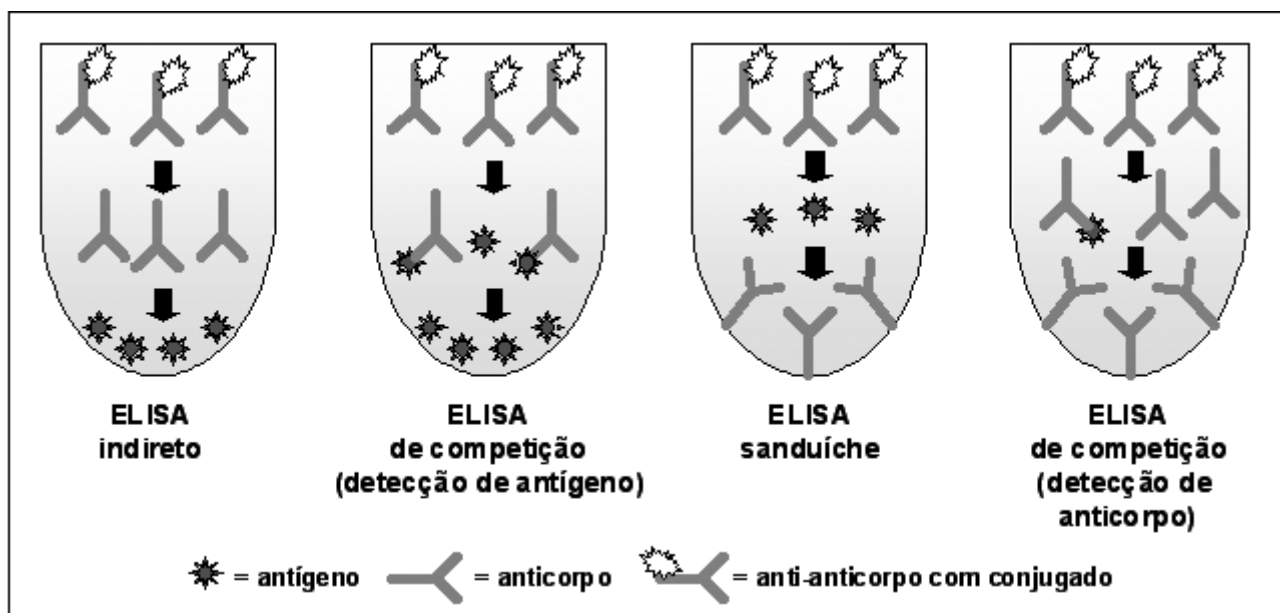
Método	Facilidade de execução	Sensibilidade	Especificidade	Capacidade de quantificação	Custo por prova
SARP	Fácil	Baixa	Baixa	Moderada	Baixo
AGID	Fácil	Baixa	Baixa	Ausente	Baixo
HI	Fácil	Média	Alta	Presente	Baixo
ELISA	Fácil	Alta	Média	Presente	Moderado
SN	Moderada	Média	Alta	Moderada	Elevado

## 2.4 – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

O teste de ELISA foi descrito pela primeira vez em 1971 e, desde então, tem sido considerado uma das mais importantes técnicas de diagnóstico para a saúde humana e produção animal. A detecção de um antígeno imobilizado sobre uma fase sólida (micro-placa de poliestireno) mediante anticorpos que direta ou indiretamente produzem uma reação cujo produto, por exemplo, um colorante, é mensurado por um espectrofotômetro. Os resultados são interpretados após a leitura realizada por este equipamento, com uma absorvância no comprimento de onda que varia entre 340 e 650 nm (de acordo com o cromógeno utilizado). Esta absorvância será proporcional à quantidade do antígeno ou do anticorpo específico presente na amostra testada.

Dentre as variações da ELISA (ELISA indireto, ELISA de competição por anticorpo, ELISA de competição por antígeno e ELISA sanduiche), apenas o ELISA indireto e ELISA de competição por anticorpo visam a detecção e titulação do anticorpo (Figura 2). O ELISA indireto é o método de ELISA mais utilizado. Ele consiste na sensibilização da micro-placa de poliestireno com um determinado antígeno, e a seguir, adiciona-se as amostras de soro a serem testadas. É realizado um processo de incubação e lavagem e, se houver anticorpos específicos no soro, eles irão permanecer fixados ao antígeno. Após, adiciona-se um anti-anticorpo conjugado a uma enzima, chamado simplesmente de conjugado. É realizada nova lavagem e adicionado o substrato, que inicia uma reação em contato com a enzima resultando em mudança de coloração. Desta forma, se houver anticorpos no soro, o conjugado irá se ligar, possibilitando a mudança de coloração [2,4].

Por sua vez, no ELISA de competição, a amostra de soro a ser testada é incubada previamente com o antígeno e, apenas depois, adicionada sobre a micro-placa. As micro-placas deste método de ELISA são sensibilizadas com o anticorpo, e deste modo, se houver anticorpo no soro testado, o antígeno não se ligará aos anticorpos



**Figura 2.** Esquema ilustrativo das distintas metodologias da técnica de ELISA (ELISA indireto, ELISA de competição com detecção do anticorpo, ELISA sanduíche e ELISA de competição com detecção do antígeno).

sensibilizados na micro-placa. Após realizar uma lavagem, este complexo antígeno-anticorpo formado inicialmente será descartado. Posteriormente, ao se adicionar o conjugado, estes não encontrarão antígenos para se fixar e, igualmente, serão descartados em nova lavagem. Por isto, se o soro for positivo, o substrato não encontrará enzima para reagir, e a coloração permanecerá inalterada. Se não houver anticorpos no soro, o antígeno e posteriormente, o anticorpo conjugado com a enzima irão permanecer na micro-placa, possibilitando alteração na coloração [2,4].

A técnica de ELISA é um método simples e prático, permitindo uma completa automação do sistema, sendo possível testar grande número de amostras simultaneamente e com o mínimo de pessoal. Os antígenos ou anticorpos marcados podem ser estabilizados, podendo ser conservados por longo tempo. Além disto, é uma técnica rápida, com alta sensibilidade, podendo assim ser utilizada para detecção de anticorpos no soro, leite e secreções, além de poderem ser específicos para uma determinada classe de imunoglobulina (IgG, IgM, IgA ou IgE). Apresenta como desvantagem o custo das micro-placas, "Kits" de reagentes e espectrofotômetro de placa, ocorrência de reações inespecíficas que podem diminuir a especificidade e não está disponível para todos os agentes infecciosos. Esta técnica tem sido utilizada para Doença de Aujeszky, Brucelose, Peste Suína Clássica, Pleuropneumonia, Disenteria Suína, Febre Aftosa, Gastrenterite Transmissível, Parvovirose, PRRS, dentre outros. Devido a possibilidade de automação, têm sido a técnica mais utilizada na monitoria e diagnóstico de doenças de suínos e aves, tanto pelo serviço de defesa animal quanto pela agroindústria [7,8,9].

## 2.5 – Soroneutralização (SN)

O teste de soroneutralização, também chamado de vírus-neutralização, é utilizado para detectar anticorpos que possuem capacidade de neutralizar a infectividade do vírus ou a toxicidade de um agente infeccioso. O teste, geralmente, utiliza soro, mas eventualmente pode utilizar outros fluidos corporais que possuam anticorpos. Nessa prova sorológica, examina-se a amostra de soro frente ao vírus ou toxina suspeita de causar a infecção ou lesão celular. Pode ser utilizada para praticamente todas as infecções virais, sendo os seus resultados bastante confiáveis. O objetivo da prova não é apenas o diagnóstico, mas também epidemiológico, ou seja, determinar a prevalência e distribuição de anticorpos contra um determinado agente. Pode ser executada para obterem-se resultados qualitativos ou quantitativos. Como a neutralização de um determinado vírus só ocorre por anticorpos específicos contra ele, essa técnica é altamente específica para todos os vírus ou toxinas utilizadas.

Inicialmente, incuba-se o soro-teste (inativado) com uma quantidade fixa do vírus para o qual se está pesquisando anticorpos. O procedimento básico consiste em misturar diluições apropriadas de soro e vírus em micro-placas de 96 orifícios, incubando-a em condições ideais de temperatura (37°C) e tempo (1, 2, ou 4h). Após a incubação do vírus com a amostra de soro a ser testada, a mistura é adicionada a cultivos celulares susceptíveis à replicação

do vírus (ou ação da toxina). O cultivo é então monitorado diariamente (durante 3 a 5 dias) para ver se há a produção de efeito citopático. Se o soro possuía anticorpos, o vírus será neutralizado (opsonizado) e não produzirá dano as células. Se o soro não possuir anticorpos, o vírus permanecerá viável e causará citopatologia nas células de cultivo.

Apresenta vantagens alta especificidade e sensibilidade, além de ter a capacidade de determinar os títulos de anticorpos nas populações imunizadas ou desafiadas a campo. Contudo os resultados são demorados e requer laboratório com estrutura para manipulação de cultivo celular. Uma desvantagem que pode diminuir sua sensibilidade é quando sua utilização se dá para a detecção de anticorpos contra vírus antigenicamente variáveis, como os vírus de genoma RNA. Neste caso, a utilização de um vírus padrão diferente dos vírus que ocorrem no campo pode levar a resultados falso negativos.

São exemplos de viroses em que se pode fazer o diagnóstico através de soroneutralização a Doença de Aujeszky, Rinite Atrófica, Estomatite Vesicular, Gastreterite Transmissível, Raiva, Doença de Teschen e Talfan, dentre outras [7,8,9].

### 3 – CONCLUSÃO

Atualmente, a suinocultura tem várias de técnicas de imunodiagnóstico a disposição. A análise dos resultados sorológicos e a interpretação dos títulos dos anticorpos permite a verificação da eficácia dos programas de vacinação ou a detecção de desafios de campo na agroindústria. Este controle simultâneo de inúmeros patógenos permite o estabelecimento de um perfil sorológico para as diversas enfermidades. Desta forma, possibilita traçar planos vacinais e profiláticos exclusivos para cada propriedade, região, época do ano e categoria animal.

Dentre os métodos de imunodiagnóstico, não existe uma prova que possua fácil execução, baixo custo e de resultado sempre preciso. Poucos são baratos e quase todos eles apresentam dificuldades e problemas potenciais na sua execução. Por isto, existe uma tendência para se adotar métodos de imunodiagnóstico cada vez mais sensíveis, quantitativos, padronizados e automatizados, como os testes imunoenzimáticos. Contudo, mesmo os métodos de menor sensibilidade ainda apresentam papel fundamental na suinocultura moderna, principalmente na triagem de doenças.

### 4 – REFERÊNCIAS

- 1 ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. 494p.
- 2 BERCHIERI, J.A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
- 3 BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- 4 **Diagnóstico Viroológico**. undated. Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em <<http://www.ufsm.br/sv/tecnicas.html>>. Acessado em 03/2007.
- 5 HASEK, J.; STREIBLOVA, E. Fluorescence microscopy methods. **Methods in Molecular Biology**, v.53, p.391-405, 1996.
- 6 MADRUGA, C.R.; ARAUJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- 7 MURPHY, F.A. *et al.* **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic Press.1999. 629p.
- 8 OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Disponível em <<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/>>. Acessado em 03/2007.
- 9 QUIN, P.L. *et al.* **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- 10 ROSE, N.R. *et al.* **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 5. ed. Washington DC: American Society of Microbiology, 1997. 1255p.
- 11 SOBESTIANSKY, J. *et al.* **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1999. 464p.
- 12 TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.

