

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE *Leptospira* spp. EM CÃES DOMICILIADOS EM DOIS BAIRROS NO MUNICÍPIO DE PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL

SERGIANE BAES PEREIRA¹; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA²; EDUARDO GARCIA FONTOURA²; GUSTAVO FORLANI²; ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX²; SAMUEL RODRIGUES FELIX³

¹Universidade Federal de Pelotas – sergiane@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fagondee@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– samuelrf@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose, zoonose considerada como uma das mais difundidas do planeta é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, o qual possui ao menos 20 espécies e 24 sorogrupos com mais de 300 sorovares descritos(ADLER; MOCTEZUMA, 2010; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

A infecção humana é resultante da exposição direta ou indireta à urina de animais, domésticos e silvestres, infectados, que eliminam a bactéria de forma intermitente (FUNASA, 2002), podendo-se destacar, dentre os animais domésticos, os cães. Conforme a doença clínica e o sorovar causador, quatro síndromes são associadas à leptospirose canina: icterica, urêmica, hemorrágica, e reprodutiva (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Entretanto, também pode ocorrer eliminação de bactérias vivas na urina sem apresentação de sinais clínicos (JOUGLARD; BROD, 2000).

FAVERO et al. (2002) destacaram que os resultados dos testes sorológicos para leptospirose dependem de diversos fatores, dentre eles a coleção de antígenos utilizada. Já HANEBELLE et al. (2014) destacaram que a epidemiologia de leptospirose pode ter sido alterada ao longo das últimas décadas devido às mudanças do clima, uso da terra e atividades dos cães, tais como caminhadas, caçadas e realização de vacinações.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a sororreatividade frente aos principais sorovares de *Leptospira* spp. em cães domiciliados nos bairros Laranjal e Balneário dos Prazeres, no município de Pelotas, Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Para a realização do presente estudo foram utilizadas 147 amostras sanguíneas provenientes de cães hígidos, domiciliados nos bairros Laranjal e Balneário dos Prazeres, no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, coletadas durante o período de dezembro de 2014 a abril de 2015. A amostragem foi definida por conglomerados, através de consulta ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

As amostras sanguíneas foram coletadas, após adequada antisepsia, através de flebotomese das veias jugular ou cefálica. Tais amostras eram identificadas e armazenadas em tubos sem anticoagulante, para posterior centrifugação a 3000 rotações por minuto e extração de 100 microlitros de soro sanguíneo para realização de ensaio de soro aglutinação microscópica (SAM).

O SAM foi realizado de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Para o presente estudo foram utilizados os sorovares:

Australis, Automnalis, Ballum, Canicola, Gryppotyphosa, Icterohaemorrhagiae (L1.130 e RGA), Mozdok, Patoc e Pomona. Os sorovares utilizados foram contados em câmara de Petroff-Houser e utilizadas a uma concentração de 1 a 2×10^8 células/mL, enquanto que os soros sanguíneos foram diluídos em tampão fosfato-salino (PBS).

Para a realização do teste de aglutinação foi utilizada uma placa de 96 cavidades, aplicando-se 50 µl de soro sanguíneo e 50 µl de cultivo em cada cavidade, totalizando uma diluição final do soro de 1:50. As amostras que apresentaram aglutinação igual ou superior a 50% foram consideradas positivas. Amostras positivas contra cada antígeno foram tituladas, repetindo-se a mesma reação descrita com o soro sanguíneo em diluições seriadas de até 1:3200, sendo considerada como reagente a sororreatividade de maior titulação.

A análise estatística foi realizada através de teste Qui Quadrado, utilizando o programa Epi Info™.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 147 amostras sorológicas analisadas, 99 foram reagentes (67,35%) aos sorovares testados. Desses, 43 amostras apresentaram sororreatividade frente a mais de um sorovar, determinando-se como sorovar infectante aquele que apresentou sororreatividade de maior titulação. Na tabela 1, pode-se observar que os sorovares Canicola (49,5%), seguido por Mozdok (19,2%) e Icterohaemorrhagiae (13,1%) foram os mais prevalentes nos bairros avaliados.

Tabela 1. Soroprevalência dos principais sorovares de *Leptospira* spp. em cães domiciliados nos bairros Laranjal e Balneário dos Prazeres, Pelotas, RS

| Sorovar/Título | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:3200 | TOTAL (%) |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|------------------|
| Laranjal | | | | | | | |
| Australis | - | - | - | 2 | - | - | 2 (4,1) |
| Automnalis | - | - | - | - | - | - | - |
| Ballum | - | 1 | - | 1 | - | - | 2 (4,1) |
| Canicola | 8 | 5 | 4 | 4 | - | - | 21 (42,9) |
| Gryppotyphosa | - | - | - | - | 1 | - | 1 (2,0) |
| Ictero | 4 | 4 | 2 | - | - | - | 10 (20,4) |
| Mozdok | - | 3 | 7 | 1 | - | - | 11 (22,4) |
| Patoc | 1 | - | - | - | - | - | 1 (2,0) |
| Pomona | - | - | 1 | - | - | - | 1 (2,0) |
| TOTAL (%) | 13 | 13 | 14 | 8 | 1 | - | 49 (100) |
| | (26,5) | (26,6) | (28,6) | (16,3) | (2,0) | | |
| Balneário dos Prazeres | | | | | | | |
| Australis | - | 2 | - | 1 | - | - | 3 (6,0) |
| Automnalis | 1 | - | - | - | - | - | 1 (2,0) |
| Ballum | - | 1 | - | - | - | - | 1 (2,0) |
| Canicola | 12 | 3 | 4 | 6 | 1 | 2 | 28 (56,0) |
| Gryppotyphosa | - | - | - | - | - | - | - |
| Ictero | 2 | 1 | - | - | - | - | 3 (6,0) |
| Mozdok | 2 | 2 | 3 | 1 | - | - | 8 (16,0) |
| Patoc | 6 | - | - | - | - | - | 6 (12,0) |
| Pomona | - | - | - | - | - | - | - |
| TOTAL (%) | 23 | 6 | 10 | 7 | 2 | 2 | 50 (100) |
| | (46,0) | (12,0) | (20,0) | (14,0) | (4,0) | (4,0) | |

Nota: Foi realizada titulação de 1:1600, entretanto nenhuma das amostras avaliadas apresentou soro reatividade.

A literatura destaca os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae como os mais prevalentes em cães (BROD et al., 2005; RODRIGUES, 2008), corroborando com o presente estudo. Conforme TESSEROLI et al. (2008), o cão é o principal hospedeiro do sorovar Canicola, o mais prevalente neste estudo, podendo eliminá-lo através da urina por longos períodos de tempo. AVILA et al. (1998), avaliando sororreatividade em cães do Centro de Controle de Zoonoses do município de Pelotas, relataram soroprevalência de 58,1% desse sorovar, indo ao encontro do resultado observado no presente estudo.

Já o sorovar Mozdok, que no presente estudo foi o segundo sorovar mais prevalente é descrito na literatura como comum em animais silvestres do leste Europeu e Russia, havendo apenas um relato deste sorovar como agente causador de leptospirose humana no hemisfério sul (Majetic et al., 2014; da Cunha, 2016). Brod et al. (2005) ressaltaram a importância da inclusão de novos isolados nos testes sorológicos para leptospirose, podendo tal importância também ser demonstrada pelo presente estudo.

Com relação ao sorovar Icterohaemorrhagiae, terceiro mais prevalente neste estudo, a literatura destaca os roedores, principalmente *Rattus norvegicus*, como sendo a principal fonte de infecção (OLIVEIRA et al., 2013). No presente estudo foram avaliadas as cepas L1.130 e RGA, entretanto as três amostras que apresentaram sororreatividade frente a RGA (duas amostras do bairro Laranjal e uma amostra do bairro Balneário dos Prazeres), apresentaram sororreatividade de maior titulação frente a outros sorovares (Grippotyphosa, Australis e Canicola), sugerindo a ocorrência de reação cruzada entre esses sorovares.

Das amostras avaliadas, 41 amostras do bairro Laranjal e 12 amostras do Bairro Balneário dos Prazeres apresentaram sororreatividade frente ao sorovar Icterohaemorrhagiae, diferindo estatisticamente ($p<0,001$). Após exclusão das amostras que apresentaram sororreatividade de maior titulação frente a outro sorovar, observou-se maior soroprevalência do sorovar Icterohaemorrhagiae no bairro Laranjal (10 amostras) diferindo estatisticamente do bairro Balneários dos Prazeres (três amostras) ($p<0,039$). Essa diferença observada entre os bairros possivelmente deva-se à diferença de altitudes, uma vez que quanto mais baixas forem as altitudes, mais alagadiços ou predispostos a maiores concentrações de água são os terrenos, sendo a água um importante veículo de transmissão da enfermidade (JOUGLARD; BROD, 2000).

Nas amostras provenientes do bairro Balneário dos Prazeres pode-se observar maior soroprevalência do sorovar Patoc em comparação ao bairro Laranjal (seis e uma amostras, respectivamente). Esse sorovar é pertencente a uma espécie saprófita, de vida livre, encontradas principalmente na água doce e com raros registros de infecção aos animais em homens (OLIVEIRA, et al., 2013). Em estudo realizado por BATISTA et al. (2004) com cães errantes da cidade de Patos, no estado da Paraíba, foi relatada soroprevalência de 10% desse sorovar, resultado semelhante ao observado neste estudo.

Já com relação aos títulos de anticorpos, houve variação entre 1:50 e 1:3200, sendo que 53,7% (79/147) das amostras apresentaram titulações entre 1:50 e 1:200, enquanto que 3,4% das amostras (5/147) apresentaram titulações de 1:800 e 1:3200, não sendo observada em nenhuma das amostras titulação de 1:1600 (Tabela 1). Conforme ÁVILA et al. (1998) cães recém vacinados apresentam títulos sorológicos de até 1:400, podendo, portanto, ser, essas reações observadas, de origem vacinal. Entretanto, OLIVEIRA (2010) destacou que quando a enfermidade se torna crônica o título de anticorpos pode encontrar-se reduzido, além de cães portadores do sorovar Canicola poderem secretarativamente leptospiras na urina com títulos sorológicos menores que 1:100.

4. CONCLUSÕES

A população de cães domiciliados dos bairros Laranjal e Balneários do Prazeres, no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, estão expostos a diversos sorovares de *Leptospira* spp. Tais resultados demonstram a importância da elaboração de programas públicos de controle da enfermidade, tais como saneamento básico, além de desenvolvimento de vacinas com os sorovares mais prevalentes na região.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3/4, p. 287-296, 2010.
- AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; et al. Aglutininas antileptospíricas em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p. 107-110, 1998
- BATISTA, C.S.A.; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, n.2, p.131-136, 2004.
- Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília: FUNASA, 2002.
- BROD, C. S.; ALEIXO, J. A.; JOUGLARD, S.D.D.; et al. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasilia, v. 38, n.4, p. 294-300, jul-ago, 2005.
- CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.
- DA CUNHA, C. E. P. ; FELIX, S.R. ; Neto, A. C. P. S. ; et al. Infection with *Leptospira kirschneri* Serovar Mozdok: First Report from the Southern Hemisphere. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 519-521, 2016.
- FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; et al. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.4, p.613 – 619, 2002.
- GONZÁLEZ, M.; BATISTA, N.; MACHADO, M.; et al. Caracterización de cepas de *Leptospira Ballum* aisladas de casos clínicos. Inmunidade cruzada em hámsters vacunados com vax-SPIRAL®. **Biotecnología Aplicada**, La Habana, v.21, p.77-81, 2004.

HENEBELLE, J. H.; SYKES, J. E.; FOLEY, J. Risk Factors Associated with Leptospirosis in Dogs from Northern California: 2001 – 2010. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 10, p. 733 – 738, 2014.

JOUGLARD, S. D. D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do Município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.67, n.2, p.181-185, jul./dez., 2000.

MAJETIC, Z. S.; GALLOWAY, R.; SABLIJIC, R.; et al. Epizootiological survey of small mammals as Leptospira spp. Reservoirs in Eastern Croatia. **Acta Tropica**, v. 131, p. 111-116, 2014.

OLIVEIRA, S.T. **Leptospirose canina: dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos em cães naturalmente infectados**. 2010. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 89 p.

OLIVEIRA, S.T.; ARSKY, M.L.N.S.; CALDAS, E.P. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. **Saúde**, Santa Maria, v.39, n.1, p.9-20, 2013.

RODRIGUES, A.M.A. **Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre sorovares Icterohaemorrhagie e Copenhageni**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

TESSEROLI, G. L.; ALBERTI, J.V.A.; BERGAMASCHI, C.; et al. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. **PUBVET**, v.2, n.1., 2008.