

SORO-PREVALÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM BOVINOS LEITEIROS NAS MESORREGIÕES NOROESTE E NORDESTE DO RIO GRANDE DO SUL

JANAÍNA FADRIQUE DA SILVA¹; DIEGO ALEXANDRE HEMB ALBA²;
GUILHERME DE SOUZA NUNES³; LÍGIA MARGARETH CANTARELLI
PEGORARO⁴; SÉRGIO JORGE⁵; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁶.

¹Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – nanafadrique@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – diegoalba06@gmail.com

³Embrapa Gado de Leite – guilherme.souza@embrapa.br

⁴Embrapa Clima Temperado – ligia.pegoraro@embrapa.br

⁵Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – sergiojorgevet@hotmail.com

⁶Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – odirad@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete diversas espécies. Em bovinos pode ocasionar transtornos reprodutivos como ocorrência de abortos, natimortos, retenção de placenta, morte do bezerro nas primeiras 72 horas, repetição de cio, e consequentemente, diminuição temporária na produção de leite (CORREIA, 2017).

A doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp. que são classificadas em mais de 300 sorovares, definidos de acordo com a heterogeneidade do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa (PICARDEAU, 2017). Os sorovares prevalentes no rebanho bovino são: Hardjobovis, Hardiopravitno e Pomona. Contudo, outros também podem ser os agentes causais da infecção (HARTLEBEN, 2016).

As regiões tropicais e subtropicais são favoráveis à ocorrência da enfermidade, onde as altas temperaturas e os eventos de precipitação pluviométrica oferecem condições propícias à sobrevivência do microrganismo (HASHIMOTO, 2010). As mesorregiões Nordeste e Noroeste do RS são caracterizadas por uma economia diversificada com destaque na produção leiteira.

O diagnóstico da leptospirose bovina e a identificação do sorovar/sorogupo prevalente em determinada região é crucial para a melhor compreensão da epidemiologia, das características clínicas, tratamento e prevenção da enfermidade. O ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto é uma alternativa viável de triagem que diferencia os animais expostos dos não expostos. Contudo, o diagnóstico padrão recomendado pela OIE é a técnica de aglutinação microscópica (MAT), capaz de identificar os sorovares/sorogrupos infectantes e o título de anticorpos (HARTLEBEN, 2016).

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência da leptospirose e identificar os sorovares infectantes em bovinos de leite localizados nas mesorregiões Noroeste e Nordeste do estado do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas 456 amostras de sangue de bovinos de leiteiros, no mês de junho de 2016. As amostras são representativas das mesorregiões noroeste e nordeste do estado do Rio Grande do Sul, abrangendo 49 propriedades rurais produtoras de leite distribuídas em 26 municípios da região Noroeste, 22 municípios da região Nordeste e um município da região metropolitana de Porto Alegre. No momento da coleta das amostras foi abordado um questionário sobre a realização de vacinação nos rebanhos e o período.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm/10 min para a separação do soro e armazenados a -20°C . As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Vacinologia do Núcleo de Biotecnologia - CDTec da Universidade Federal de Pelotas. Para triagem dos animais reagentes todas as amostras de soro foram submetidas ao teste ELISA indireto investigando a presença de IgG contra a proteína rLipL32 conforme protocolo previamente estabelecido (BOMFIM, 2005). As amostras reagentes no ELISA (81 amostras) foram testadas na MAT conforme protocolo descrito (WHO, 2003). Para este fim, cada soro foi diluído 1:50 em solução tampão PBS para a realização da triagem e titulação. Foram selecionados 14 sorovares para a realização do teste: Autumnalis, Canicola, Copenhageni, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjobovis, Hardjoprajino, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Shermani e Tarassovi. As cepas utilizadas foram mantidas em meio de cultura líquido Elinghausen McCullough Johnson Harris Modificado-EMJH (Difco TM) suplementado com albumina 8 a 10%, com repiques semanais e incubação a 30°C . As análises de MAT foram realizadas em placas de 96 cavidades de fundo côncavo. As placas foram incubadas por 2 horas em estufa bacteriológica à temperatura de 30°C . As leituras foram realizadas utilizando-se microscópio de campo escuro com condensador a seco, com auxílio de lâmina na objetiva de 20x, verificando a presença ou ausência de aglutinação. Na triagem os soros foram testados a partir da diluição de 1:100, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram aglutinação igual ou maior que 50%, em comparação ao controle. As amostras reagentes da triagem foram diluídas em diluições crescentes, partindo de 1:100 até 1:3200, para determinação do título final de anticorpos aglutinantes. O sorovar com maior título na MAT foi considerado sorovar prevalente. A amostragem aleatória simples foi realizada considerando uma soro-prevalência esperada de 50%. O nível de confiança de 95% e erro amostral de 5% foram utilizados no cálculo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A soro-prevalência da leptospirose bovina diagnosticada através do ELISA indireto foi de 17,8% (81/456 amostras), indicando baixa prevalência da leptospirose nas mesorregiões estudadas. Contudo, a sensibilidade da MAT apresentou 91,4% (74 amostras) reagentes. Os sorovares/sorogrupos prevalentes da leptospirose bovina na região estudada foram Icterohaemorrhagiae (sorogrupo Icterohaemorrhagiae) e Djasiman (sorogrupo Djasiman) com 37,8% e 12,2% de prevalência, respectivamente. Os demais sorovares testados mostraram valores inferiores a 10%, como demonstrado na figura 1A.

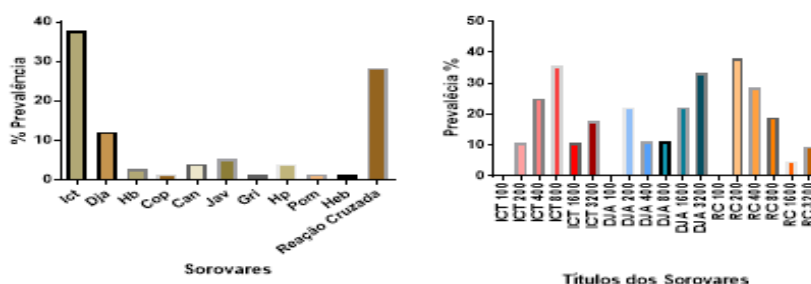


Figura 1. (A) Prevalência dos Sorovares no MAT; (B) Títulos dos Sorovares Prevalentes.

Os sorovares encontrados não são os mesmos relatados por HASHIMOTO, 2010 e MINEIRO, 2007, onde o sorovar Hardjo apresentou maior prevalência, enquanto os sorovares Icterohaemorrhagiae e Djasiman com valor inferior a 10%. Os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção o sorovar Hardjo, porém os sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa podem causar a infecção de forma acidental (FAVERO, 2017).

O diagnóstico para os sorovares não adaptados é mais fácil de ser identificado por apresentar um título maior de anticorpos, como ocorreu com o sorovar Icterohaemorrhagiae que apresentou o título de 800 na maioria das amostras, como demonstrado na figura 1B. Os roedores sinantrópicos são os reservatórios deste sorovar. Sua alta prevalência pode estar associada à uma possível transmissão indireta dos roedores para os bovinos, sendo a urina como fonte de infecção (HASHIMOTO, 2010). A sorologia nem sempre identifica anticorpos contra o sorovar Hardjo, mesmo com eliminação de *Leptospira* na urina, pois o diagnóstico de hospedeiros de manutenção é mais difícil, por apresentarem baixos títulos de anticorpos (HARTLEBEN, 2016). O sorovar Djasiman apresentou título superior a 3200, indicando infecção recente.

A prevalência de amostras que apresentaram o maior título de anticorpos para mais de um sorovar (Reação Cruzada - RC) foi de 28,4% onde o título predominante encontrado foi de 200. Os diferentes sorovares presentes estão associados à presença de hospedeiros de manutenção, agindo como reservatórios naturais (HASHIMOTO, 2010).

Das amostras positivas no MAT (74 amostras), apenas 6 são provenientes de propriedades leiteiras que não realizam vacinação para leptospirose. A prevalência destes sorovares também pode estar relacionada às cepas utilizadas nas vacinas comerciais (HARTLEBEN, 2016. e RINEHART *et al.*, 2012). Os animais vacinados desenvolvem títulos detectáveis até três meses após a vacinação, com títulos variando de 100 a 400. Títulos de 800 a 1600 são presuntivos de infecção após esse período (HARTLEBEN, 2016). Outras condições devem ser consideradas para o controle da enfermidade, como estado imune do hospedeiro e adoção de práticas de manejo corretas (HURTADO, 2013).

4. CONCLUSÕES

A soro-prevalência encontrada de 17,8% nas mesorregiões Noroeste e Nordeste do estado do Rio Grande do Sul foi abaixo da esperada, indicando baixa prevalência da leptospirose nas mesorregiões estudadas. Os sorovares prevalentes Icterohaemorrhagiae, Djasiman e reação cruzada, com 37,8%, 12,2% e 28,4% de prevalência, respectivamente, e estão associados a possível transmissão indireta com urina contaminada e a presença de hospedeiros de manutenção no rebanho, culminando com a perpetuação da enfermidade. Medidas de prevenção e controle devem ser adotadas para amenizar os transtornos reprodutivos causados pela leptospirose em bovinos de leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.109, p. 89- 94, 2005.

CORREIA, L.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Detection of anti-*Leptospira* inhibitory antibodies in horses after vaccination. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v.110, p.494-496, 2017.

FAVERO, J. F.; ARAÚJO, H. L. D.; LILENBAUM, W.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; BALDISSERA, M. D.; STEFANI, L. M.; D. SILVA, A. S. Bovine Leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v.107, p.149-154, 2017.

HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S. Leptospirose. In: JUNIOR, J. S.; PEGORARO, L. M. C.; ZANELA, M. B. **Tecnologias para Sistemas de Produção de Leite**. Brasília: Embrapa. 2016. Cap.13, p.281-290.

HASHIMOTO, V. Y.; GARCIA, J. L.; SPOHR, K. A. H.; DA SILVA, F.G.; ALVES, L. A.; DE FREITAS, J. C., Prevalência de Anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.521-524, 2010.

HURTADO, C. B.; URIBE, A. O.; TOUS, M. G., Seroepidemiología de La leptospirosis em bovinos con transtornos reproductivos en El municipio de Montería, Colombia. Revista de **Medicina.Veterinária**, Bogotá, n.26, p.47-55, 2013.

MINEIRO, A. L. B. B.; BEZERRA, E. E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N. A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonótico agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, Paris. p.1-11, 2017.

RINEHART, C. L.; ZIMMERMAN, A. D.; BUTERBAUGH, R. E.; JOLIE, R. A.; CHASE, C. C. L. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. **American Journal of Veterinary Research**, .Schaumburg, v.73, n.5, p.735-740, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**, Malta, 2003.