

VARIAÇÃO DOS TÍTULOS DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRA APÓS VACINAÇÃO E TRATAMENTO COM ESTREPTOMICINA EM BOVINOS INFECTADOS NATURALMENTE COM *LEPTOSPIRA INTERROGANS*.

MINEIRO, A.L.B.B. ^{1*}, BEZERRA, E.E.A. ², LEAL, L.M. ³, MORAIS, T.P. do N. ³
SILVA, S.M.M. ⁴, COSTA, F.A.L. ⁴ ., VIEIRA, R.J. ⁴

RESUMO

As Leptospiroses são zoonoses de grande importância que atingem os animais domésticos, silvestres e os seres humanos, causadas por bactérias, têm distribuição mundial e o bovino é considerado um importante portador e disseminador de leptospiroses. A enfermidade é causada por bactérias da ordem Spirochaetales, gênero *Leptospira*. Este trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de leptospirose bovina em um rebanho com suspeita clínica da doença e verificar a eficiência da vacinação e do tratamento adotado, através do acompanhamento dos títulos sorológicos apresentados pelos animais infectados. Foram colhidos os soros sanguíneos de um rebanho bovino da raça girolando, produtora de leite, situado no município de Buriti dos Lopes no estado do Piauí. Entre julho de 2004 e julho de 2008, ocorreram 61 abortamentos com retenção de placenta em 25 vacas. Para comprovar a suspeita clínica foi realizada a prova de Soro Aglutinação Microscópica (SAM), que revelou um surto, 53,5% para hardjo (hardjoprajtino e bovis); 12,5% para mini e 5% para ictero. O rebanho era submetido a rigoroso controle sanitário para brucelose, tuberculose, IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina). A partir desses resultados, foram efetuados oito levantamentos sorológicos contra a leptospirose em todos os animais do rebanho, com o objetivo de avaliar a prevalência da doença na propriedade. Esses levantamentos foram realizados com intervalos regulares de seis meses entre julho de 2004 a julho de 2008. Durante o ano de 2004 17 animais abortaram representando uma incidência de 5,66%. No ano seguinte, depois de apenas uma vacinação, este índice aumentou para 8,0% (24/300). No ano de 2006, após quatro vacinações, o índice de abortamento caiu para 6,33% (19/300) e para 3,33% (11/300) no ano de 2007, após um total de nove vacinações. Os animais com títulos positivos foram separados do rebanho e submetidos ao tratamento a base de estreptomicina na dosagem de 50mg/kg de peso corporal. Após a vacinação ocorreu uma diminuição das aglutininas de leptospira, evidenciando-se sua eficiência associada a estreptomicina na prevenção e controle da Leptospirose.

PALAVRAS-CHAVE: epidemiologia, leptospirose, sorologia, bovino.

¹ Doutoranda em Ciência Animal, CCA/UFPI – lysbarradas@yahoo.com.br

² Médico Veterinário Autônomo

³ Graduando em Medicina Veterinária, CCA/UFPI

⁴ Prof. Dr. Associado, DCCV-CCA/UFPI

INTRODUÇÃO

As leptospiroses são zoonoses de grande importância que atingem os animais domésticos, silvestres e os seres humanos. Estão distribuídas mundialmente, localizadas principalmente em países de clima tropical, onde existem elevadas temperaturas, altos índices pluviométricos e condições ambientais propícias para a sua propagação (VASCONCELOS 1997).

Essa enfermidade é causada pela bactéria pertencente ao gênero *Leptospira* à ordem Spirochaetales e família Leptospiraceae.

Dois tipos de classificação de *Leptospira* spp. coexistem: uma baseada em determinantes genéticos e a outra baseada em determinantes antigênicos. Antigenicamente, o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies: *L. interrogans* que compreende as amostras patogênicas e *L. biflexa* que compreende as amostras saprófitas (FAINE e al., 1999).

As leptospiroses são divididas em sorovariedades com base na reação de soroglutinação microscópica e reação de absorção cruzada de aglutininas. Sorovariedades de leptospiroses antigenicamente relacionadas são agrupadas em sorogrupos, compondo mais de 200 sorovariedades agrupadas em 23 sorogrupos. Métodos moleculares permitiram uma nova organização taxonômica de bactérias classificadas no gênero *Leptospira*. Estudos envolvendo a conformação genômica dessas bactérias demonstraram a ocorrência de heterogeneidade genômica e, com isso, foram propostas novas espécies genômicas de leptospiroses patogênicas e saprófitas baseadas no grau de homologia do DNA (YASUDA et al., 1987; RAMADASS et al., 1992).

Nos bovinos as infecções por leptospiroses frequentemente são subclínicas e associadas a infecções fetais que provocam abortos, natimortos e neonatos fracos com alta taxa de mortalidade (ELLIS et al., 1994). Nos bovinos de leite pode causar ainda epidemias de agalactia, também chamada de síndrome da queda de produção do leite, associada à fase aguda da infecção pela *Leptospira hardjo* (HIGGINS et al., 1980).

Os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção da *hardjo*, já que nesta espécie esta sorovariedade possui baixa patogenicidade, porém elevada suscetibilidade. Na sorovariedade *hardjo* os genótipos *hardjobovis* e *hardjoprajitno* estão mais envolvidos com os rebanhos bovinos do mundo, e possuem diferenças nas suas manifestações clínicas (HEINEMAN, 2000). A infecção causada pela *hardjobovis* é considerada uma pandemia em bovinos e é frequentemente caracterizada pela forma subclínica com sintomas clássicos de aborto, enquanto que a *hardjoprajitno*, isolada em poucos países, caracteriza-se por ser mais patogênica levando a queda da produção do leite e também problemas reprodutivos. (HEINEMAN, 2000)

A transmissão entre os bovinos ocorre principalmente através do contato direto com a urina contaminada e os animais infectados podem eliminar o agente por longos períodos mesmo após a sua cura clínica. (BOLLIN, 1999).

De acordo com Hanson et al. (1972) as taxas de bovinos reagentes reduzem de 30% para 8% no primeiro momento e a zero após nove anos de vacinação de bovinos contra pomona. Situação similar foi observada em bovinos de rebanhos nos quais também procedeu-se a vacinação de todos animais jovens a partir de três meses de idade, contra *hadjo*.

Em estudo posterior Hanson (1973) concluiu que a solução para se garantir a sanidade de determinado rebanho é a identificação específica da sorovariedade ou das sorovariiedades residentes, pois as vacinas comerciais não conferem proteção mesmo quando as sorovariiedades exibam reações antigênicas cruzadas *in vitro*.

A soroglutinação microscópica é de grande utilidade para acompanhar a história natural das leptospiroses em bovinos, assim como para ajudar no monitoramento do progresso do programa de erradicação com vacina (AMATREDJO e CAMPBELL, 1975)

Apesar da melhor adaptação da *Hardjobovis* aos bovinos, somente a *Hardjoprajitno* foi isolada no Brasil (MOREIRA, 1994). É provável que a sorovariedade *Hardjobovis* exista em bovinos criados no Brasil, tendo em vista a importação freqüente de matrizes e reprodutores de outros países.

O objetivo deste trabalho é verificar a eficiência da vacinação e do tratamento adotado, através do acompanhamento dos títulos sorológicos apresentados pelos animais infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os soros sanguíneos examinados foram colhidos de um rebanho bovino da raça Girolando, produtora de leite, situado no município de Buriti dos Lopes no estado do Piauí. Neste rebanho, em 2004, algumas fêmeas apresentaram suspeita clínica de leptospirose por apresentarem abortamentos, diminuição na produção de leite, retenção de placenta e repetição de estro, sendo o diagnóstico confirmado através de sorologia. O rebanho era submetido a rigoroso controle sanitário para brucelose, tuberculose, IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina). No total foram efetuados oito levantamentos sorológicos contra a leptospirose em todos os animais do rebanho, com o objetivo de avaliar a prevalência da doença na propriedade. Esses levantamentos foram realizados com intervalos regulares de seis meses entre julho de 2004 a julho de 2008. Os animais com títulos positivos foram separados do rebanho e submetidos ao tratamento a base de estreptomicina na dosagem de 50mg/kg. A partir de 2005 foram realizadas vacinações a cada seis meses, com a vacina produzida pela Universidade Federal de Minas Gerais, totalizando nove vacinações no rebanho.

As amostras de sangue foram colhidas para prova de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) conforme normas do Ministério da Saúde. Os soros obtidos foram centrifugados sob refrigeração a 10.000g durante 10 minutos e em seguida, colocados em tubos "ependorf" de 1,5 ml e armazenados em congelador a -20°C até a realização da prova, realizada no Laboratório de Leptospirose da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O critério adotado para o soro ser considerado como reagente foi a presença de 50% de leptospiras aglutinadas por campo microscópico em aumento de 100 vezes. O sorovar registrado foi aquele que apresentou maior título, sendo as demais aglutinações consideradas reações cruzadas.

Culturas vivas de leptospiras dos seguintes sorovares: *Hardjo bovis*, *Hardjo O.M.S.*, *Mini*, *Ballum*, *Bratislava*, *Canícola*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae* e *Pomona*, com quatro a 14 dias de crescimento diluídas na proporção de 1:3 em solução salina tamponada, pH 7,2, foram utilizadas como antígenos.

As amostras positivas ao título inicial foram novamente diluídas sucessivamente na razão dois e testadas para o(s) sorovar(es) que reagiu (ram) anteriormente. O título final foi aquele que ainda apresentou 50% ou mais de aglutinação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 2400 amostras colhidas no período de julho de 2004 a julho de 2008 foram submetidas ao teste SAM. As amostras colhidas apresentaram reagentes anti-leptospira, e o sorovar com maior frequência foi o sorovar hardjo (hardjoprajitno e hardjobovis) com 53,33%.

Na primeira colheita, em julho de 2004, as frequências de aglutininas anti-leptospira apresentaram taxas elevadas de bovinos positivos para hardjo, os testes subseqüentes dos soros sanguíneos, através da SAM, em sete colheitas, revelaram queda gradativa dos bovinos positivos, estando em consonância com Hanson (1972).

De julho de 2004 a abril de 2005, conforme registros da fazenda, haviam ocorrido vários casos de abortamento, repetições de estro, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos e, principalmente, queda brusca na produção de leite, achados que se estão de acordo com as observações de Heineman, (2000).

Durante o ano de 2004, 17 animais abortaram representando uma incidência de 5,66%. No ano seguinte, depois de apenas uma vacinação, este índice aumentou para 8,0% (24/300). No ano de 2006, após quatro vacinações, o índice de abortamento caiu para 6,33% (19/300) e para 3,33% (11/300) no ano de 2007. Em 2008 não houve nenhum abortamento até a presente data.

Estudo semelhante realizado em Belo Horizonte, MG, a partir de amostras de matrizes provenientes de um rebanho bovino da raça Pardo Suíço, reportou a taxa de ocorrência de anticorpos anti-leptospira menor do que o encontrado neste trabalho, de 52,5 % (1835/3495) (MOREIRA, 1994).

A redução dos índices de abortamento ocorrida no rebanho em estudo, considerando que o mesmo era controlado para as principais doenças da esfera reprodutiva, corroboram os dados de Amatredjo e Campbell, (1975) e demonstram que os casos de aborto estavam muito provavelmente relacionados à infecção por leptospira, o que também é reforçado, pela presença de outros distúrbios reprodutivos e mastite nos animais que abortaram. Os abortamentos pelo sorovar hardjo podem ocorrer em qualquer época da prenhez, sendo a sua patogenicidade aceita universalmente, como observou Ellis (1994). Do mesmo modo os dados clínicos no presente estudo estão em consonância com Heineman, (2000). Além disso, os sintomas verificados na fazenda sob estudo também estão de acordo com preconizados por Zuerner, (1988) quanto a Leptospirose. A vacinação, associada ao tratamento com estreptomicina foi eficiente em reduzir as aglutinas e indica a melhor forma de prevenção e controle da leptospirose, corroborando os dados de Amatredjo e Campbell, (1975).

Presume-se ainda, pelos resultados da vacinação, que os abortos foram causados mais provavelmente pela infecção por Leptospira, principalmente o sorovar *hardjo*.

Na presente investigação, obtiveram-se na sorologia de todos os bovinos acima de quatro meses de idade, desde o primeiro teste realizado em 15/07/04

para confirmação da hipótese clínica de leptospirose no rebanho, taxas elevadas de positivos para hardjo conforme dados apresentados no quadro 1

A distribuição de títulos e sorovares dos animais positivos à prova de SAM está apresentada no Quadro 1. Nele pode-se observar o decréscimo número de bovinos positivos para hardjo estando de acordo com as observações de Hanson (1972).

Quadro 1 - Distribuição de títulos e sorovares dos animais positivos à prova de SAM para o diagnóstico de leptospirose bovina, durante o período de 2004 a 2008.

Exames Sorológicos Realizados																
DATA	hardjo (OMS)						hardjo (CTG)				harjo bovis					
	a)	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	a)	1:200	1:400	1:800	a)	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
2004																
15/07.	47	32	27	27	10	5	40	30	20	15	17	47	67	10	5	3
2005																
10/01.	79	71	44	10	0	0	30	20	18	10	77	61	31	15	10	2
14/07.	51	41	21	6	0	0	20	18	14	7	51	3	41	20	15	5
2006																
17/01.	17	9	9	3	0	0	7	7	6	5	22	5	50	28	18	6
15/07.	9	14	12	4	0	0	5	4	2	1	5	5	10	18	10	3
2007																
10/01.	16	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	12	8	8	6
20/07.	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	6	6	2
2008																
20/01.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Para os sorovares que apresentarem reação sorológica a mais de um sorovar foi escolhido como possível infectante o de maior título, as demais reações no mesmo animal foram consideradas reações cruzadas.

^a Animais com títulos de 1:100.

CONCLUSÃO

Com base nos níveis de aglutinas após a vacinação evidencia-se a eficiência da mesma, e sua associação ao tratamento com estreptomicina permite prescrever esta associação como método de controle e prevenção da leptospirose. Há evidências de que os abortamentos foram causados, mais provavelmente, pela infecção por *Leptospira*, principalmente pelo sorovar *hardjo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATREDJO, A. & CAMPBELL, R.S.F. Bovine leptospiroses. **Vet. Bull.**, v.43, p. 875-891,1975.
- BOLLIN, C.A.& ALT, D. P. Clinical signs,diagnosis,and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Pract.**33.p.50-55,1999.

- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.**, v.10, n.3, p.463-478, 1994.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. **MediSci, Melbourne:Medi Sci**, 1999, 272 p.
- HANSON, L.E., TRIPATHY, D.N., KILLINGER, A. H. Current status of leptospirosis immunization in swine and cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 161,p.1235-1243,1972
- HANSON, L.E., Immunology problems in bovine leptospirosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 163,p.919-21,1973.
- HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES,C.M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.;VASCONCELLOS,S.A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. Serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Vet. Microbiol.** 73,p.261-267,2000.
- HIGGINS, R.J.; HARBOURNE, J.F.; LITTLE, T.W.A. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo. **Vet. Rec.** v.107, p.307-310,1980.
- MOREIRA, E.C. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos. Belo Horizonte: UFMG – **Escola de Veterinária**, 1994. 94f. Tese (Doutorado)
- RAMADASS, P.; JARVIS,B.D.W.; CORNER,R.J.;PENNY,D.; MARSHALL,R.B.; Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int. j. Syst. Bact.* 42,p.215-219,1992.
- SURUJBALLI O., HENNING D., MARENGER R., et al. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis antibodies in bovine sera. **Can. J. Vet. Res.** v. 61, n.4, p.267-74. 1997
- VASCONCELLOS,S.A.;BARBARINI JUNIOR.;O. UMEHARA.; Z.M. MORAIS.; A. CORTEZ.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA,F.;A.C.M. FÁVERO.;FERREIRA,J. S. N. Leptospirose bovina.Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais,São Paulo,Rio de Janeiro,Paraná Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul.Período de janeiro a abril de 1996.**Arq. Inst. Biol. São Paulo.** 64,p.7-17,1997.
- YASUDA,P.H.;STEIGERWALT,A.G.;J.SULZER,K.R.;KAUFMAN,A.F.;ROGERS,F .;BRENNER,D.J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposal for 7 new *Leptospira* species.**Int.J.Syst. Bact.**37,p.407-415,1987.
- ZUERNER, R.L.; BOLIN, C.A. Repetitive sequence element cloned from *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis provides a sensitive diagnostic probe for bovine leptospirosis. **J Clin Microbiol.**, v.26, n.12, p. 2495-2500, 1988.