

Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiros pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose

Searching of swine leptospiral carrier by microbial isolation and polymerase chain reaction in kidney samples from serologically positive and negative animals

Fábio Hiroto SHIMABUKURO¹;
Paulo Francisco DOMINGUES¹;
Hélio LANGONI¹;
Aristeu Vieira da SILVA¹;
Júlia Plombon PINHEIRO¹;
Carlos Roberto PADOVANI²

1 Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu - SP

2 Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu - SP

Correspondence to:

FABIO HIROTO SHIMABUKURO
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP
Distrito de Rubião Jr.
18618-000 – Botucatu – SP
e-mail: fhsvet@bol.com.br

Recebido para publicação: 06/02/2003
Aprovado para publicação: 06/05/2003

Resumo

Com o intuito de se estudar a presença de suínos portadores renais de leptospiros foram colhidas 131 amostras sanguíneas e os respectivos rins de animais durante o abate em abatedouro da região de Botucatu-SP. Pela prova de Soroaglutinação Microscópica obteve-se 48 amostras sorológicas positivas para um ou mais sorovar de *Leptospira* spp., com uma taxa de ocorrência de anticorpos anti-leptospira de 36,64%, e maior importância para o sorovar icterohaemorrhagiae. Para a pesquisa do agente nos rins, das 88 amostras renais submetidas a cultura em meio de EMJH e analisadas pela prova de PCR, foi isolado e detectado o agente em uma única amostra renal, pertencente a um animal soropositivo. Embora não tenha sido possível a comparação estatística, em termos de sensibilidade e especificidade das duas provas de detecção do agente a partir de amostras renais, a PCR mostrou-se mais rápida e prática na pesquisa de portadores renais. Pelo isolamento obtido, ressalta-se a importância desses animais como possíveis transmissores da doença para trabalhadores de abatedouro e inspetores de carne.

Palavras-chave

Leptospirose animal.
Suínos.
Reação em cadeia pela polimerase em animal.
Isolamento animal.

Introdução

A leptospirose é uma doença infecciosa de caráter agudo a crônico que acomete animais silvestres e domésticos, sendo uma das zoonoses mais amplamente distribuída mundialmente¹. Nos animais de produção ocorrem sérias perdas econômicas, sendo considerada

uma doença da esfera reprodutiva, amplamente distribuída nos rebanhos dos EUA².

Os suínos podem ser hospedeiros definitivos, especialmente dos sorovares pomona, bratislava e tarassovi, e ainda hospedeiros acidentais, como nos casos de infecção por icterohaemorrhagiae, canicola,

autumnalis, hardjo e grippotyphosa³. No primeiro caso, há uma adaptação hospedeiro-parasita, onde as leptospiras são mantidas no trato urinário por longo período, sendo eliminadas pela urina em condições de viabilidade para infectar outros animais. Os sinais são moderados, sendo detectada a infecção apenas nas fêmeas em gestação. Na infecção acidental, quando são infectados por um sorovar adaptado a outra espécie, os sinais da doença são mais evidentes, mas a permanência no trato urinário ocorre por pouco tempo, havendo eliminação de menor número de leptospiras na urina⁴.

No Brasil, a leptospirose em suínos tem sido uma das principais causas de falhas reprodutivas em vários estados, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste do país. Faria et al.⁵ observaram frequência de 7,70% de animais soro positivos entre as 610 matrizes, provenientes de 63 granjas tecnificadas das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova, no estado de Minas Gerais.

Larsson et al.⁶ estudaram 500 suínos abatidos, provenientes do estado de São Paulo, Paraná e Santa Catarina e verificaram 8,40% de animais soro positivos. No Rio Grande do Sul, o sorovar pomona já foi isolado de fetos abortados e de portadores sadios abatidos em frigorífico⁷, predominando, à semelhança de outros estados brasileiros, o sorovar pomona nos testes sorológicos. No entanto, a rotina de diagnóstico sorológico em suínos tem revelado nos últimos anos a predominância de títulos para os sorovares bratislava e icterohaemorrhagiae.

Langoni et al.⁸ obtiveram 27,30% de positividade em amostras de soro de suínos de diferentes procedências do estado de São Paulo, encontrando maior prevalência para o sorovar icterohaemorrhagiae. Outros sorovares, como djasiman, também tem sido evidenciado na infecção suína⁹.

Em pesquisa sorológica realizada em rebanhos suínos de 25 abatedouros em Prince Edward Island associados com infertilidade, os sorovares mais comuns foram: icterohaemorrhagiae (57,10%), bratislava (35,10%), autumnalis (3,40%) e pomona (1,50%)¹⁰.

Apesar do não isolamento de *Leptospira* spp., por Larsson et al.⁶, a partir de rins de suínos, diferentes sorovares têm sido isolados de fluidos e tecidos corporais de fetos suínos abortados: sorovar mozdok, em Portugal¹¹; sorovar bratislava, nos EUA¹², no Canadá¹³ e na Irlanda do Norte¹⁴; e sorovar kennewicki, de rins de suínos sadios abatidos em Matadouro de Valdivia, Chile¹⁵.

Embora seja disponível na atualidade um grande número de técnicas para o diagnóstico laboratorial de rotina para leptospirose, nenhuma associa as exigências de sensibilidade, especificidade e praticidade¹⁶. Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a técnica de PCR é mais específica, sensível e rápida para o diagnóstico da leptospirose, sendo uma importante ferramenta diagnóstica, bem como para estudos epidemiológicos da doença^{17,18,19,20,21,22}.

Com base nesses aspectos, este trabalho objetivou a comparação da técnica de reação em cadeia pela polimerase e o isolamento em meio de cultura para detecção de *Leptospira* spp. em amostras renais de suínos, bem como, comparar o resultado da soraglutinação microscópica e a presença do estado de portador renal, nessa espécie.

Material e Método

Amostras

Foram colhidas 131 amostras sanguíneas e os respectivos rins de suínos abatidos em abatedouro, localizado na região de Botucatu-SP. A escolha dos

animais foi aleatória, sem discriminação de sexo, raça, idade ou procedência. Também foi aleatória a escolha do rim colhido de cada animal, sem preferência quanto à posição do órgão, se direita ou esquerda.

Os materiais colhidos foram encaminhados e processados no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses (LDZ) do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses - NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu.

Do total de 131 rins colhidos foram processados para o isolamento em meio de cultura e reação em cadeia pela polimerase, todos provenientes de animais sorologicamente positivos para a prova de Soroaglutinação Microscópica, ou seja 48 rins, e mais 40, escolhidos aleatoriamente de 83 animais sorologicamente negativos na mesma prova, totalizando 88 amostras renais processadas.

Colheita de amostras

Sangue

Foi colhido aproximadamente 10mL de sangue de cada animal escolhido, em tubo de vidro estéril de 15mL, durante a fase de sangria da linha de abate. As amostras foram enviadas ao Laboratório, onde foram dessoradas após a retração do coágulo e centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. As amostras de soro obtidas foram acondicionadas em microtubos de plástico de 1,5mL e imediatamente examinadas pela prova de Soroaglutinação Microscópica ou mantidas em freezer a -20°C até o momento do exame.

Rim

Os rins foram colhidos durante a fase de evisceração, colocados em sacos plásticos individualmente,

devidamente vedados e identificados, sendo rapidamente encaminhados para o referido Laboratório sob temperatura de refrigeração, em caixa isotérmica com gelo reciclável. Foram imediatamente processados para o isolamento em meio de cultura, excetuando-se nos casos, onde previamente foram realizadas a prova de Soroaglutinação Microscópica, para escolha dos rins a serem processados. As amostras utilizadas para reação em cadeia pela polimerase foram mantidas em freezer a -20°C até o momento do processamento.

Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A prova de Soroaglutinação Microscópica foi realizada segundo as normas do Ministério da Saúde²³. Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:100 em solução salina tamponada pH 7,2, como ponto de corte positivo e testada para 25 sorovares de *Leptospira* spp. (Quadro 1), considerando-se como positiva aquela que apresentou 50,00% ou mais de aglutinação em relação ao controle.

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 50,00% ou mais de aglutinação.

Como antígenos foram utilizadas culturas vivas de *Leptospira* spp. com quatro a 14 dias de crescimento, diluídas na proporção 1:3 em solução salina tamponada pH 7,2. Os 25 sorovares foram mantidos no Laboratório por repiques semanais em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina “Tween 80”²³.

Isolamento em meio de cultura

Os rins utilizados para o cultivo foram processados de acordo com o protocolo descrito por Bolin e Cassells¹², com algumas modificações.

Aproximadamente 1g de amostra renal de cada animal foi colhida assepticamente dentro de câmara de fluxo laminar, macerada em gral com pistilo e suspensa em 9mL de solução salina tamponada estéril pH 7,2 (SST) acrescida de 1,00% de albumina bovina. Após a retirada de 1 mL da suspensão para a prova de PCR, adicionou-se 5mg/mL de neomicina e 10mg/mL de furazolidona para auxiliar a descontaminação do material²⁴. Após homogeneização por dois minutos, foram preparadas diluições na razão 10 (10-2 e 10-3), sendo semeada 0,5mL da suspensão de cada diluição, em tubos contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido de EMJH com 0,15.00% de ágar, acrescido de 100mg de 5-fluorouracil/mL e 1,00% de soro de coelho inativado a 560C por 30 minutos e esterilizado por filtração. Os tubos semeados foram incubados a 290°C por 20 semanas, e a seguir a 250°C por mais 6 semanas.

A leitura inicial foi realizada na segunda, quarta e sexta semana após a semeadura, observando-se a formação de anel de opalescência nos tubos, e exame da parte superior do meio de cultura para verificação de desenvolvimento bacteriano em microscopia de campo escuro, colocando-se 10mL do meio de cultura de cada tubo entre lâmina e lamínula.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Extração e purificação de DNA

A extração e purificação de DNA foi realizada segundo protocolo adaptado de Soares²⁵. Da diluição inicial obtida para o isolamento, como descrito anteriormente, pipetou-se 250µL da mesma, homogeneizando-se em vórtex juntamente com igual volume de uma solução tampão de extração (200mM NaCl + 20mM Tris + 50mM EDTA + 1mg/mL Proteinase K + 2,00% sódio-dodecil-sulfato) em tubo plástico de 1,5mL. Esta solução foi aquecida a

560C por uma hora, com homogeneização por inversão delicada do tubo a cada 15 minutos, para então, se adicionar 500µL de fenol, homogeneizando-se em vórtex por 30 segundos e centrifugado a 13000g durante três minutos. A seguir foi transferida uma alíquota de 300µL do sobrenadante para novo tubo plástico de 1,5mL, adicionando-se 150mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A solução obtida foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e centrifugada novamente a 13000g durante três minutos. Uma alíquota de 200µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de plástico de 1,5mL, adicionando-se 36µL de acetato de sódio 2M e 472µL de etanol absoluto gelado, mantendo-se a -200C durante 12 a 16 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 13000g por 10 minutos, e o etanol vertido cuidadosamente, para então, se adicionar 470µL de etanol 700 GL. Após homogeneização delicada a amostra foi novamente centrifugada a 13000g por 10 minutos, retirando-se em seguida o etanol, secando-se o tubo à temperatura ambiente. A amostra foi ressuspensa em 50µL de água ultra-pura.

Amplificação do DNA

Foram utilizados os primers descritos por Mérien et al.¹⁸, o par de oligonucleotídeos 38-57 (5'-GGCGGCGCTCTTAAACATG-3') e 348-368 (5'-TCCCCCATTTGAGCAAGATT-3').

A amplificação do DNA foi realizada segundo Mérien et al.¹⁸, com algumas modificações. Para cada tubo de reação de 0,2mL foi adicionado 5µL de tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 1,5µL de MgCl₂ (1,5M), 8,0µL de solução de deoxinucleotídeos (1,25mM), 1,5U de Taq-polimerase, 10rM de cada oligonucleotídeo, 10µL de amostra obtida no final da extração e 17,2µL de água ultra-pura. A amostra assim

preparada foi termociclada com 30 ciclos, onde o primeiro consistiu na desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento a 63°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Os próximos 29 ciclos consistiram de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento do primer a 63°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, incluindo-se um ciclo adicional de 10 minutos ao fim destes, para completar a extensão dos primers.

Detecção dos produtos da PCR

A uma alíquota de 10µL da amostra amplificada foi adicionada 2µL de uma solução de azul de bromofenol (0,15g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 1,0mg azul de bromofenol + 4,0g sacarose + 10,0mL água deionizada). Após homogeneização esta solução foi submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,50% com tampão tris-borato-EDTA 0,5x (54,0g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 27,5g ácido bórico + 20,0mL solução estoque de EDTA 0,5M + 980,0mL água deionizada) e corrida a 100 voltz por aproximadamente duas horas e meia. Após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (5,0µL brometo de etídeo + 20,0mL tampão tris-borato-EDTA 5x + 80,0mL água deionizada). A visualização das bandas foi realizada em transluminador ultravioleta com filtro de 300nm. O gel foi fotografado com sistema fotográfico Polaroid.

Controle

Em todas as análises das amostras renais para PCR foram utilizados os controles, processados, conforme descrito anteriormente, para a amostra renal.

O controle positivo foi obtido de material renal de hamster experimentalmente inoculado com cepa patogênica de *Leptospira* spp.

sorovar pomona, gentilmente cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, mantida no Laboratório em passagens sucessivas nestes animais.

Para o controle negativo foram utilizados os reagentes que compõem as etapas de extração e purificação, e de amplificação, nas mesmas proporções usadas nas amostras renais, porém acrescidas de água ultra-pura.

Análise estatística

O estudo da associação entre as metodologias e a leptospirose foi realizado pelo Teste de Goodman²⁶, para contrastes entre proporções binomiais. Quanto à concordância de respostas dos métodos foi utilizada a prova de McNemar²⁷. Todas as discussões foram realizadas no nível de 5,00% de significância.

Resultados

Sorologia

Do total de 131 amostras de soro analisadas pela prova de SAM, 48 foram reagentes para um ou mais sorovar de *Leptospira* spp., obtendo-se uma ocorrência de anticorpos anti-leptospira em 36,64% dos animais.

Dos 25 sorovares de *Leptospira* spp. testados, ocorreram reações sorológicas para apenas nove. O maior título obtido foi de 25.600 para o sorovar hebdomadis, em um único animal, embora a maioria, tenha reagido para icterohaemorrhagiae (n=43) em valores iguais ou abaixo de 1600. Outros sorovares reagentes foram autumnalis (n=9), andamana (n=3), djasiman (n=2), castellonis (n=2), australis (n=1), pomona (n=1) e copenhageni (n=1).

Entre os animais reagentes, 38 apresentaram reação para um único sorovar. Em todas as coletas realizadas este sorovar foi o icterohaemorrhagiae,

em 34 animais, com exceção na quinta coleta, onde se pôde verificar reações para autumnalis, em três animais e djasiman, em um dos animais. Todos apresentaram títulos baixos de anticorpos, iguais ou abaixo de 400. Entretanto um animal apresentou reação para o título de 1600.

Dez animais apresentaram reações para mais de um sorovar. Desses, oito com aglutinação para dois sorovares, um para três, e outro para seis. Nestes casos, escolheu-se como possível infectante o sorovar de maior título, sendo as demais aglutinações, consideradas reações cruzadas.

A distribuição de títulos de anticorpos anti-leptospira em animais com reação única de sorovar e os que apresentaram coaglutinação com escolha do possível infectante, o sorovar que apresentou maior título, pode ser vista na Tabela 1. Os animais que apresentaram possível infecção pelo sorovar icterohaemorrhagiae corresponderam a 85,41% (41/48), seguidos dos sorovares autumnalis, 10,41% (5/48), djasiman, 2,08% (1/48) e hebdomadis, 2,08% (1/48).

Isolamento

Das 88 amostras renais cultivadas em meio de EMJH, somente uma única foi positiva na tentativa de isolamento de *Leptospira* spp., sendo esta proveniente de animal sorologicamente positivo na prova de SAM (Tabela 2), reagindo para dois sorovares: icterohaemorrhagiae, com título de 3200 e autumnalis, 6400. Portanto, a taxa de isolamento em meio de cultura dentre os animais positivos na prova de SAM foi de 2,08% (1/48), com discordância significativa entre as duas técnicas ($P < 0,0001$). Não houve o isolamento do agente em nenhum cultivo a partir de amostra renal de animal sorologicamente negativo.

Reação em cadeia pela polimerase

A prova de PCR foi positiva para apenas uma única amostra renal, das 88 analisadas (Figura 1). Foi para a mesma amostra de onde se obteve o isolamento do agente, portanto de animal sorologicamente positivo. A taxa de detecção de *Leptospira* spp. em amostras renais pela prova de PCR foi de 2,08% dentre os animais sorologicamente positivos, com discordância significativa entre as duas técnicas ($P < 0,0001$) (Tabela 3). Não foi detectado o agente em nenhuma amostra renal de animal negativo na prova de SAM.

Quadro 1

Sorovares mantidos em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina "Tween 80", no LDZ do NUPEZO – FMVZ – UNESP – Botucatu, utilizados na prova de SAM

SOROGRUPO	SOROVAR
Australis	<i>australis</i> <i>bratislava</i>
Autumnalis	<i>autumnalis</i> <i>butembo</i>
Ballum	<i>castellonis</i>
Bataviae	<i>bataviae</i>
Canicola	<i>canicola</i>
Celledoni	<i>whitcombi</i>
Cynopteri	<i>cynopteri</i>
Djasiman	<i>djasiman</i> <i>sentot</i>
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>copenhageni</i>
<i>icterohaemorrhagiae</i>	
Javanica	<i>javanica</i>
Panama	<i>panama</i>
Pomona	<i>pomona</i>
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>
Sejroe	<i>hardjo</i> <i>wolffi</i>
Shermani	<i>shermani</i> <i>tarassovi</i>
Andamana	<i>andamana</i>
Seramanga	<i>patoc</i>

Tabela 1

Distribuição de títulos de anticorpos anti-leptospiros em animais reagentes, segundo os possíveis sorovares infectantes* - Botucatu, 2002

Títulos										
Sorovares	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	Total (%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	16	17	5	1	2	0	0	0	0	41 (85,41)
<i>autumnalis</i>	3	1	0	0	0	0	1	0	0	5 (10,41)
<i>djasiman</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,08)
<i>bebdomadis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 (2,08)
Total	19	19	5	1	2	0	1	0	1	48 (100)

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

Tabela 2

Amostras renais cultivadas de suínos reagentes e não reagentes a *Leptospira* spp. pela SAM, Botucatu-SP, 2002

Cultivo			
Sorologia	Positivo	Negativo	Total
Positiva	1	47	48
Negativa	0	40	40
Total	1	87	88

$\chi^2 = 45,02$ ($P < 0,0001$)

Tabela 3

Amostras renais submetidas a PCR de suínos reagentes e não reagentes a *Leptospira* spp. pela SAM, Botucatu-SP, 2002

PCR			
Sorologia	Positiva	Negativa	Total
Positiva	1	47	48
Negativa	0	40	40
Total	1	87	88

$\chi^2 = 45,02$ ($P < 0,0001$)

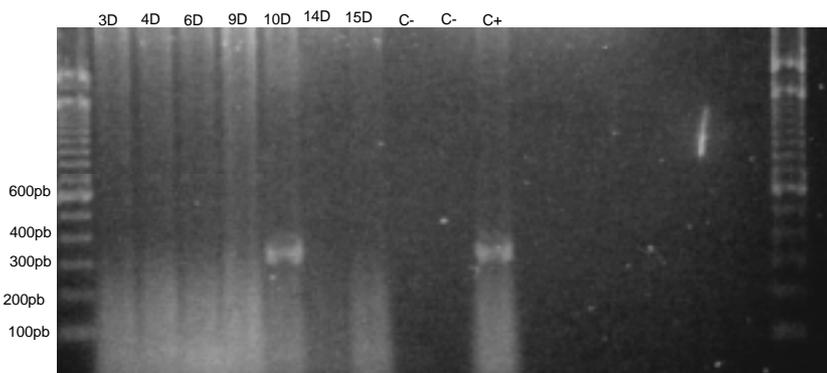


Figura 1

Gel de agarose, mostrando amplificação de segmento de DNA de 331 pb de *Leptospira* spp. na amostra 10D

Discussão

Sorologia

A presença de anticorpos anti-leptospira em amostras sorológicas colhidas de animais de abatedouro não representa uma amostragem adequada para o estudo da prevalência da leptospirose suína em uma determinada região. Também não reflete a situação da doença dentro de uma granja. Apesar disso, ela permite que se tenha uma noção geral da sua ocorrência e pode sugerir quais os sorovares de *Leptospira* spp. possuem maior importância na região de origem dos animais.

Embora este trabalho não

tenha tido como objetivo o estudo da prevalência ou incidência da leptospirose em suínos, pode-se considerar que a ocorrência de anticorpos anti-leptospira em animais desta pesquisa, abatidos em abatedouro da região de Botucatu – SP, foi de 36,64%.

Estudo semelhante realizado no Brasil, a partir de amostras colhidas em animais durante o abate em matadouro reporta taxa de ocorrência de anticorpos anti-leptospira menor do que encontrado neste trabalho, de 8,40% (42/500)⁶. Outros estudos, também em materiais de abatedouros, reportam soropositividade menores de 15,65.00% (13/83) em porcas

descartadas²⁸, semelhante, de 35,00% em Brittany, na França²⁹ ou maiores, como de 66,40% em animais randomicamente selecionados em Prince Edward Island, no Canadá¹⁰.

As evidências sorológicas obtidas neste trabalho, indicam maior importância para os sorovares icterohaemorrhagiae, autumnalis, djasiman e hebdomadis, considerados não adaptados aos suínos, portanto, oriundos de infecção acidental³. As aglutinações verificadas para pomona, australis, andamana, castelonis e copenhageni foram consideradas reações cruzadas, já que os animais que apresentaram reações para estes sorovares apresentaram títulos maiores a outros sorovares, sendo estes considerados os possíveis infectantes. De acordo com Bolin³⁰, em geral o sorovar infectante é aquele na qual o animal desenvolve o maior título.

Estudos recentes confirmam a importância do sorovar icterohaemorrhagiae no país^{8, 28, 31, 32} e em outros países, como Canadá¹⁰, corroborando os resultados obtidos neste trabalho com 85,41% de reações para este sorovar dentre os animais positivos.

Poucos estudos têm demonstrado a importância do sorovar autumnalis em suínos, embora em alguns tenha sido o de maior ocorrência³³. Tanto autumnalis como o icterohaemorrhagiae são sorovares que possuem como principais reservatórios, os roedores sinatrópicos³⁴, indicando a importância desses animais como prováveis fontes de infecção nas criações que fornecem suínos para o abatedouro da região de Botucatu – SP.

Entre os sorovares menos frequentes nesta pesquisa, a importância do sorovar djasiman, já foi evidenciada na infecção suína por Modolo et al.⁹. Em relação ao sorovar hebdomadis, pesquisas evidenciam sua maior

importância em bovinos^{35, 36}, sendo portanto, a infecção notada em suíno desta pesquisa como acidental, provavelmente pela existência de criações bovinas, próximas à granja, sendo este fato comum em fazendas da região de Botucatu³⁷.

Dos sorovares considerados adaptados aos suínos, pomona, bratislava e tarassovi³, nenhum foi evidenciado sorologicamente, com exceção do pomona, reagente em um animal, mas provavelmente resultado de reação cruzada. O pomona foi considerado em estudos passados no Brasil^{5,6,7}, e é considerado ainda em alguns países, como Austrália³⁸, o sorovar de maior importância em criações suínas, embora neste trabalho não se tenha verificado tal fato. O mesmo pode ser observado em relação ao sorovar bratislava, recentemente evidenciado no Brasil²⁸ e outros países³⁹.

Isolamento

A taxa de isolamento nas amostras renais cultivadas dentre os animais sorologicamente positivos foi de 2,08% (1/48), estando de acordo com a mencionada por Heath, Alexander e Galton⁴⁰, aproximadamente 3,00% de isolamento a partir do cultivo de diferentes fluidos corporais de humanos.

Embora sejam relatadas na literatura taxas maiores de isolamento, como de 9,80% (6/61)⁴¹, sabe-se que esta técnica é muito laboriosa e possui uma baixa sensibilidade, existindo trabalhos onde não se obtiveram êxito no isolamento do agente, como citado por Larsson et al.⁶ a partir de 500 amostras renais cultivadas e Drolet et al.⁴² em 100 amostras cultivadas.

Ressalta-se que o sucesso no isolamento de *Leptospira* spp., é dependente de diversos fatores, tais

como, o tipo de meio utilizado⁴³, o sorovar infectante¹², o tempo decorrido entre a morte do animal e processamento da amostra, e o tipo de material escolhido para o cultivo.

Existem várias explicações para o não isolamento do agente a partir das outras 47 amostras de animais sorologicamente positivos:

- os títulos sorológicos apresentados por estes animais poderiam ser oriundos de resposta vacinal, portanto não estariam realmente infectados;

- os títulos seriam de contato sem a evolução da infecção ou doença;

- em infecção recente, onde o animal apresentaria altos títulos sorológicos, sem no entanto ter ocorrido a colonização renal.

- pelo pequeno número de leptospiros presentes nas amostras renais, insuficientes para o sucesso no isolamento; e

- Animais que foram infectados, apresentando ou não a doença e que eliminaram o agente, inclusive o estágio de portador renal, visto que em infecções por sorovares não adaptados o período de portador renal é menor⁴.

Embora a técnica de isolamento em meio de cultura para *Leptospira* spp. seja muito laboriosa, de custo elevado e demorada, levando até mais de seis meses, justifica-se o seu uso, principalmente em estudos epidemiológicos, onde a identificação do sorovar é de extrema importância³. O agente isolado, ainda pode ser posteriormente estudado em infecções experimentais estabelecendo-se a patogenia da doença causada por ele^{11,44}, bem como outros estudos de relevante importância⁴⁵.

O isolamento obtido em meio de cultura confirma a presença de leptospiros viáveis em rins de suínos aparentemente saudáveis no momento do abate, ressaltando a importância da

possível transmissão da doença para trabalhadores de abatedouros e inspetores de carne. Este fato já foi relatado por Zamora, Riedemann e Frías¹⁵, no Chile, Baker et al.⁴¹, no Canadá e Bolt e Marshall⁴⁶, na Nova Zelândia.

Reação em cadeia pela polimerase

A maior sensibilidade e especificidade da prova de reação em cadeia pela polimerase já foi confirmada em diversos estudos em diferentes materiais pesquisados, como urina e/ou sangue^{17,18,19,20,21,22}.

Nesta pesquisa pelo baixo número de amostras positivas, tanto no isolamento em meio de cultura, com uma única amostra positiva, como na PCR, também com uma única amostra positiva, não foi possível realizar a comparação de dados, em termos de sensibilidade e especificidade, embora o resultado de ambas as provas tenham sido no mesmo material, portanto com a mesma sensibilidade e especificidade.

A PCR, igualmente ao isolamento em meio de cultura não foi hábil para detectar leptospiros em 47 amostras de animais sorologicamente positivos na prova de SAM. As explicações para tal fato são as mesmas citadas anteriormente para o não isolamento do agente em meio de cultura.

Apesar de não ter sido possível a comparação das duas provas, a PCR nos quesitos de rapidez e praticidade se mostrou muito superior ao isolamento em meio de cultura. Dependendo do protocolo adotado na extração e amplificação de DNA, a prova pode ser realizada em menos de 24 horas, obtendo-se um resultado altamente sensível e específico, enquanto que no isolamento o resultado somente foi obtido aproximadamente após um mês, com dúvidas se realmente o agente isolado seria do gênero *Leptospira*.

Summary

With the purpose to study the presence of swine leptospiral carrier, 131 blood samples and the kidneys from the respective animals were taken during slaughter in abattoir house in Botucatu – SP region. By the Microscopic Agglutination Test (MAT), 48 serum samples were positive against one or more serovars, with a rate of the occurrence of 36.64% to anti-leptospiral antibodies and greater importance to the serovar icterohaemorrhagiae. The investigation of the agent, a total of 88 kidney samples were submitted to culture in EMJH media and analysed by PCR. From those 88 kidney samples, 48 were of serologically positive animals and 40 of negative animals, being isolated and detected the agent in one kidney sample, belonging to a seropositive animal. Although was not possible the statistical evaluation in terms of sensitivity and specificity of the two test to detection, the PCR showed faster and most practical to study leptospiral carriers. By the results of isolation it must be emphasized the importance of those animals as the transmitters of the disease to slaughter house workers and to meat inspectors.

Key-words

Leptospirosis.
Swine.
Polymerase chain reaction.
Isolation.

Referências

- 1- MAILLOUX, M. Leptospiroses = Zoonoses. *Int. J. Zoon.*, v. 78, n. 12, p. 1158-1159, 2001.
- 2- CLARK, L. K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 42, n. 1-4, p. 447-454, 1996.
- 3- ELLIS, W. A. Leptospirosis in pig. *Pig Vet. J.*, v. 28, p. 24-34, 1992.
- 4- OLIVEIRA, S. J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? *A Hora Veterinária*, v. 19, n. 111, p. 87-90, 1999.
- 5- FARIA, J. E. et al. Frequência de aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de suínos das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova – MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 41, n. 5, p. 381-388, 1989.
- 6- LARSSON, C. E. et al. Leptospirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios dos estados de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v. 21, n. 1, p. 43-50, 1984.
- 7- OLIVEIRA, S. J. Leptospirose em suínos. *A Hora Veterinária*, v. 7, n. 41, p. 5-8, 1988.
- 8- LANGONI, H. et al. Inquérito soroepidemiológico para leptospirose suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1995, Blumenal, *Anais...* Blumenal, 1995. p. 153.
- 9- MODOLO, J. R. et al. Seroprevalence of *Leptospira interrogans* serovar djasiman in quarantined pigs. *Indian Vet. J.*, v. 77, n. 2, p. 155-156, 2000.
- 10- VAN TIL L. D.; DOHOO, I. R. A serological survey of leptospirosis in Prince Edward Island swine herds and its association with infertility. *Can. J. Vet. Res.*, v. 55, n. 4, p. 352-355, 1991.
- 11- ROCHA, T. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar mozdok from aborted swine fetuses in Portugal. *Vet. Rec.*, v. 126, n. 24, p. 602, 1990.
- 12- BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar bratislava from stillborn and weak pigs in Iowa. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 196, n. 10, p. 1601-1604, 1990.
- 13- REHMTULLA, A. J. et al. *Leptospira bratislava* infection in aborted pigs in Ontario. *Can. Vet. J.*, v. 33, n. 5, p. 345, 1992.
- 14- ELLIS, W. A. et al. Leptospires in pig urogenital tracts and fetuses. *Vet. Rec.*, v. 117, n. 3, p. 66-67, 1985.
- 15- ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S.; FRÍAS, M. Infeccion por *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar kennewicki en porcinos. *Arch. Med. Vet.*, v. 20, n. 2, p. 134-135, 1988. 39- ANDRE-FONTAINE, G.; GANIERE, J. P. New topics on leptospirosis. *Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 13, n. 3, p. 163-168, 1990.
- 16- VASCONCELLOS, S. A. **Diagnóstico laboratorial da leptospirose.** *Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v. 3, n. 3-4, p. 189-195, 1979.
- 17- BAL, A. E. et al. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- 18- MÉRIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.
- 19- KEE, S. H. et al. Detection of *Leptospira* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 4,

- p. 1035-1039, 1994.
- 20- RAMADASS, P. et al. Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. **Indian Vet. J.**, v. 74, n. 6, p. 457-460, 1997.
- 21- MÉRIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J. Infect. Dis.**, v. 172, n. 1, p. 281-285, 1995.
- 22- SENTHIL KUMAR, A.; RAMADASS, P. Rapid DNA isolation from the leptospiral cultures using high salt method. **Indian Vet. J.**, v. 78, n. 12, p. 1158-1159, 2001.
- 23- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de Leptospírose**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.
- 24- BERNARDO, C. C. M.; BARRETO, I. M. Q.; ROMERO, E. C. Utilização de substâncias inibitórias no isolamento de leptospiroses. In: ENCONTRO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 3., 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: IAL, 1999. p. 206.
- 25- SOARES, R. M. **Emprego das reações de PCR e nested-PCR na detecção de DNA de parvovírus suíno**, 1998. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 26- GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 35, p. 716-725, 1964.
- 27- SIEGEL, S.; CASTELLAN Jr, N. J. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1988. 312 p.
- 28- LIMA, P. C. R. Diagnóstico de leptospirose em suínos no Rio Grande do Sul: exames laboratoriais em porcas descartadas em frigorífico e em reprodutores de granjas com e sem problemas de reprodução, durante o período de um ano. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 24, n. 1, p. 119-121, 1996.
- 30- BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.
- 31- GIRIO, R. J. S. et al. Alterações reprodutivas, hematológicas e anatomopatológicas em fêmeas suínas com títulos de anticorpos contra *Leptospira interrogans* sorotipo icterohaemorrhagiae. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 5, n. 3, p. 99-103, 1998.
- 32- RAMOS, A. C. F.; LILENBAUM, W. Fatores que influenciam na ocorrência de aglutininas anti-leptospira em suínos de criação tecnificada do estado do Rio de Janeiro. **R. Bras. Med. Vet.**, v. 24, n. 2, p. 78-80, 2002.
- 33- BOQVIST, S. et al. The impact of leptospira seropositivity on reproductive performance in sows in southern Viet Nam. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1327-1335, 2002.
- 34- HEATH, S. E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 205, n. 11, p. 1518-1523, 1994.
- 35- MITCHELL, D. et al. Leptospirosis in Canada. V. Infection in cattle with a serotype of the "Hebdomadis" group. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, v. 24, p. 229-235, 1960.
- 36- ELLIS, W. A.; MICHMA, S. W. Bovine leptospirosis: infection by the Hebdomadis serogroup and abortion – a herd study. **Vet. Rec.**, v. 99, n. 21, p. 409-412, 1976.
- 37- CUNHA, E. L. P. **Pesquisa de *Leptospira* spp. em bovinos e em roedores, em propriedades leiteiras, e estudo da infecção animal e humana pela análise sorológica, utilizando-se o teste de soroaaglutinação microscópica**, 2001. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- 38- CHAPPEL, R. J. et al. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. **Vet. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 235-242, 1998.
- 39- CHAPPEL, R. J. et al. Serological evidence for the presence of *Leptospira interrogans* serovar bratislava in Australian pigs. **Aust. Vet. J.**, v. 69, n. 5, p. 119-120, 1992.
- 40- HEATH, C. W. J.; ALEXANDER, A. D.; GALTON, M. M. Leptospirosis in the United State: analysis of 483 cases in man. **N. Engl. J. Med.**, v. 273, n. 16, p. 875-864???, 915-922, 1965.
- 41- BAKER, T. F. et al. The prevalence of leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. **Can. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 3, p. 290-294, 1989.
- 42- DROLET, R. et al. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. **Vet. Rec.**, v. 150, n. 5, p. 139-143, 2002.
- 43- CABRAL, K. G. **Pesquisa de *Leptospira* spp. em leite de vacas normais e mastíticas**, 1999. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.
- 44- ROCHA, T.; PERESTRELO VIEIRA, R. Experimental infection of pregnant gilts with *Leptospira interrogans* serovar mozdok. **Vet. Rec.**, v. 131, n. 9, p. 197-199, 1992.
- 45- FARINA, R.; ANDREANI, E.; TOLARI, F. Leptospirosis in swine – experimental infection with serotype bratislava. **Int. J. Zoon.**, v. 4, n. 1, p. 38-44, 1977.
- 46- BOLT, I.; MARSHALL, R. B. The epidemiology of *Leptospira interrogans* serovar pomona in grower pig herds. **N. Z. Vet. J.**, v. 43, n. 1, p. 10-15, 1995.