



INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA PARA LEPTOSPIROSE NO CANIL MUNICIPAL DA CIDADE DE PELOTAS – RS

**PAUL, Karina¹; CAPPUA, Gabrielle Ávila; LHAMAS, Cíntia Lima¹;
LIMA, Camilla Thereza Silva ¹; SCHUCH, Luíz Filipe Damé²;
RECUERO, Rebeca da Cunha³; BROD, Claudiomar Soares³.**

1 - Faculdade de Medicina Veterinária - UFPel ; k.vet@hotmail.com

2 - Laboratório de Doenças Infecciosas - FaVet – UFPel

3 - Centro de Controle de Zoonoses - UFPel

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade infecto-contagiosa que acomete o homem e animais domésticos e silvestres, não apresentando nos cães um quadro característico, pois na dependência do sorovar infectante, os sinais clínicos poderão ser vagos ou inaparentes (HUTTER *et al.*, 1972). A avaliação clínica de cães enfermos revela, na maioria dos casos, evidências de anorexia, depressão, vômitos, melena e icterícia, que, embora ocorra com relativa freqüência, não é um sinal patognomônico na leptospirose canina. As análises laboratoriais revelam uremia e elevação das enzimas creatinina e fosfatase alcalina. Apesar do quadro clínico descrito, a letalidade na espécie canina é baixa, variando com o sorovar infectante (HARTMAN, 1986). Os sorovares de leptospiras mais importantes para os cães são: *L. icterohaemorrhagiae*, que também é o agente causal da moléstia de Weill no homem e, *L. canicola*, que ao acometer cães, ocasiona entre outros sinais clínicos, o comprometimento renal (HARTMAN, 1986). A icterícia e as lesões hemorrágicas, tão comuns na leptospirose causada pela *L. icterohaemorrhagiae*, só raramente aparecem em infecções causadas por outros sorovares (ALSTON & BROOM, 1958). Segundo o Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, os sorovares de maior ocorrência no município de Pelotas são: *Bratislava*, *Autumnalis*, *Canícola*, *Copenhageni*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjo*, *Ilinei*, *Sentot*, *Tande*, *Mike*, *Wolffi* e *Lousiana*. Embora a leptospirose seja uma doença de distribuição mundial, cada região geográfica se caracteriza pela ocorrência de sorovares específicos. A

leptospirose tem alta prevalência em países tropicais, onde há grandes precipitações pluviais e o solo é neutro ou alcalino. A temperatura ideal para a sobrevivência de leptospiros patogênicos no meio ambiente é em torno de 28°C, e pH em torno de 7,2 a 7,4 (ACHA, 1986). O presente estudo teve como objetivo fazer a titulação dos níveis de anticorpos contra leptospiros, presentes em soros de cães recolhidos pelo Canil Municipal da cidade de Pelotas, em vários locais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nos dias 25 de abril e 2 de maio do presente ano, foram coletadas amostras de sangue, sem anticoagulante, de 26 cães, provenientes do Canil Municipal de Pelotas, através de flebocentese (radial ou cefálica). As amostras obtidas foram armazenadas em microtubos de 1,5mL, previamente identificados com números de 1-26, e posteriormente centrifugados. Após separação do soro, este foi armazenado à -20°C até sua triagem. Sete dias após, procedeu-se à titulação dos mesmos.

O diagnóstico definitivo laboratorial (padrão) baseia-se na Soroaglutinação Microscópica com Antígenos Vivos (SAM) para identificar aglutininas anti-Leptospiros (Faine et al, 1999). Podemos dividi-la em duas etapas, que são a triagem e a titulação. A etapa de triagem baseia-se em colocar o soro de cada animal em contato com diferentes sorovares de leptospiros para observar a ocorrência de aglutinação. Dessa forma, se no soro testado houverem anticorpos para um ou mais antígenos referentes aos respectivos sorovares, ocorrerá aglutinação, sendo visualizada ao microscópio de campo escuro. Assim sendo, considerou-se reagente o soro que apresentou 50% ou mais de aglutinação em diluição a partir de 1:100. Nos soros reagentes a um ou mais sorovares considerou-se, como resultado final, reagente para o soro, aquele cujo título foi o mais alto.

A partir daí iniciou-se o trabalho com a limpeza e identificação das placas, onde foram colocados os 12 sorovares de Leptospira, os soros que estavam sendo testados, assim como o controle. Antes de colocar os soros em contato com o antígeno foi feita a sua diluição com solução tampão, que é uma solução salina. Para animais a diluição inicial é de 1:50.

Então, foi escolhido um volume total de 500µL, sendo que 10µL representava o soro e 490µL a solução salina. Após, colocou-se os 500µL do soro diluído no microtubo de 1,5 ml e foram homogeneizados por alguns segundos para evitar precipitação das amostras.

Os 12 sorovares (antígenos vivos) foram colocados na primeira linha da placa, sendo eles: *Bratislava*, *Autumnalis*, *Canícola*, *Copenhageni*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjo*, *Ilinei*, *Sentot*, *Tande*, *Mike*, *Wolffi* e *Lousiana*. O próximo passo foi colocar 15µL da solução salina com 15µL do sorovar com Leptospiros livres para o controle na segunda linha da placa. O controle deve ser sempre negativo (não reagente), pois ele é utilizado para verificar a integridade dos antígenos e comparar as amostras.

Após colocou-se 15µL de cada soro diluído em solução salina, sendo que cada soro é depositado em uma linha da placa, pois assim, cada 15µL reage com um sorovar diferente. Esses sorovares são colocados nas colunas desta placa,

totalizando 12 sorovares. Então, as placas foram levadas a um agitador de placas por 20 minutos a 100 rpm e, após, foram incubadas em uma estufa à 30°C por 2 horas. E, finalmente, realizou-se a leitura no microscópio utilizando-se aumento de 100 vezes.

A leitura foi feita identificando-se quais amostras aglutinaram, sendo estas teoricamente positivas para aglutininas anti-Leptospiras, e, as que não aglutinaram, foram consideradas negativas. Porém é na segunda etapa que se confirma se as amostras são realmente positivas para as aglutininas.

A segunda etapa do diagnóstico é a titulação (Tabela 1). Esta é feita somente com as amostras que aglutinaram na triagem. O título representa a maior diluição em que houve aglutinação, já que cada amostra de soro é testada em várias diluições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de doze sorovares de leptospira, os quais foram escolhidos pelo CCZ - Pelotas, apenas seis reagiram frente a soros de cinco animais que apresentaram anticorpos, de um total de vinte e seis soros.

A prevalência da doença no período em que as amostras foram coletadas e processadas foram devido a fatores climáticos em nossa região (altos índices pluviométricos). Também pelo fato de que os animais eram errantes e, devido a isto, terem tido contato tanto direto quanto indireto com o principal reservatório desta doença, que são os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*.

A Tabela 1 demonstra a titulação para cada sorovar em relação às amostras.

Tabela 1. Titulação de soro canino para sorovares de *Leptospira*.

| AMOSTRA | SOROVARES | TITULAÇÃO |
|---------|----------------------------|-----------|
| 02* | <i>Icterohaemorrhagiae</i> | 100** |
| | <i>Copenhageni</i> | 200** |
| | <i>Tande</i> | 100** |
| 08* | <i>Autumnalis</i> | 400** |
| 11* | <i>Tande</i> | 200** |
| 14* | <i>Mike</i> | 200** |
| 15* | <i>Mike</i> | 200** |
| | <i>Lini</i> | 400** |

*número de identificação das amostras de soro canino

**Titulação de anticorpos presentes nas respectivas amostras

4. CONCLUSÃO

O diagnóstico sorológico apresentado mostrou-se eficaz na identificação

dos portadores, sendo este método de baixo custo quando comparado com os demais, tendo uma leitura rápida, permitindo a identificação dos anticorpos em apenas sete a dez dias após a infecção.

Devido ao fato desta doença ser de grande importância em saúde pública, deve receber uma maior notoriedade junto aos órgãos públicos responsáveis, visando uma diminuição da incidência de casos tanto nos humanos como nos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA. P.N., Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales **Organizacion Panamericana de la Salud**. p. 112-120, 1986.

ALSTON, J.M., BROOM, J.C. Leptospirosis in man and animals. **Edinburg, E. e S. Livingstone Ltd**. 1958. 367 p.

Birchard, S.J.; Shering, R. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1998.

BRIHUEGA, B., HUTTER, E. Incidencia de la leptospirosis em caninos de la ciudad de Buenos Aires. **Veterinária Argentina**, 11, p. 98-101, 1994.

FAINE, S. Adler, B. Bolin, C. and Perolat, P. **Leptospira and Leptospirosis**, p.296. MediSci, Melbourne, Austrália, 1999.

HARTMAN, E.G., VAN DEN INGH, T.S., ROTHUIZEN, J. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM and IgG specific ELISA. **Vet Immunol Immunopathol**, p. 261-271, 1986.

MONEZI T. A., 2000; CUBEL GARCIA, R. C. N. Date on file, **Fort DodgeAnimal Health**, 2001.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina Interna de Pequenos Animais – Cap. 100: **Doenças bacterianas e polissistêmicas**, 2ªedição.