

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE AS REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA E O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA IGG), COM O ANTÍGENO RECOMBINANTE LIPL32 PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE BOVINA

Francisca Júlia Mota Aragão (bolsista ICV), Maria Rosa Quaresma Bonfim (colaboradora, UFMG), Adriano Fontenele Vieira (colaborador, UFPI), Francisco de Assis Leite Souza (colaborador, UFPI), Eduardo Esmeraldo Augusto Bezerra (colaborador), Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro (orientadora, Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária - UFPI)

INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (MAPA, 2011).

A bacia leiteira de Parnaíba está situada em região litorânea, norte do estado do Piauí. Produz aproximadamente 40.000 litros de leite por dia e possui uma privilegiada infra-estrutura.

No Brasil, a soroprevalência da leptospirose em bovinos varia de 74% a 100% (LAGE et al., 2007). Entre as técnicas de diagnóstico baseadas na detecção de anticorpos, a prova de soroaaglutinação microscópica (SAM) é o método considerado como prova padrão ouro (WHO, 2003). Outra reação que tem sido testada, em laboratórios de pesquisa, para o diagnóstico das leptospiroses é o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), apresentando como vantagens a utilização apenas de frações bacterianas, não necessitando do antígeno vivo (YAN et al., 1999).

Diante das dificuldades apresentadas para a execução da reação de SAM, este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho do teste de ELISA, com antígeno recombinante LipL32, e compará-lo com SAM para o diagnóstico sorológico de leptospirose bovina.

METODOLOGIA

Foram coletadas 285 amostras de sangue de fêmeas bovinas de oito municípios que compõem a bacia leiteira de Parnaíba- PI, no período de setembro de 2010 a março de 2011.

O sangue foi centrifugado a 2500g por 10 minutos para obtenção do soro, em seguida foi colocado em microtubos de 1,5 ml e posteriormente armazenado a – 20°C até a realização da prova de soroaaglutinação. O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fisiopatologia da Reprodução do centro de ciências agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Para a pesquisa de aglutininas anti-leptospiras utilizou-se a prova de soroaaglutinação microscópica (SAM), segundo as recomendações de Faine et al. (1995)

O antígeno utilizado para a reação de ELISA IgG foi a lipoproteína rLipL32. O protocolo de execução dos testes de ELISA-IgG foram realizados segundo Bomfim et al., (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 285 amostras sorológicas de fêmeas bovinas, com idade maior ou igual a 24 meses, 140 (49%) foram reagentes na SAM para qualquer um dos 28 sorovares de *Leptospira spp*, com títulos variando entre 100 a 3200 e 164 foram reagentes no teste de ELISA (57,5%).

No presente estudo, verificou-se, baseado na SAM que os municípios de Piracuruca e Caraúbas apresentaram o maior número de animais reagentes (ambos com percentual de 65%), seguido dos municípios Parnaíba (52%), Caxingó (45%), Murici dos Portelas (40%), Luís Correia (29%) e Ilha

Grande (25%). Dentre os animais reagentes 62 apresentaram reação para um único sorovar, sendo o de maior ocorrência o sorovar Hardjo (24/62). Seis animais apresentaram títulos de anticorpos de 100, 14 de 200 e 4 de 400. Os animais que reagiram ao sorovar Hardjo corresponderam a 38,7% (24/62), seguidos dos sorovares icterohaemorrhagiae 14,5% (9/62), butembo 12,9% (8/62), Grippotyphosa 11,3% (7/62), Pomona 9,7% (6/62), Australis 4,8% (3/62), Autumnalis 3,2% (2/62) e Canícola 1,6%(1/62).

Os resultados encontrados no presente estudo reafirmam achados anteriores realizados na mesma região em que o sorovar Hardjo foi o mais prevalente, seguido por Wolffi (MINEIRO, 2007). Este sorovar foi o mais observado neste estudo, o que pode ser explicado principalmente pelo papel do bovino como mantenedor deste sorovar (ELLIS et al., 1981). Segundo estes autores, os dois principais genótipos de hardjo mantidos pelos bovinos são *hardjobovis* e *hardjoprajtino*.

Nas 285 amostras de soro das fêmeas bovinas suspeitas de leptospirose a taxa de positividade encontrada foi de 57,3%. O rLipL 32 mostrou ser um antígeno altamente sensível, uma vez que identificou 25 soros positivos entre os 139 soros que se apresentaram negativos na reação de SAM (considerada padrão-ouro). O uso do ELISA para o diagnóstico de leptospirose bovina é relativamente recente. A sensibilidade e a especificidade do teste em detectar anticorpos específicos em amostras de soro bovino têm sido estudadas (ADLER et al., 1982; SURUJBALLI et al., 2001; BONFIM, 2005).

As proteínas de membrana da *Leptospira* podem ser consideradas antígenos altamente conservados e estáveis e por isso há interesse nessas proteínas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE; MATSUNAGA, 2005). A Lip L32 é uma das principais proteínas externas de membrana cuja expressão é restrita às espécies patogênicas (BISWAS ET al., 2005). Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro à LipL32 é bastante intensa. Essas características sugerem que a LipL32 seja adequada ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE et al., 2000).

As vantagens da utilização de antígenos recombinantes para o diagnóstico da leptospirose são: alta sensibilidade e especificidade, dispensa o uso de extrato antigênico total preparado de leptospirosas patogênicas (sendo desnecessário todo aquele extensivo controle de qualidade utilizado para monitorar grandes volumes de cultivo), interpretação objetiva dos resultados, estabilidade do antígeno e a gênero-especificidade deste antígeno (BONFIM,2006)

CONCLUSÃO

A partir dos resultados das reações sorológicas SAM e ELISA IgG em 285 amostras de soro bovino pode-se concluir a presença de leptospirose na bacia leiteira de Parnaíba, nas fêmeas bovinas em idade reprodutiva , confirmando as suspeitas clínicas.

Concluiu-se que o método ELISA com o antígeno recombinante LipL 32 é mais sensível e acurado do que o de soroaglutinação microscópica.

REFERÊNCIAS

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.1, p.89-94, 2005.

BISWAS, D., et al. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India. **Indian Journal of Medical Research**, v.121, n.3, p.151-158, 2005

HAAKE, D. A., et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospiral membrane proteins- variations on a theme? **Indian Journal of Medical Research**, v.121, n.3, p.143-5, 2005.

MINEIRO, A.L.B.B., et al. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007.

MINEIRO, A.L.B.B., et al. Pesquisa de sorovares de leptospiras em rebanho bovino leiteiro no estado do Piauí, Brasil, **Arquivo do Instituto Biológico**, v.77, n. 1, p.129-132, 2010.

Palavras-chave: bacia leiteira. Parnaíba. diagnóstico de leptospirose.