

Infecção experimental em suínos jovens com *Leptospira interrogans* sorovar *wolffi*: determinação de parâmetros bioquímicos

Experimental infection by *Leptospira interrogans* serovar *wolffi* in young pigs: Determination of biochemical parameters

José Carlos Rende^I Everlon Cid Rigobelo^I José Moacir Marin^{II} Fernando Antonio de Ávila^{III}

RESUMO

Um estudo sobre infecção experimental foi realizado em oito suínos, com idade média de 90 dias, machos castrados, da raça Wessex, e distribuídos em dois grupos de quatro suínos cada. Durante 36 dias, foram analisadas as alterações bioquímicas nos soros dos suínos dos dois grupos. O Grupo I foi mantido como testemunho e recebeu 5,0mL de solução fisiológica estéril por via intravenosa (veia cava craniana) e, no Grupo II, os suínos foram inoculados pela mesma via com 5,0mL de cultura de *Leptospira interrogans* sorovar *wolffi*, amostra L-10 selvagem isolada de tatu (*Dasyus novemcinctus*), contendo $1,0 \times 10^8$ leptospiras mL⁻¹. A partir do terceiro dia após a inoculação e em intervalos de 72 horas até o décimo oitavo dia, foram feitas coletas de sangue, sem anticoagulante, dos animais inoculados e testemunhas. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: bilirrubina total, direta e indireta, ácidos graxos, glicose e proteínas plasmáticas. Foi detectado um aumento da bilirrubina direta no terceiro dia e um aumento no sexto dia da bilirrubina total e indireta após a inoculação. As dosagens de glicose, ácidos graxos e proteínas plasmáticas apresentaram uma diminuição a partir do terceiro dia da inoculação. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o aumento das taxas de bilirrubinas levam a uma definição de um diagnóstico de hemólise aguda, e que a hipoglicemia, a hipolipidemia e a hipoproteinemia podem estar relacionadas com lesões hepáticas e a uma septicemia. Todas as dosagens em todos os animais retornaram aos seus valores normais a partir do décimo quinto dia.

Palavras-chave: Leptospirose, suínos, infecção experimental, testes bioquímicos.

ABSTRACT

Eight, 90 days old pigs, of the Wessex lineage all castrated male were used in experiment, divided into two groups of four animals. Biochemical alterations in the serum of the

animals were analyzed in both groups during 36 days. Control (Group I) received 5.0mL of a 0.9% sterile sodium chloride solution by intracranial vein injection; Group II animals were inoculated by the same way with 5.0mL of a cell culture containing 1.0×10^8 cells mL⁻¹ of *Leptospira interrogans* serovar *wolffi*, wild strain L-10, isolated from a wild species of Brazilian "armadillo" (*Dasyus novemcinctus*). Three days after inoculation, blood was collected without anticoagulant; the same process was repeated at 72 hours intervals during eighteen days in both, control and experimental groups. Quantitative biochemical parameters were direct, indirect and total bilirubin, fatty acids and serum proteins. The experimental animals showed an increase of direct bilirubin three days after inoculation. Increases in indirect and total bilirubin were, also, observed after six days. Glucose, fatty acids and serum proteins decreased after the third day of inoculation. In conclusion, the increase in bilirubin levels could be due to acute hemolysis; hypoglycemia, hypolipidemia and hypoproteinemia that could be related to hepatic lesions and septicemia. All parameters returned to normal levels after fifteen days, in all animals tested.

Key words: Leptospirosis, swine, experimental infection, biochemical tests.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença zoonótica causada por bactéria da família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*, que pode ser encontrada em várias partes do mundo. A infecção por leptospiras tem sido relatada em seres humanos, bovinos, suínos, eqüinos, caprinos cães, roedores e em diversas espécies de animais silvestres no Brasil e no mundo (SCHENCK, 1976; TRAGLIABUE & FARINA, 1995).

^IPrograma de Pós-graduação em Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual de São Paulo (FCAV/UNESP), Campus Jaboticabal. Rodovia Paulo Donato Castellane Km 5, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: favila@fcav.unesp.br ou everlonagro@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil. E-mail: jmmarin@forp.usp.br.

^{III}Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: favila@fcav.unesp.br.

De acordo com OLIVEIRA (1988), a leptospirose é uma doença de manifestação aguda entre o terceiro e o décimo quarto dia após a infecção. Segundo RAMOS et al. (1981), essa doença pode-se tornar crônica após esse período e, nos últimos 30 anos, os suínos têm sido apontados como os mais importantes animais domésticos portadores de leptospira, sendo responsabilizados por ocorrências epidêmicas no homem e em outras espécies domésticas.

KINGSCOTE (1986) relatou que *Leptospira interrogans* sorovar *pomona* poderia ser considerado o mais importante agente de problemas relacionados com falhas reprodutivas dos suínos; no entanto, POWER (1991), OLIVEIRA et al. (1994), GIRIO et al. (1998) e SCHÖNBERG et al. (2000) citam como causadores desses transtornos os sorovares *bratislava* e *icterohaemorrhagiae*. Vários estudos são encontrados na literatura sobre infecção experimental em suínos com diferentes sorovares *leptospiras*. BURNSTEIN & BAKER (1954), WOODS et al., (1962), STALHEIM (1973) induziram infecção com o sorovar *pomona*, HANSON et al. (1971) com o sorovar *gripotyphosa*, FARINA et al. (1977) com o sorovar *bratislava* e INZANA & DAWE (1979) com o sorovar *autumnalis*.

Em suínos, dosagens bioquímicas no sangue envolvendo bilirrubinas, glicose, ácidos graxos e proteínas plasmáticas em resposta a infecções experimentais por leptospira são escassas na literatura. Segundo MORAIS et al. (2000), as dosagens bioquímicas no sangue podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e no tratamento de animais. De acordo com COLES (1984) e DOMAS & WU (1991), a determinação das bilirrubinas representam um parâmetro para detectar hemólise aguda.

Considerando a alta incidência do sorovar *wolffi* relatada após um levantamento sorológico, em suínos com histórico de falhas reprodutivas, realizado em Minas Gerais por AVILA et al. (1977), o presente trabalho teve como objetivo relacionar os resultados bioquímicos com a infecção induzida por esse sorovar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, no presente experimento, oito suínos da raça Wessex, machos castrados com aproximadamente 90 dias de idade, mantidos durante todo o experimento em baias cobertas e cimentadas. Os animais foram alimentados com ração ($\pm 0,8$ kg suíno⁻¹ dia⁻¹) e submetidos a idênticas condições usuais de manejo em suinocultura. Antes de se iniciar o experimento, todos os animais foram submetidos a exames clínicos e sorológicos (leptospirose, brucelose e toxoplasmose). Os animais foram distribuídos em dois

grupos de quatro suínos cada: Grupo I – suínos-testemunho e Grupo II – suínos-teste. O Grupo I foi mantido como testemunho e recebeu 5,0mL de solução fisiológica estéril por via intravenosa (veia cava craniana) e, no Grupo II, os suínos foram inoculados pela mesma via com 5,0mL de cultura de leptospira sorovar *wolffi*, amostra L-10 selvagem isolada de tatu (*Dasyurus novemcinctus*), contendo $1,0 \times 10^8$ leptospira mL⁻¹.

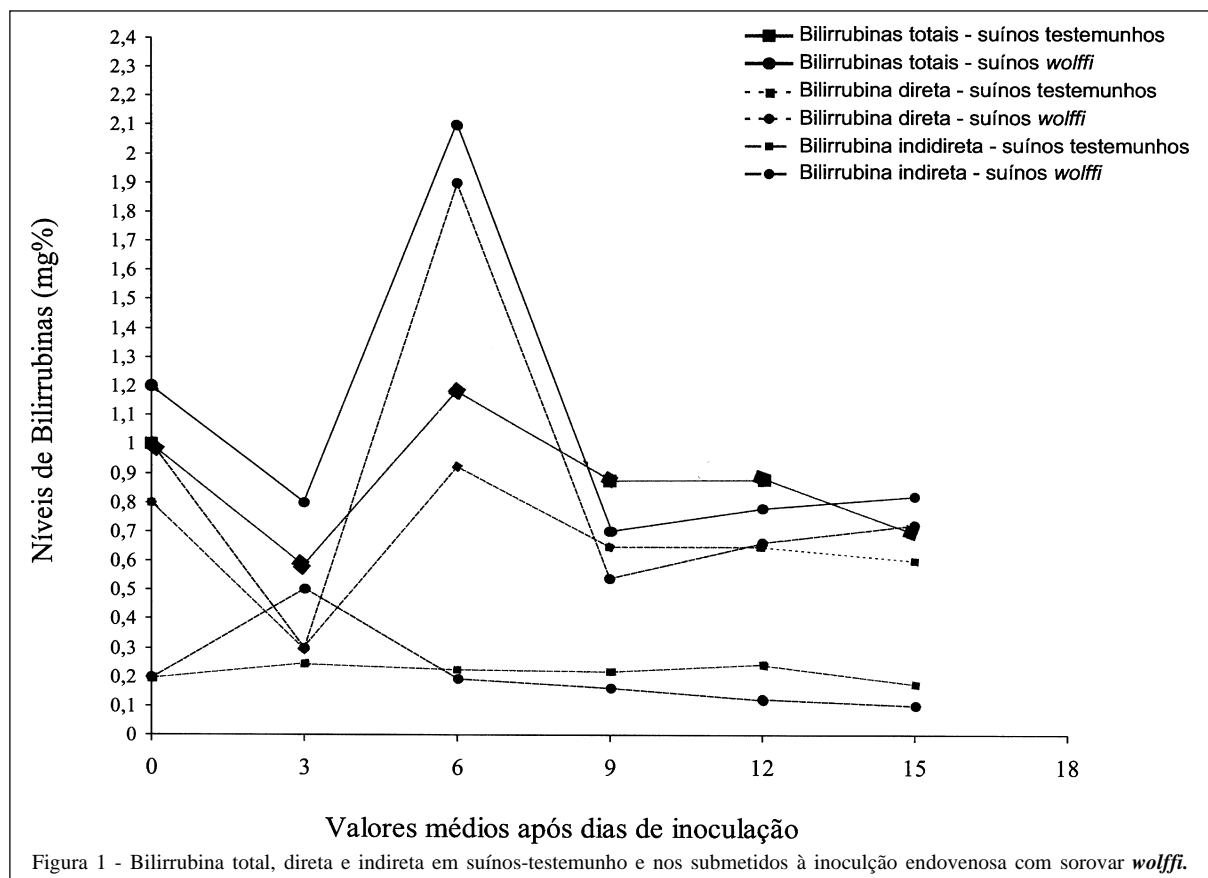
Amostras de sangue (5,0mL) dos suínos dos dois grupos foram obtidas por punção venosa da veia cava craniana, utilizando agulhas estéreis e tubos a vácuo estéreis sem anticoagulante, devidamente identificados, a partir do terceiro dia após a inoculação até o décimo oitavo dia, com intervalos de 72 horas entre cada coleta. Das amostras de sangue, foram obtidos soros e estes foram centrifugados sob refrigeração a 1.500r.p.m. durante 15 minutos. As amostras de soros foram colocadas em frascos de 5,0mL estéreis e armazenados em congelador a -20°C até o momento das análises.

As amostras de soros dos animais do Grupo II foram submetidas às seguintes dosagens: bilirrubina total e direta utilizando a técnica colorimétrica de SIMS-HORN – Kit Labteste; ácidos graxos, segundo a técnica de DOLE & MEINERTZ (1960); glicose, pelo método enzimático – glicose oxidase – Kit Labteste e proteínas plasmáticas determinadas pelo método do biureto – KIT Labteste. As mesmas dosagens foram realizadas nos soros dos animais do Grupo I – testemunhos.

A análise de regressão linear ($P < 0,5$) comparou os resultados dos testes bioquímicos entre os suínos do Grupo II inoculados com leptospira sorovar *wolffi* e os suínos do Grupo I inoculados com solução fisiológica estéril.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, são apresentados os resultados obtidos para a dosagem da bilirrubina total, direta e indireta, nos suínos do Grupo I, inoculados com solução fisiológica estéril e nos suínos do Grupo II inoculados com o sorovar *wolffi*. Pela análise dos dados, pode-se verificar um aumento significativo da bilirrubina total nos suínos do grupo inoculado comparado com os valores da bilirrubina total dos suínos do grupo testemunho. A partir do nono dia, não houve diferença significativa entre os testes de bilirrubina total dos dois grupos, cujos valores ficaram próximos dos níveis iniciais. O aumento da bilirrubina total, no sexto dia, nos animais infectados está de acordo com BACILA (2003) e BUSH (2004), que relataram uma hiperbilirrubinemia associada a uma hemólise aguda grave e hemopatias infecciosas.



Na figura 1, também são apresentados os resultados obtidos para a dosagem de bilirrubina direta nos suínos dos Grupos I e II. Com relação ao Grupo II, observa-se um aumento nos níveis de bilirrubina direta no terceiro dia após inoculação, os quais voltaram aos valores iniciais a partir do sexto dia, não havendo mais alterações quando comparados com os valores dos suínos do Grupo I. Esse aumento de bilirrubina direta no terceiro dia, observado nos suínos do Grupo II, pode ser devido a uma hemólise, o que indica que o fígado não apresenta nenhuma lesão e sugere uma eficiência na conjugação hepática da bilirrubina com o ácido glicurônico, o que está de acordo com MURRAY et al. (2000), que relataram que, quando há lesões hepáticas, essas provocam danos nas células hepáticas parenquimatosas, dificultando a conjugação.

Quanto aos valores de bilirrubinas indiretas, pode-se observar que, entre o início do experimento e o terceiro dia, houve uma diminuição seguida de um aumento dos níveis no sexto dia, nos animais inoculados com o sorovar *wolffi* e que, a partir do nono dia, foi verificada uma queda nos valores, que se mantiveram estáveis até o décimo quinto dia. Um comportamento semelhante foi observado nos suínos testemunho, entretanto esse aumento da bilirrubina

indireta, nesse grupo, foi discreto quando comparado aos animais inoculados. Essa diminuição do nível de bilirrubina indireta no terceiro dia após a inoculação com soro sorovar *wolffi* está de acordo com BUSH (2004), que relatou que, após uma hemólise, a bilirrubinemia indireta não é aparente nas primeiras horas. O aumento acentuado da bilirrubina indireta no sexto dia parece indicar uma hemólise excessiva, o que está em acordo com BRETCHER & BESSIS (1972) e BESSIS (1973). Esses autores relataram que algumas toxinas bacterianas provocam alteração no metabolismo dos carboidratos das hemácias com uma conseqüente diminuição de ATP. Essa seria uma possível explicação para a perda da motilidade do sistema contrátil da membrana das hemácias. Também, segundo THOMPSON & MANKTELOW (1986), essa perda de motilidade provoca uma alteração na morfologia do eritrócito, passando de disco bicôncavo para uma forma esférica (esferocitose). Essa anormalidade resultaria na detecção e remoção das células esferocíticas, pelo sistema retículo-macrófago (baço, fígado, medula óssea), onde seriam destruídas com liberação de hemoglobina, que seria transformada em bilirrubina.

Na figura 2 estão os resultados das dosagens de ácidos graxos nos suínos dos dois

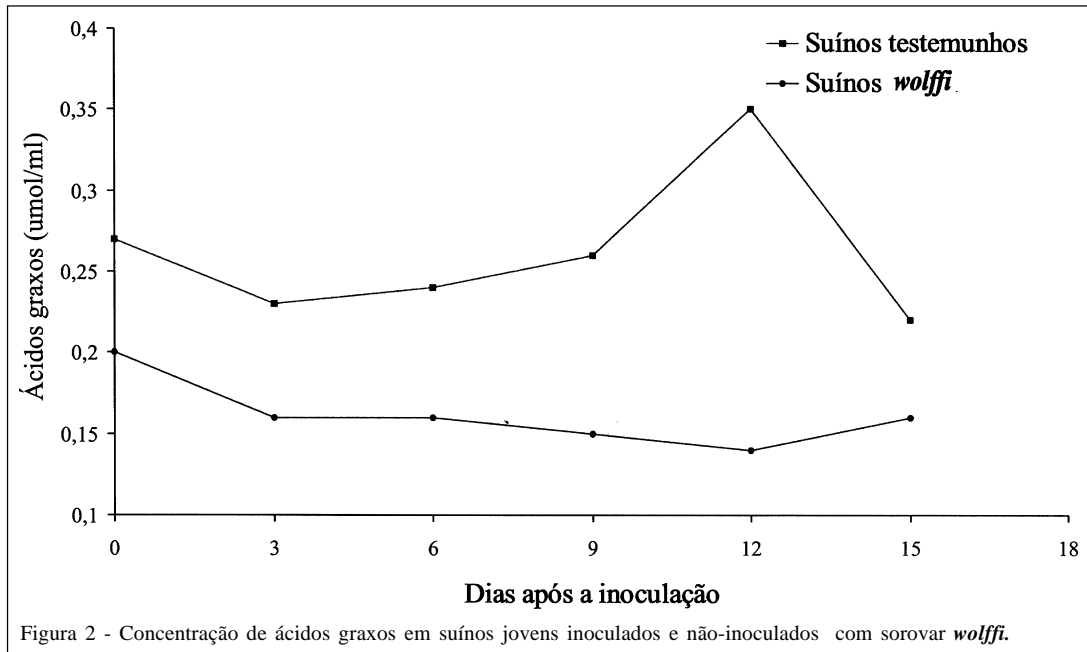


Figura 2 - Concentração de ácidos graxos em suínos jovens inoculados e não-inoculados com sorovar *wolffi*.

grupos. Observa-se uma queda dos níveis de ácidos graxos nos suínos inoculados, enquanto nos suínos do grupo testemunho há uma queda e logo em seguida uma elevação, sendo o maior valor detectado no décimo segundo dia. A diminuição dos ácidos graxos nos suínos inoculados com o sorovar *wolffi* está de acordo com MURRAY et al. (2000), que relataram que uma hipolipidemia é secundária a uma hipoglicemia.

Na figura 3, verifica-se que os níveis de glicose apresentam uma diminuição até o terceiro dia após a inoculação, seguida de aumento constante até

ultrapassar, no décimo quinto dia, os valores iniciais. No grupo testemunho, também verificou-se uma queda das taxas de glicose, seguida de aumento a partir do terceiro dia, atingindo o valor máximo no nono dia e diminuindo a valores menores do que os iniciais entre o décimo segundo e o décimo quinto dia. A hipoglicemia observada está de acordo com LATIMER et al. (2003), que relataram a ocorrência de um aumento do consumo de glicose pelos tecidos, em caso de septicemia.

As dosagens de proteínas plasmáticas estão mostradas na figura 4. Não foram verificadas alterações

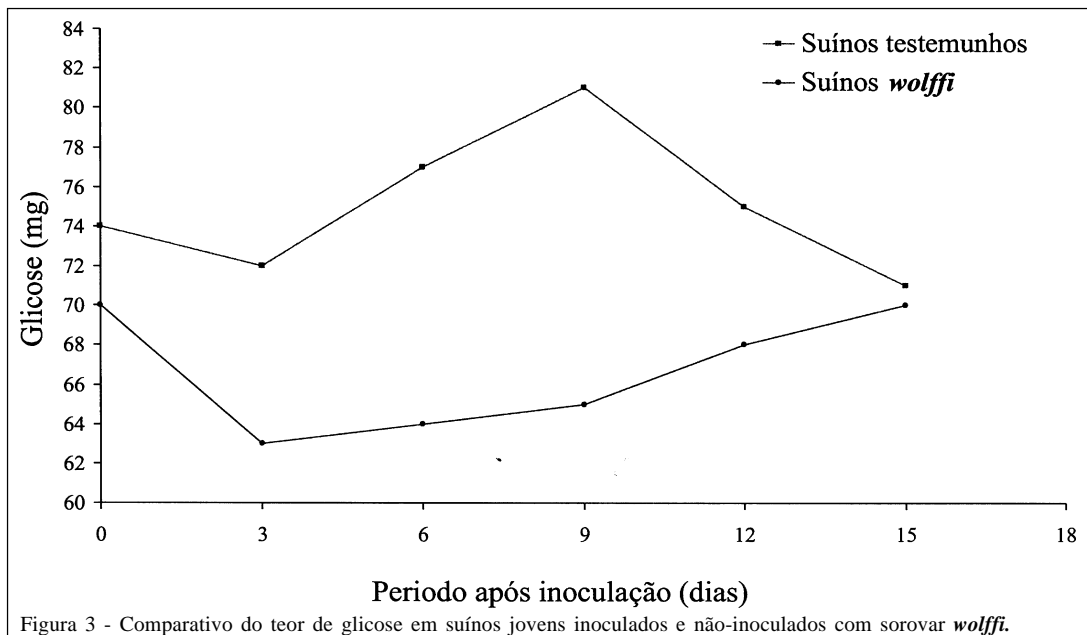
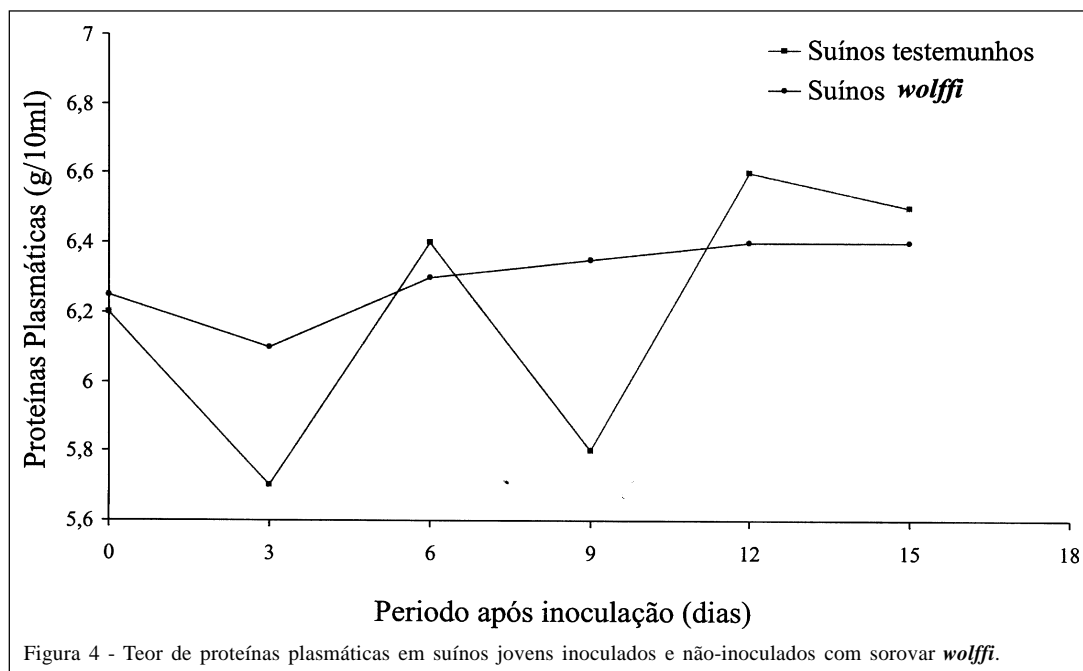


Figura 3 - Comparativo do teor de glicose em suínos jovens inoculados e não-inoculados com sorovar *wolffi*.



significativas nos níveis de proteínas plasmáticas, apesar de haver uma diminuição no terceiro dia, nos suínos do Grupo II, após a inoculação com sorovar *wolffi*. Essa hipoproteinemia nos animais inoculados, poderia estar relacionada com uma discreta lesão hepática, que pode ter sido provocada pela infecção leptospírica (BURTIS & ASHWOOD, 1998). BUSH (2004) relata que, em casos de septicemia e bacteremia, pode haver um aumento da permeabilidade capilar que permite o extravasamento de albumina para compartimentos extravasculares, o que possivelmente poderia comprovar a septicemia ter começado no terceiro dia neste experimento.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o modelo de indução de leptospirose mediante a inoculação intravenosa do sorovar *wolffi* mostrou-se efetivo. As variações bioquímicas no sangue dos suínos inoculados com sorovar *wolffi* foram: hipolipidemia, hipoglicemia e hipoproteinemia, sugerindo uma lesão hepática e septicemia bacteriana. A hiperbilirrubinemia pode indicar que a principal causa da toxicidade do sorovar *wolffi*, neste trabalho, é uma anemia hemolítica grave.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, F.A. et al. Frequência de aglutininas anti-leptospiras em soros de suínos de Minas Gerais. *Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, v.29, n.3, p.263-268, 1977.

BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003. 583p.

BESSIS, M. **Living blood cells and their ultrastructure**. New York: Springer Verlag, 1973. 717p.

BRETCHER, G.; BESSIS, M. Present status of spiculed red cell, and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: a critical review. *Blood*, v.40, p.333-344, 1972.

BURNSTEIN, T.; BAKER, J. Leptospirosis in swine caused by *Leptospira Pomona*. *Journal of Infectious Diseases*, New York, n.94, p.52-64, 1954.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Fundamentos de química clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 842p.

BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 276p.

COLES, E.H. Função hepática. In: COLES, E.H. **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1984. p.185-219.

DOLE, V.F.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *Journal of Biology and Chemistry*, v.235, p.25-95, 1960.

DOMAS, B.T.; WU, T.Y. The measurement of bilirubin fraction in serum. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, v.28, p.415-445, 1991.

FARINA, R. et al. *Leptospirosis* in swine: experimental infection with serotype *bratislava*. *International Journal of Zoonosis* v.4, p.38-44, 1977.

GIRIO, R.J.S. et al. Alterações reprodutivas e anatomopatológicas em fêmeas suínas com títulos de anticorpos contra *Leptospira*

- interrogans* sorotipo *icterohaemorrhagiae*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.5, n.3, p.99-103, 1998.
- HANSON, L.E. et al. Leptospirosis in swine caused by serotype *grippityphosa*. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, n.6, p.855-860, 1971.
- INZANA, T.J.; DAWES, D.L. Experimentally induced *Leptospira interrogans* serovar *autumnalis* infections in young swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.10, p.1355-1358, 1979.
- KINGSCOTE, B.F. Leptospirosis outbreak in Piggery in Southern Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, n.27, p.188-190, 1986.
- LATIMER, K.S. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 4.ed. Iowa: A Blackwell, 2003. 450p.
- MORAIS, M.G. et al. Variação sazonal de bioquímica clínica de vacas aneladas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootécnica** v.52, n.9, p.98-104, 2000.
- MURRAY, R.K. et al. **Harper's biochemistry**. 25.ed. Connecticut: Appleton & Lange, 2000. 927p.
- OLIVEIRA, S.J. Leptospirose em Suínos. **A Hora Veterinária**, ano.7, n.41, p.5-8, 1988.
- OLIVEIRA, S.J. et al. Evidências de infecção por *Leptospira bratislava* em transtornos reprodutivos em suínos. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p.345-348, 1994.
- POWER, S.B. Diagnosing *Leptospira* in pigs. **Veterinary Record**, v.128, p.43, 1991.
- RAMOS, A. et al. Inquérito sociológico de leptospirose em suínos no Estado do Rio de Janeiro e região limítrofe. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.1, n.3, p.81-83, 1981.
- SCHENCK, J.A.P. **Isolamento de leptospira do sorogrupo *hebdomadis* de tatus (*Dasyprocta novemcinctus*) capturados no Estado de Minas Gerais**. 1976. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- SCHÖNBERG, A. et al. *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* in pig breeding herds. In: GERMANY INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY, 3., 2002, Bridgetown, Barbados. **Proceedings...** Bridgetown, Barbados: Internacioanl Leptospiros Society, 2002. 276p. p.49.
- STALHEIM, O.H.V. Urinary precipitate in porcine leptospirosis. **Cornell Veterinary**, v.64, p.20-24, 1973.
- TAGLIABUE, S.; FARINA, R. Inchiesta sieropidemiologica sulla diffusione delle leptospirosi negli animali domestici ed alcune specie selvatiche. **Selezione Veterinária**, v.36, n.11-12, p.941-953, 1995.
- THOMPSON, J.C.; MANKTELOW, B.W. Pathogenesis and red blood cell destruction in haemoglobinaemic leptospirosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.96, p.529-538, 1986.
- WOODS, G.T. et al. Experimental infection of swine with *Leptospira ballum*. **Zoonoses Research**, New York, v.1, n.10, p.165-184, 1962.