

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-LISTERIA MONOCYTOGENES EM SOROS DE BOVINOS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

RAUL JOSÉ SILVA GIRIO

Auxiliar de Ensino

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

"Campus" de Jaboticabal-FCAVJ/UNESP

ARAMIS AUGUSTO PINTO

Professor Adjunto

Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Professor Colaborador

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

"Campus" de Jaboticabal-FCAVJ/UNESP

JULIETA MIWA TERUYA

Pesquisadora Científica

Instituto Biológico de São Paulo

INTRODUÇÃO

O agente etiológico da listeriose (*Listeria monocytogenes*), está amplamente disseminado pela natureza, causando ou não alterações patológicas, traduzidas, na maioria das vezes, por quadros de encefalites e abortamentos em grande variedade de hospedeiros, principalmente na espécie bovina (YOUNG e FIREHAMMER²⁰, 1958; OSEBOLD e cols¹³, 1960; BEINFERT e cols¹, 1969; URBAN e cols¹⁹, 1973; DIJKSTRA⁵, 1976).

No Brasil, são poucos os trabalhos que dizem respeito a essa enfermidade. Assim HOFER¹⁰ (1971) relata o isolamento e a identificação da *Listeria monocytogenes* a partir do encéfalo de bovino com quadro neurológico cuja suspeita clínica fora de encefalite rábica.

TERUYA e cols¹⁸ (1977), empregando a técnica de soro-aglutinação lenta, realizaram um estudo sorológico em um total de 9318 soros, sendo 7809 da espécie bovina, 838 da espécie equina e 671 da espécie suína, todos provenientes de municípios do Estado de São Paulo. Os resultados revelaram 17,8% de reagentes entre os bovinos, 22,8% entre os equinos e 14,3% entre os suínos.

MORAES e cols¹¹ (1979), ao examinarem 184 soros de bovinos provenientes do município de Poços de Caldas-MG, utilizando da prova de soro-aglutinação lenta, encontraram apenas um único soro com título positivo para *L. monocytogenes*.

Na espécie humana SANTA ROSA e cols¹⁵ (1974) estudaram a associação da infecção por listeria em 199 pacientes com distúrbios mentais, tendo encontrado 100 (50%) soros reagentes à prova de soro-aglutinação lenta.

Segundo a pesquisa realizada por ESPER e cols⁶ (1978) 12 amostras de *Listeria monocytogenes* foram isoladas do líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita clínica de meningite.

HOFFER⁸ (1974) isolou, identificou e estudou a ocorrência de portadores de *Listeria monocytogenes* em fezes de trabalhadores de frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro.

No presente trabalho relata-se a presença de aglutininas anti-*Listeria monocytogenes* em soros de bovinos da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, tendo-se realizado também um estudo sorológico comparativo entre a prova de soro-aglutinação lenta e a de fixação do complemento, nos soros de bovinos considerados positivos e de alguns considerados reagentes à prova de soro-aglutinação lenta.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 1000 amostras de soros bovinos, pertencentes a sete municípios da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. As amostras foram colhidas no período de 1979 a 1980 e os animais amostrados eram

GIRIO, R.J.S.; PINTO, A.A.; TERUYA, J.M. Pesquisa de anticorpos anti-*Listeria monocytogenes* em soros de bovinos da região de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo, Brasil. Rev.Fac. Med.vet.Zootec.Univ.S.Paulo, 19(2):125-30, 1982.

RESUMO: Exames sorológicos para *Listeria monocytogenes* foram realizados em 1000 amostras de soros bovinos da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil, tendo-se utilizado da prova de soro-aglutinação lenta com antígenos somáticos dos sorotipos L₁, L₂, L₃, L_{4a} e L_{4b}. Foram considerados reagentes todos os soros com títulos superiores a 1:20 e como positivos somente os soros com títulos iguais ou superiores a 1:320. Com base nesse critério, 193 (19,3%) soros foram reagentes e 16 (1,6%) soros positivos para os sorotipos L₁, L₂ e L_{4b}, tendo o sorotipo L_{4b} apresentado a maior frequência. Todos os 16 soros positivos e 32 dos 193 soros reagentes à prova de soro-aglutinação foram submetidos à prova de fixação do complemento. Títulos elevados nas provas de fixação do complemento correspondiam a títulos também elevados na prova de soro-aglutinação.

UNITERMOS: Globulinas*; Listeriose, bovinos*; Teste de fixação do complemento*; Soroaglutinação

aparentemente sadios e recebiam material ensilado como suplementação alimentar. O método utilizado na pesquisa aglutininas anti-*Listeria monocytogenes* foi a reação de soro-aglutinação lenta, segundo a técnica descrita por SEELIGER¹⁶ (1961), utilizando-se para tanto antígenos somáticos dos sorotipos L₁, L₂, L₃, L_{4a} e L_{4b}, preparados de acordo com a técnica de GRAY e KILLINGER⁷ (1966), com as modificações descritas no trabalho de CSEBOLD e cols¹² (1965). Foram considerados reagentes os soros com títulos superiores a 1:20 e positivos os que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:320. Após a realização da prova de soro-aglutinação lenta, as amostras consideradas positivas e mais 32 das 193 reagentes foram testadas pela reação de fixação do complemento, segundo a técnica descrita por BIER e cols² (1968). Foi utilizada como antígeno fixador do complemento, uma mistura de sorotipos L₁, L₂, L₃, L_{4a} e L_{4b}, na sua dose de reatividade ótima determinada com os respectivos soros hiperimunes específicos preparados em coelhos.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com os soros sanguíneos de bovinos oriundos dos sete municípios estudados, estão

condensados na tabela 1. Dos 1000 soros examinados, 791 (79,1%) foram negativos, 193 (19,3%) reagentes e apenas 16 (1,6%) foram positivos à prova de soro-aglutinação lenta para *Listeria monocytogenes*.

Dos 16 soros positivos à prova de soro-aglutinação lenta, relacionados na tabela 2 de acordo com os sorotipos e procedência, 15 apresentaram título 1:320 e um apresentou título 1:640. O sorotipo L_{4b} ocorreu oito vezes (50%), o sorotipo L₁ sete (43,7%) e o L₂ uma única vez; os sorotipos L₃ e L_{4a} não foram encontrados.

Na tabela 3, estão sumarizados os resultados dos títulos obtidos no estudo das 48 amostras de soros, 32 reagentes e 16 positivos à prova de soro-aglutinação lenta obtidos com o respectivo antígeno homólogo específico, e os correspondentes títulos fixadores do complemento. Os títulos dos anticorpos fixadores do complemento, encontrados nas 48 amostras, variaram de 1:10 a 1:200. Com exceção do soro n^o 34, cujo título fixador do complemento foi de 1:20 e o correspondente título obtido na prova de soro-aglutinação lenta foi de 1:160, nos demais soros estudados, títulos elevados encontrados na reação de fixação do complemento correspondiam a títulos também elevados na prova de soro-aglutinação lenta demonstrando relação entre as duas provas.

TABELA 1 — Resultados dos soros bovinos negativos, reagentes e positivos ao teste de soro-aglutinação lenta para *Listeria monocytogenes*, pertencentes a sete municípios da Divisão Regional Agrícola de Ribeirão Preto, SP, no período de 1979 a 1980.

Municípios	N ^o de Amostras						
	Examinadas	Negativas	%	Reagentes	%	Positivas	%
Cravinhos	105	91	86,6	12	11,4	02	1,9
Jaboticabal	104	79	75,9	25	24,0	0	0
Ribeirão Preto	332	222	66,8	104	31,3	06	1,8
São Simão	120	102	85,0	14	11,6	04	3,3
Serrana	134	116	86,5	17	12,7	01	0,7
Sertãozinho	155	134	86,4	18	11,6	03	1,9
Pradópolis	50	47	94,0	03	6,0	0	0
TOTAL	1000	791	79,1	193	19,3	16	1,6

TABELA 2 — Resultados dos soros positivos para listeriose bovina pelo teste de soro-aglutinação lenta de acordo com sorotipos encontrados, pertencentes aos sete municípios da Divisão Regional Agrícola de Ribeirão Preto, SP, no período de 1979 a 1980.

Municípios	1:320							1:640				Total de soros positivos
	Título	L1	L2	L3	L4a	L4b	L1	L2	L3	L4a	L4b	
Cravinhos		02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02
Jaboticabal		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribeirão Preto		-	-	-	-	06	-	-	-	-	-	06
São Simão		03	-	-	-	-	01	-	-	-	-	04
Serrana		01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
Sertãozinho		-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	03
Pradópolis		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 3 — Resultados das 48 amostras de soros bovinos (32 reagentes e 16 positivas) obtidos pelas provas de soro-aglutinação lenta e de fixação do complemento, pertencentes a sete municípios da Divisão Regional Agrícola de Ribeirão Preto, SP, no período de 1979 a 1980.

Nº da Amostra	Prova diagnóstica		Nº da Amostra	Prova diagnóstica	
	S.A.L.	R.F.C.		S.A.L.	R.F.C.'
01	1:40	1:25	25	1:80	1:40
02	1:40	1:40	26	1:160	1:40
03	1:80	1:50	27	1:320	1:80
04	1:80	1:80	28	1:40	1:10
05	1:100	1:80	29	1:80	1:40
06	1:100	1:80	30	1:320	1:100
07	1:160	1:80	31	1:40	1:40
08	1:160	1:80	32	1:320	1:80
09	1:160	1:80	33	1:20	1:10
10	1:200	1:90	34	1:160	1:20
11	1:200	1:90	35	1:320	1:80
12	1:200	1:120	36	1:320	1:80
13	1:200	1:120	37	1:320	1:160
14	1:160	1:120	38	1:40	1:20
15	1:160	1:60	39	1:320	1:120
16	1:320	1:160	40	1:80	1:20
17	1:80	1:160	41	1:320	1:200
18	1:80	1:200	42	1:160	1:160
19	1:640	1:200	43	1:80	1:10
20	1:320	1:200	44	1:40	1:40
21	1:320	1:80	45	1:40	1:10
22	1:320	1:160	46	1:80	1:40
23	1:320	1:200	47	1:320	1:120
24	1:320	1:80	48	1:80	1:40

S.A.L. = Prova de soro-aglutinação lenta

R.F.C.' = Reação de fixação do complemento

DISCUSSÃO

Na presente investigação relata-se a presença de aglutininas anti-*Listeria monocytogenes* em bovinos da região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e os resultados de um estudo comparativo entre as provas de soro-aglutinação lenta e de fixação do complemento, objetivando não só a aplicabilidade desta última prova, como também a interpretação dos resultados sorológicos na listeriose bovina.

Em todos os sete municípios estudados foram encontrados 193 (19,3%) soros reagentes (tabela 1). Com exceção dos municípios de Jaboticabal e Pradópolis, nos demais foram detectados 16 (1,6%) soros positivos, dentre os quais 15 com títulos de 1:320 e apenas um soro com título de 1:640 à prova de soro-aglutinação lenta. Oito foram positivos para o sorotipo L_{4b}, sete para o sorotipo L₁ e um para o sorotipo L₂ (tabela 2).

Os dados aqui apresentados corroboram com os achados obtidos por pesquisadores brasileiros (TERUYA e cols¹⁸, 1977; MORAES e cols¹¹, 1979), demonstrando a ocorrência de aglutininas anti-*Listeria monocytogenes* em soros de bovinos. Os estudos sorológicos realizados pelos pesquisadores acima e o de SANTA ROSA e cols¹⁵ (1974), demonstraram que o sorotipo mais freqüentemente encontrado nas espécies bovina e humana foi o L₁ enquanto HOFER¹⁰ (1971), isolou o sorotipo L_{4b} de material encefálico de bovino com suspeita de encefalite rábica. Parece não haver dúvidas de que a *Listeria monocytogenes* esteja difundida em nosso meio; a propósito, HOFER¹¹ (1975) descreve o isolamento e caracterização desse microrganismo em água de esgoto e SILVA e PACHECO¹⁷ (1970) relatam a ocorrência de aglutininas anti-*Listeria* em roedores. Ressalte-se ainda que, nas propriedades pertencentes aos municípios de Cravinhos, Ribeirão Preto, São Simão, Serrana e Sertãozinho onde ocorreram reações positivas para o microrganismo (Tabela 2), houve histórico de abortamento em vacas e casos de encefalites não necessariamente relacionados a *Listeria monocytogenes*.

Embora sejam conhecidas as propriedades antigênicas da *Listeria monocytogenes* como elemento estimulante da produção de aglutininas, há restrições no critério de interpretações da prova de soro-aglutinação lenta, empregada na pesquisa de anticorpos contra essa doença, devido à ocorrência de reações cruzadas dos sorotipos L₁, L₃ e L_{4b} principalmente com *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* e microrganismos do grupo coliforme (SEELIGER¹, 1961; SANTA ROSA e cols¹⁵, 1974). Aglutininas contra os antígenos somáticos "O" do sorotipo L₁ estão normalmente presentes em animais domésticos, principalmente os da espécie bovina, em diluições que variam de 1:20 a 1:40, muitas vezes dificultando a interpretação do título sorológico encontrado (DEDIE³, 1955; DHANDA e cols⁴, 1959). Face ao exposto, os resultados das provas de soro-

aglutinação foram interpretados de acordo com as recomendações de SEELIGER¹⁶ (1961), que considera títulos de 1:20 a 1:160 sem significância patológica (soros reagentes), enquanto que títulos acima de 1:320 indicam infecções recentes ou presentes (soros positivos).

Os resultados obtidos no estudo comparativo entre os títulos dos antígenos aglutinantes e dos anticorpos fixadores do complemento (tabela 3), confirmam a possibilidade de utilização da segunda prova na pesquisa de anticorpos para listeriose bovina. Os resultados desta pesquisa abrem novas perspectivas de investigação no que concerne à pesquisa de anticorpos fixadores do complemento na listeriose bovina, obviamente após a realização de estudos específicos e mais detalhados, visando a eliminação das reações inespecíficas que ocorrem com as provas de soro-aglutinação. Na literatura mundial são poucos os trabalhos encontrados sobre o emprego e viabilidade da reação de fixação do complemento na listeriose. Segundo SEELIGER¹⁶ (1961) e PEREZ-MIRAVETE e ROMO¹⁴ (1968) esta prova parece menos específica do que a prova de soro-aglutinação lenta, devido à falta de ajustes técnicos ainda não solucionados. No Brasil, não encontramos referência a respeito.

CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos na presente investigação e de acordo com a discussão desenvolvida chegou-se às seguintes conclusões:

1. Das 1000 amostras de soros de bovinos examinados 1,6% foram positivas e 19,3% foram reagentes para a *Listeria monocytogenes*;
2. Dos cinco sorotipos pesquisados, o tipo L_{4b} foi o que apresentou a maior prevalência (50%);
3. O município que apresentou maior índice de positividade, nos soros examinados, foi o de São Simão (3,3%) sendo que no município de Serrana ocorreu o menor índice (0,7%);
4. A reação de soro-aglutinação lenta (SAL) apresentou títulos sorológicos mais elevados do que a reação de fixação do complemento.

GIRIO, R.J.S.; PINTO, A.A.; TERUYA, J.M. Search for antibodies against *Listeria monocytogenes* in cattle serum from Ribeirão Preto county, State of São Paulo, Brazil. *Rev.Fac.Med.vet. Zootec.Univ.S.Paulo*, 19(2): 125-30, 1982.

SUMMARY: Serological examinations were carried out for *Listeria monocytogenes* antibodies in 1000 cattle serum of the county of Ribeirão Preto, in the state of São Paulo, Brazil. The serum assay was carried out by serum agglutination test in tubes with somatic antigens from serotypes L₁, L₂, L₃, L_{4a} and L_{4b}. It was considered to be reagent all sera reacting in a titer of 1:20 being positive only the sera with 1:320 or above. According to this criteria 193 (19,3%) serum samples were positive for the serotypes L₁, L₂, and L_{4b}. The serotype L_{4b} was the more frequent. All 16 positive serum and 32 of the 193 reacting serum from agglutination reaction were submit to the complement fixation test. It was found that high titer in complement fixation test corresponded to high titer observed in the serum agglutination reaction.

UNITERMS: Complement fixation test*; Globulins*; Listeriosis of bovines*; Serum agglutination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – BEINFET, V.; LOMBA, F.; BINOT, H. Une affection en recrudescence ou trop souvent meconnue? L'encephalite bovine a listeria monocytogenes. *Ann. Med. vét.*, **113**:345-57, 1969.
- 2 – BIER, O.G.; SIQUEIRA, M.; ESTEVES, M.B. Quantitative studies of complement fixation I. – A simplified and accurate procedure based on 50 per cent hemolytic end point. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **10**:199-208, 1968.
- 3 – DEDIÉ, K. Beitrage zur Epizootologie der Listeriose. *Arch. exp. Vet.-Med.*, **9**:251-64, 1955.
- 4 – DHANDA, M.R.; LALL, J.M.; SETH, R.M.; CHANDRASEKARIAH, P. A case of listeric abortion in an ewe with small scale survey of the incidence of agglutinins to Listeria in the sera of sheep. *Indian vet. J.*, **36**:113-24, 1959.
- 5 – DIJKSTRA, R.G. Listeria encefalitis in cows through litter from brarler. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **161B**:383-5, 1976.
- 6 – ESPER, M.R.R.; PESSOA, G.V.A.; HOFER, E.; LEE, I.M.L'; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E.; CALZADA, C.T. Meningite por Listeria monocytogenes em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **38**:37-41, 1978.
- 7 – GRAY, M.L. & KILLINGER, A.H. Listeria monocytogenes and listeric infections. *Bact. Rev.*, **30**:309-71, 1966.
- 8 – HOFER, E. Contribuição ao estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de Listeria monocytogenes entre operários de matadouros e indivíduos com distúrbios entéricos. Rio de Janeiro, 1974. (Tese de livre docência – Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro).
- 9 – HOFER, E. Presença de Listeria monocytogenes em material encefálico de bovino. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **38**:285-7, 1971.
- 10 – HOFER, E. Isolamento e caracterização de Listeria monocytogenes em água de esgoto. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **73**:31-8, 1973.
- 11 – MORAES, F.R.; COSTA, A.J.; ENGRACIA DE MORAES, J.R.; ÁVILA, F.A.; COSTA, E.P. Freqüência de aglutininas anti-Listeria monocytogenes em soro de bovino do município de Poços de Caldas, M.G., Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, **31**:19-21, 1979.
- 12 – OSEBOLD, J.W.; ALLUND, O.; CHRISP, C.E. Chemical and immunological composition of surface structures of Listeria monocytogenes. *J. Bact.*, **89**:84-8, 1965.
- 13 – OSEBOLD, J.W.; KENDRICK, J.W.; NJOKU-OBI, A. Cattle abortion associated with natural Listeria monocytogenes infections. *J. Amer. vet. med. Ass.*, **137**:221-6, 1960.
- 14 – PÉREZ-MIRAVETE & ROMO, E. Respuesta inmunológica a la infección natural y experimental con Listeria monocytogenes. *Rev. lat-amer. Microbiol. Parasit.*, **10**:21-32, 1968.
- 15 – SANTA ROSA, C.A.; GOMES, M.C.D.; TERUYA, J.M.; COSCINA, A.L. Estudo sorológico para listeriose em doentes mentais. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **16**:222-5, 1974.
- 16 – SEELIGER, H.P.R. Listeriosis. New Iork, Hafner, 1961.
- 17 – SILVA, D.S. & PACHECO, G. Aglutininas antilistérias e antibrucelas em ratos capturados na Guanabara. *Rev. bras. Med.*, **76**:487-90, 1970.
- 18 – TERUYA, J.M.; SANTA ROSA, C.A.; GIORGI, W.; YANAGUITA, R.M. Serological study of Listeriosis in domestic animals in São Paulo-Brazil. *Inst. J. Zoonosis*, **4**:21-4, 1977.
- 19 – URBAN, V.P'; KALISHIN, N.M.; DUGIN, O. An epizootic of listeriose in cattle. *Sborn. Rab. Leningr. Vet. Inst.*, **24**:146-53, 1973.
- 20 – YOUNG, S. & FIREHAMMER, B.H. Abortion attributed to Listeria monocytogenes infection in a renege herd of beef cattle. *J.Amer. vet. med. Ass.*, **132**:434-8, 1958.

Recebido para publicação em: 01-06-82.

Aprovado para publicação em: 24-06-83.