

Padronização de *Dot*-ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soro bovino**Dot-ELISA standardization for the detection of antibodies anti-*Leptospira* in bovine serum**

DOI:10.34117/bjdv6n9-659

Recebimento dos originais: 26/08/2020

Aceitação para publicação: 29/09/2020

Caroline Dewes

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: caroldewesvet@hotmail.com

João Pedro Mello Silva

Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: jptam97@gmail.com

Flávia Aleixo Vasconcellos

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: aleixo.fv@gmail.com

Gabriele Benatto Delgado

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: gabriele_delgado@hotmail.com

Tanise Pacheco Fortes

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: tanisefortes@gmail.com

Iuri Vladimir Pioly Marmitt

Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: iurihrs@hotmail.com

Samuel Rodrigues Félix

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
Endereço: Avenida Leonel de Moura Brizola 2501, Bairro Pedra Branca, Bagé, RS, Brasil
E-mail: samuelrf@gmail.com

Éverton Fagonde da Silva

Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: fagondee@gmail.com

RESUMO

A leptospirose é reconhecida como uma importante causa de abortos em bovinos no mundo. Bovinos assintomáticos podem eliminar leptospiras através da urina por longos períodos. O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é recomendado como a principal ferramenta de diagnóstico no rebanho, mas não é adequado para a detecção de portadores. Diante disso, um *Dot-ELISA* foi comparado ao MAT, em uma avaliação inicial para o diagnóstico individual e rápido da leptospirose bovina. Trinta e quatro soros bovinos, sendo 17 reagentes e 17 não reagentes no MAT, foram usados. Os títulos de anticorpos variaram de 100 a 1600 para os sorovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjo* e *Grippotyphosa*. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o *Dot-ELISA* foi capaz de detectar anticorpos anti-*Leptospira* em 16 (94%) soros bovinos reagentes no MAT. Embora os resultados sejam promissores, ensaios adicionais são necessários a fim de padronizar a técnica para uso em larga escala, visando a triagem rápida de casos de leptospirose em bovinos a campo.

Palavras-chave: Imunodiagnóstico; Ensaio imunoenzimático; Anticorpos; Bovinos confinados

ABSTRACT

Leptospirosis is an important cause of abortion in cattle worldwide. Asymptomatic cattle may shed the leptospirae through urine for long periods. Microscopic agglutination test (MAT) is recommended as the primary diagnostic tool at the herd level but is not adequate for the detection of carriers. In this light, a *Dot-ELISA* was compared to the MAT, for the individual and rapid diagnosis of bovine leptospirosis. Thirty-four bovine sera, 17 of which were reactive and 17 non-reactive in the MAT, were used. Antibody titers ranged from 100 to 1600 for *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjo* and *Grippotyphosa* serovars. According to the results obtained in this study, *Dot-ELISA* was able to detect anti-*Leptospira* antibodies in 16 (94%) bovine sera reactive in MAT. Although the results are promising, additional tests are necessary in order to standardize the technique for large-scale use, aiming at the rapid screening of leptospirosis cases in cattle in the field.

Keywords: Immunodiagnosis; Immunoenzymatic assay; Antibodies; Confined cattle

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de âmbito global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* [1]. A leptospirose bovina é comumente caracterizada por infecções subclínicas e persistentes no trato reprodutivo causando problemas como, infertilidade, aborto, natimortos e aumento no intervalo entre partos. Além disso, os bovinos doentes podem tornar-se importantes

reservatórios do patógeno, pois eliminam a bactéria através da urina no ambiente [2]. Desse modo, a enfermidade também pode ser considerada como uma importante doença ocupacional, onde as profissões como as de magarefe, fazendeiro e veterinário são consideradas como fatores de risco para a enfermidade [1].

A Organização Mundial de Saúde considera o teste de soroaglutinação microscópica (MAT) como o teste-padrão ouro para o diagnóstico sorológico da leptospirose [3]. Apesar de apresentar uma boa sensibilidade e especificidade, o MAT possui limitações como a manutenção de um painel de antígenos vivos, por possuir um tempo demasiado para o resultado final, por ser laborioso e por necessitar de critérios padronizados para a interpretação dos resultados [2]. Nas últimas décadas, alguns ensaios vêm sendo padronizados visando um diagnóstico rápido para a leptospirose humana e animal [4-6]. Ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, apresentam vantagens quando comparados ao MAT, principalmente por serem menos laboriosos e de rápida execução [7].

O *Dot-ELISA* (também chamado de *Dot-Blot*) é uma técnica que utiliza um princípio semelhante ao ELISA. Devido a sua versatilidade, o ensaio pode ser usado como método quantitativo ou qualitativo [8]. Nos últimos anos, o *Dot-ELISA* tem sido desenvolvido para diagnosticar outras enfermidades [8-10], já que além das vantagens do ELISA, o ensaio possui um custo relativamente mais baixo, fácil aplicação na rotina laboratorial e que permite a detecção de anticorpos em pequenas quantidades de soro sem uso de aparelhagem sofisticada [11].

Visto a importância econômica e para a saúde humana e animal da leptospirose (*One Health*), o presente estudo objetivou padronizar de forma preliminar um *Dot-ELISA* para o diagnóstico sorológico da leptospirose bovina, visando a obtenção de um ensaio rápido para diagnóstico a campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue de bovinos provenientes de um confinamento para a exportação de animais vivos, localizado no município de Pelotas (RS). A coleta de sangue foi realizada por veterinários habilitados pelo Plano Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose e Encefalopatias Espongiformes (PNCBET) e foram enviadas ao laboratório do GEDTA/FV/UFPel para o processamento. Todas as 34 amostras bovinas utilizadas no estudo foram selecionadas a partir de uma amostragem previamente realizada, dentro de um rol de sete mil animais, em um estudo epidemiológico realizado pelo nosso grupo (dados não publicados). Com base no diagnóstico sorológico prévio, as amostras foram distribuídas em dois grupos, sendo 17 reagentes e 17 não reagentes. Para o controle do teste, seis (6) soros bovinos foram utilizados previamente caracterizados, sendo três (3) como controle negativo (CN) e três (3) como controle positivo (CP). Os soros foram obtidos através de centrifugação (5.000 x g) por 5 minutos, identificados e armazenados em criotubos, sendo conservados em freezer a -20°C até a realização das análises. Nenhum animal deste estudo tinha histórico de vacinação contra a leptospirose.

2.2 MAT

O MAT foi realizado de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde [3], utilizando-se uma diluição dos soros em 1:25 e um painel contendo 11 sorovares patogênicos (Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippothyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes) e um saprófita (Patoc 1). Os antígenos vivos foram mantidos a uma temperatura de 30°C em estufa bacteriológica, sendo utilizados no sétimo dia de crescimento. Para a padronização do antígeno, utilizou-se a concentração em $1-2 \times 10^8$ leptospiras/mL. O teste foi considerado positivo quando se encontrou 50% ou mais do antígeno aglutinado, ou quando a densidade do antígeno no complexo antígeno-anticorpo fosse menor que 50%.

2.3 DOT-ELISA

Na preparação do antígeno, leptospiras do sorovar Hardjo foram cultivadas a 30°C em estufa bacteriológica até a uma concentração de 10^8 leptospiras/mL. Após o crescimento, as células foram inativadas e centrifugadas em 5.000 x g durante 10min. O *pellet* formado foi ressuspendido com PBS estéril (pH 7,0) a fim de ajustar-se uma concentração de 10µL para cada reação. Para o

estabelecimento do formato do teste, seguiu-se o protocolo de Pappas e colaboradores (1985) [7] com modificações. Membranas de nitrocelulose (BioRad) de 0,22µm foram sensibilizadas com antígeno, esperando-se a absorção do antígeno na membrana por uma hora à temperatura ambiente. Após o período de sensibilização, as membranas foram submetidas ao tampão de bloqueio (PBS+Tween20; Caseína) e a imediata incubação em estufa (30°C) por uma hora. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS-T e os soros dos bovinos (n=34) e os controles (CP, n=3; CN, n=3) foram adicionados para a reação na diluição de 1:25. Após, incubou-se em estufa por duas horas e depois desse tempo, lavou-se a membrana novamente com PBS-T por quatro vezes em dez minutos. A seguir, o conjugado anti-IgG de bovino (1:100) foi adicionado sobre cada reação na membrana e incubou-se em estufa por mais uma hora. Por fim, as membranas foram lavadas novamente com PBS-T por quatro vezes em dez minutos. A revelação foi realizada mediante a adição de uma solução de revelação a base de Tris HCl, 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) e Peróxido de sódio. Após, as membranas foram incubadas por quinze minutos, sendo utilizada solução de parada imediatamente após essa incubação, realizando duas lavagens com 200µL de água destilada. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente sob agitação constante. Para a padronização dos resultados, considerou-se como resultado positivo e negativo, as reações antígeno-anticorpo que apresentaram definição visual de cor e aspecto semelhante aos dos controles.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de sensibilidade, especificidade e concordância (valor de Kappa) do *Dot-ELISA* para a detecção de anticorpos leptospirais foi determinada em comparação com o resultados do MAT, utilizando o software *MedCalc* para Windows, versão 19.4.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a padronização do ensaio com os 34 soros bovinos amostrados e os seis soros controles (CP e CN), o MAT revelou 17 soros reagentes e 17 soros não reagentes. Os soros reagentes atingiram titulações que variaram de 100 a 1600 para quatro sorovares patogênicos (Tabela 1), confirmando a caracterização prévia realizada.

Tabela 1. Resultados do MAT com 17 soros bovinos, reagentes no teste, de acordo com o soro e os títulos de anticorpos.

Identificação do soro	Antígenos reagentes			
	CAN	GRI	HAR	ICT
10			100	
11			400	
12			400	
18	100			
244	100	200		400
272				200
709			400	
995	400			400
1021			800	
6702			400	
6710			1600	
6716				100
6749				400
6750			100	
6757	100			100
6758	100			
6760				100
%	29,4	5,8	47,0	41,1

Legenda: CAN=Canicola;GRI=Grippytyphosa;HAR=Hardjo;ICT=Icterohaemorrhagiae

No *Dot-ELISA*, dos 34 soros utilizados, 24 (70,5%) foram considerados como reagentes (Tabela 2). Ao realizar a análise da Tabela 2 percebe-se que dos 17 soros reagentes no MAT, 16 foram reagentes no *Dot-ELISA* e dos 17 soros não reagentes, oito foram reagentes no *Dot-ELISA*.

Tais avaliações permitem-nos notar que o *Dot*-ELISA, em relação ao MAT, possui uma sensibilidade de 94%, uma especificidade de 53% e uma correlação classificada como substancial ($K=0,74$).

Tabela 2. Comparação entre *Dot*-ELISA e MAT realizados com os soros bovinos.

<i>Dot</i> -ELISA	MAT		Total
	Reagente	Não reagente	
Reagente	16	8	24
Não reagente	1	9	10
Total	17	17	34

Onde: $\chi^2=9,0$; $K=0,74$; Sensibilidade=94%; Especificidade=53%

O MAT é considerado o teste sorológico padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose em humanos e animais [3]. Entretanto, os resultados mostraram que o *Dot*-ELISA no formato proposto foi capaz de detectar anticorpos anti-*Leptospira* nos soros bovinos com a mesma eficiência que o MAT. Além disso, o *Dot*-ELISA utilizou apenas o sorovar Hardjo como antígeno, enquanto que para a realização do MAT foi utilizada uma bateria com 12 sorovares. Interessantemente, o *Dot*-ELISA foi capaz de detectar todos os soros que reagiram como o sorovar Hardjo no MAT e também todos aqueles que haviam reagido para os sorovares Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, com exceção do soro 272, o qual reagiu com título de 200 para o sorovar Icterohaemorrhagiae. Dessa forma, a sensibilidade foi de 94% nos soros reagentes. Além disso, o *Dot*-ELISA detectou oito soros que não haviam sido reagentes para nenhum sorovar no MAT.

Para a padronização do teste, utilizou-se amostras de sangue provenientes de um confinamento de bovinos de 34 municípios do RS, os quais foram destinados para a exportação de animais vivos. Estes animais possuíam idade entre 18 e 24 meses, sem nenhum histórico de vacinação contra a leptospirose e história clínica da doença. No Brasil, estudos sorológicos apontam para uma diversidade de sorovares circulantes, e que a sororeatividade nos rebanhos bovinos estaria relacionada com a sazonalidade climática nos locais de estudo, principalmente nos períodos com as altas precipitações pluviométricas [12-14]. Os resultados encontrados neste estudo evidenciaram reações para os sorovares implicados na maioria dos casos de leptospirose bovina no mundo, além de serem constituintes da maioria das vacinas comerciais disponíveis [1]. O *Dot*-ELISA no formato padronizado neste estudo foi capaz de detectar um amplo espectro de reações mesmo utilizando apenas um dos antígenos mais prevalentes para a espécie bovina.

Em nosso estudo foi possível observar uma redução direta nos custos, no tempo para a execução das técnicas utilizadas e na necessidade de equipamentos laboratoriais em comparação ao MAT. Neste sentido, Pappas e colaboradores (1985) [7] descreveram um teste rápido, com custo baixo e de fácil execução denominado de IgM *Dot*-ELISA, o qual revelou uma maior sensibilidade e especificidade do que o MAT para os casos de infecções agudas. Assim, avaliações adicionais poderão ser realizadas a fim de uma melhor avaliação das vantagens de nosso ensaio em relação ao MAT, além de determinar o melhor momento para a execução do teste em relação ao estágio da doença, previamente a realização do diagnóstico laboratorial padrão.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o *Dot*-ELISA padronizado de forma preliminar foi capaz de detectar anticorpos anti-*Leptospira* em 70,5% (n=24) soros bovinos testados. Embora os resultados sejam promissores, ensaios adicionais são necessários a fim de padronizar a técnica para uso em larga escala, visando a triagem rápida de casos de leptospirose em bovinos a campo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e a FAPERGS pelas bolsas de estudo e pelos demais auxílios financeiros para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] ELLIS W. A. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387:99-137, 2015.
- [2] ADLER B., de la PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol*, 140:287–296, 2010.
- [3] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
- [4] EUGENE E.J., HANDUNNETTI S.M., WICKRAMASINGHE S.A., KALUGALAGE T.L., RODRIGO C., WICKREMESINGHE H., DIKMADUGODA N., SOMARATNE P., De SILVA H.J., RAJAPAKSE S. Evaluation of two immunodiagnostic tests for early rapid diagnosis of leptospirosis in Sri Lanka: a preliminary study. *BMC Infect Dis*, 15:319, 2015.
- [5] GOARANT C., BOURHY P., D'ORTENZIO E., DARTEVELLE S., MAURON C., SOUPÉ-GILBERT M-E., BRUYÈRE-OSTELLS L., GOURINAT A-C., PICARDEAU M., NATO F., CHANTEAU S. Sensitivity and Specificity of a New Vertical Flow Rapid Diagnostic Test for the Serodiagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 7:e2289, 2013.
- [6] SENTHILKUMAR T.M.A., SUBATHRA M., RAMADASS P., RAMASWAMY V. Serodiagnosis of bovine leptospirosis by IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex Agglutination Test. *Trop Anim Health Prod*, 42:217–222, 2010.
- [7] PAPPAS M.G., BALLOU W.R., GRAY M.R., TAKAFUJI E.T., MILLER R.N., HOCKRNEYER W.T. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg*, 34:346-354, 1985.
- [8] PINHEIRO R.R., CHAVES C.D.O., GUIMARÃES A.M.G., COSTA S.A., ANDRIOLI A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. *Rev Port Cienc Vet*, 101:51-56, 2006.
- [9] AHMAD N., JOZANI J., NEDA Z. Adaptation of Dot-Elisa for serodiagnosis of *Neospora caninum* infestation in aborted cows. *Global Vet*, 7:149-152, 2011.
- [10] SAMPAIO B.F.C., MEIRELES L.R., ANDRADE JÚNIOR H.F. Padronização da metodologia dot-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em saliva. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 74:310-319, 2015.
- [11] BLANCO R.D., FIDELIS C.F., ARAUJO L.S., HENAO A.M., CARDONA J.A., GUIMARÃES J.D., VARGAS M.I., PATARROYO J.H. Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*. *Pesq Vet Bras*, 34:723-727, 2014.
- [12] FÁVERO J.F., ARAÚJO H.L., LILENBAUM W. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb Pathog*, 107:149-154, 2017.

[13] GUEDES I.B., ARAÚJO S.A.A., SOUZA G.O. Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon. *Acta Trop*, 191:212-216, 2019.

[14] LILENBAUM W., MARTINS G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transbound Emerg Dis*, 61:63-8, 2014.