

Padronização de ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos**Indirect ELISA standardization for the detection of antibodies anti-*Leptospira* in bovine serum**

DOI:10.34117/bjdv6n9-663

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

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

Paula Soares Pacheco

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: paulassoarespacheco@gmail.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

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

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 bovina está distribuída em todo o mundo, e o sorovar hardjo é o maior causador da enfermidade. O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é recomendado para o diagnóstico laboratorial da leptospirose, mas possui limitações. Diante disso, um ELISA indireto, utilizando o sorovar Hardjo como antígeno, foi comparado ao MAT, em uma avaliação inicial para o diagnóstico individual da leptospirose bovina. Dos 60 soros bovinos analisados, 13 (21,6%; IC95% 13,3-33,6) foram reagentes no MAT. Os títulos variaram de 1:100 a 1:1600 para os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Grippotyphosa. No ELISA, seis (10%; IC95% 4,6-20,1) soros foram considerados reagentes. De acordo com a análise estatística realizada foi possível detectar uma alta especificidade no teste (97,87%), mas uma sensibilidade baixa (38,46%). Assim, o ELISA indireto descrito é promissor, mas apresenta limitações quanto à sensibilidade. Futuras avaliações para aumentar o espectro de detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos serão realizadas.

Palavras-chave: Imunodiagnóstico; Anticorpos; Bovinos confinados; Leptospirose

ABSTRACT

Bovine leptospirosis is distributed throughout the world, and serovar Hardjo is the major cause of the disease. The microscopic agglutination test (MAT) is recommended for the laboratory diagnosis of leptospirosis, but it has limitations. In this light, an indirect ELISA, using serovar Hardjo as antigen, was compared to the MAT, in an initial evaluation for the individual diagnosis of bovine leptospirosis. Of the 60 bovine sera analyzed, 13 (21.6%; 95% CI 13.3-33.6) were reactive in MAT. Antibody titers ranged from 1:100 to 1:1600 for Canicola, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, and Grippotyphosa serovars. In the ELISA, six (10%; 95% CI 4.6-20.1) sera were considered reactive. According to the statistical analysis, indirect ELISA had high specificity in the test (97.87%), but a low sensitivity (38.46%). Thus, the indirect ELISA described is promising, but has limitations regarding sensitivity. Future evaluations to increase the spectrum of detection of anti-*Leptospira* antibodies in bovine sera will be carried out.

Keywords: Immunodiagnosis; Antibodies; Confined cattle; Leptospirosis.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose bovina possui distribuição global e pode causar um grande impacto na economia dos países em desenvolvimento e prejuízo aos produtores rurais [1]. O sorovar hardjo é o maior causador de leptospirose bovina no mundo [2]. Entretanto, outros sorovares podem causar a enfermidade nos bovinos [3]. A doença que normalmente manifesta-se na forma crônica assintomática, apresenta elevados índices de abortos e animais natimortos, infertilidade de machos e fêmeas, e a redução na produção de leite [1]. Além da importância econômica, a doença nos bovinos é considerada como um fator de risco ocupacional para veterinários [4], magarefes [5] e produtores rurais [1] por se tratar de uma zoonose.

O teste de soroaglutinação microscópica (MAT), o qual é o teste padrão-ouro para o diagnóstico sorológico da leptospirose [6], apesar de apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade, ele possui importantes limitações [7]. Além disso, para a obtenção do máximo de confiabilidade e padronização do MAT, os laboratórios credenciados para sua execução são encorajados a solicitar periodicamente um painel de cepas aos laboratórios de referência nacionais e realizarem o teste internacional de proficiência, que é o controle de qualidade internacional do teste [8].

Devido as limitações do MAT, principalmente na identificação rápida de enfermos na fase aguda e por necessitar de amostras de sangue pareadas [6], há urgência em desenvolver formatos de teste que possam ser úteis no diagnóstico laboratorial da leptospirose, como por exemplo, os testes imunoenzimáticos. ELISA, por sua vez, é um teste que apresenta alta sensibilidade e especificidade, podendo utilizar diferentes preparações do antígeno, de protocolos e plataformas [1]. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi padronizar de forma preliminar um formato de ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em bovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Neste trabalho, foram utilizadas 66 amostras de soros bovinos encaminhados ao laboratório do GEDTA, na Faculdade de Veterinária, para o diagnóstico laboratorial da leptospirose. Nenhum dos animais tinha histórico de vacinação ou manifestações clínicas da leptospirose. Destes, seis (6) soros foram utilizados como controle (3 positivos e 3 negativos) no ELISA, pois já eram bem caracterizados quanto ao resultado e mantidos no banco de soros do laboratório. Os demais soros (n=60) eram oriundos de 12 municípios do Rio Grande do Sul e foram amostrados de forma aleatória, visando uma análise preliminar.

2.2 MAT

O MAT foi realizado de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde [6], utilizando-se uma diluição dos soros em 1:50 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 $1-2 \times 10^8$ leptospiros/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 ELISA

Para a padronização do teste, realizou-se um *checkerboard titration* visando estabelecer a melhor concentração do antígeno, a melhor diluição do soro primário e do conjugado anti-espécie. Após a padronização inicial, as placas com 96 poços foram sensibilizadas com o antígeno Hardjo foi adicionado na concentração de 10^5 células por poço ao tampão de sensibilização (carbonato-bicarbonato pH 9,6), e a seguir as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Na placa sensibilizada, foram realizadas 3 lavagens com PBST, e aplicado nos poços o tampão de bloqueio (caseína 5%), sendo realizada a incubação por 1 hora em estufa a 37°C. Após, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBST e os soros bovinos diluídos 1:50 em PBS foram adicionados nos poços e incubados por 1 hora em estufa a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e adicionado o conjugado anti-bovino (1:100/ PBS), e incubado por 1 hora em estufa a 37°C. Após foram feitas 5 lavagens da placa (PBST) e adicionado o substrato de cor (TMB9), mantendo-as no escuro por 15 minutos, até ser aplicado o reagente de parada para assim ser feita a leitura da placa em 450 nm, em espectrofotômetro (BioTek- Modelo Elx800).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os percentuais de sensibilidade, especificidade e acurácia do ELISA na detecção de anticorpos foram determinados em comparação aos resultados do MAT, como descrito a seguir: (a) Sensibilidade = $a / (a+c) \times 100$, onde “a” é o número de soros reagentes no ELISA e no MAT, “c” o número de soros reagentes no MAT e não reagentes no ELISA; (b) Especificidade = $d / (b+d) \times 100$, onde “d” é o número de soros não reagentes no ELISA e no MAT, “b” o número de soros não reagentes no MAT e reagentes no ELISA; (c) Acurácia = $(a+b) / (a+b+c+d) \times 100$. As

análises foram realizados nos programas *Diagnostic Test Calculator* (version 2010042101) e *VassarStats* e o gráfico no programa *Prism* 4.03.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 60 animais analisados, 13 (21,6%; IC95% 13,3-33,6) foram reagentes no MAT. Os títulos variaram de 1:100 a 1:1600. Os resultados completos e os títulos obtidos para cada antígeno podem ser observados na tabela 1.

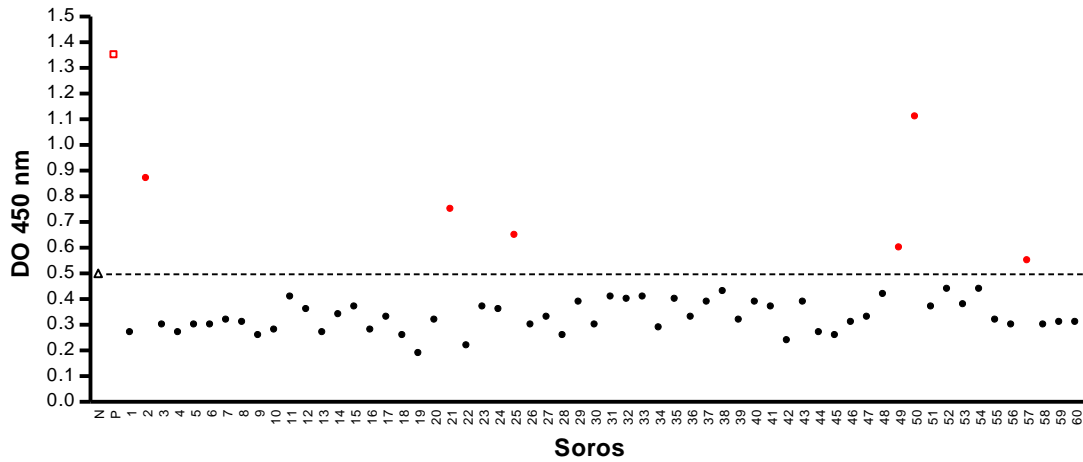
Tabela 1. Reações dos soros bovinos testados no MAT de acordo com os antígenos utilizados. Apenas os resultados positivos foram considerados.

Antígeno	Soros / Títulos												
	2	10	16	21	25	32	37	39	48	50	57	58	60
Canicola						10 0					10 0	10 0	
Grippotyphosa							10 0	10 0					
Hardjo	40 0	160 0		10 0	160 0					10 0			
Icterohaemorrhagi ae			10 0						40 0		10 0		10 0

No ELISA indireto, de acordo com os soros utilizados como controle (positivo e negativo), 6 (10%; IC95% 4,6-20,1) animais foram considerados reagentes (soros 2, 21, 25, 49, 50 e 57) (Figura 1). O soro 49 foi reagente no ELISA mas não no MAT.

De acordo com a análise estatística realizada foi possível detectar uma alta especificidade no teste (97,87%), mas uma sensibilidade baixa (38,46%). Esse resultado foi obtido quando realizamos a comparação dos resultados do ELISA com todos os soros reagentes no MAT (Tabela 2), independente do antígeno reagente.

Figura 1. ELISA indireto com os 60 soros bovinos, onde $[\Delta]$ representa o pool de soros do controle negativo = N; $[\square]$ representa o pool de soros do controle positivo = P; $[\bullet]$ representa os soros reagentes e $[\bullet]$ representa os soros não reagentes. A linha tracejada indica o ponto de corte.



Quando comparamos apenas os soros reagentes no MAT para o sorovar Hardjo (soros 2, 10, 21, 25 e 50), o sorovar escolhido para a sensibilização das placas no ELISA indireto, a sensibilidade do teste atingiu 80% e a especificidade foi de 98,18%.

Tabela 2. Comparação entre ELISA indireto e MAT realizados com os soros bovinos.

ELISA	MAT		Total
	Reagente	Não reagente	
Reagente	5	1	6
Não reagente	8	46	54
Total	13	47	60

Onde: $K=0,85$; Sensibilidade=38,46%; Especificidade=97,87%

Este trabalho descreve a padronização preliminar de um ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos. A soroprevalência encontrada no MAT nos soros bovinos (21,6%) mostra um resultado semelhante aos principais estudos brasileiros sobre a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em rebanhos bovinos [9]. Em nosso estudo, a especificidade do ELISA foi de 97,87%. Por outro lado, a sensibilidade do teste foi de apenas 38% quando se compara com os resultados do MAT com os soros bovinos.

Há um número considerável de relatos sobre o uso de ELISA como teste para detecção de anticorpos anti-*Leptospira*. Embora esses ensaios possuam uma maior sensibilidade do que o MAT, eles ainda possuem algumas limitações, pois a detecção dos níveis de anticorpos não reflete o estado imunológico do animal, uma vez que os anticorpos protetores e não protetores são

detectados [1]. Assim, deve-se ter cuidado na interpretação do teste para que sejam eliminados ao máximo os falsos-positivos.

O método para o diagnóstico da leptospirose em animais e humanos é a detecção de anticorpos específicos no soro usando o MAT. Embora o MAT possua reconhecidas limitações, por ser trabalhoso e não fornecer um diagnóstico rápido, ele ainda é considerado padrão-ouro [6]. Neste sentido testes para o diagnóstico foram desenvolvidos com base em preparações com leptospiras inteiras inativadas [2]. Em nosso estudo, a fim de superar possíveis deficiências, o método desenvolvido pelos autores utilizou apenas um sorovares leptospiral, o qual é o agente mais comumente implicado na leptospirose bovina [1].

A sensibilidade do teste encontrada no estudo foi considerada baixa. Este achado pode ser explicado, em parte, pela diferença entre a homologia do LPS entre os sorovares leptospirais, o qual é o principal antígeno na parede celular das leptospiras [2], refletindo assim em uma baixa reação cruzada entre o antígeno usado na sensibilização das placas e os anticorpos para outros sorovares. Mesmo assim, o ELISA foi capaz de detectar um soro reagente para canicola e icterohaemorrhagiae (1:100), demonstrando uma possível reação cruzada, e como reagente um soro que havia sido negativo no MAT, que pode evidenciar a presença de um sorovar, não constante na bateria de diagnóstico.

Em nosso estudo, cinco animais reagiram no MAT com títulos variando de 100 a 1600. Curiosamente, o ELISA não foi capaz de detectar como reagente um dos soros de maior título no MAT (1:1600). Neste caso, pode ter ocorrido um efeito denominado de prozona, um fenômeno que ocorre quando existe excesso de anticorpos no soro testado, o qual interfere na formação do complexo antígeno-anticorpo necessário para que aconteça a reação [10]. Por outro lado, a especificidade foi de 97,87% o que demonstra uma concordância entre os testes.

Diante dos resultados apresentados neste estudo, conclui-se que o ELISA indireto descrito é promissor, mas apresenta limitações quanto à sensibilidade. Futuras avaliações para aumentar o espectro de detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos serão realizadas.

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. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.99-137, 2015.
- [2] ADLER, B. *Leptospira* and leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, 293p. 2015.
- [3] BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZJ. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**. v.3, p. 757-771, 2003.
- [4] LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 296–326.V 14. 2001.
- [5] DORJEE, S.; HEUER, C.; JACKSON, R.; J.M.; MIDWINTER, A.C.; RIDLER, A.L. Assessment of occupational exposure to leptospirosis in a sheep-only abattoir. **Epidemiology and Infection**, v. 139, p. 797-806, 2011.
- [6] WHO. World Health Organization. **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**. 2003.
- [7] ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.
- [8] HARTSKEERL, R.A. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 1, p. 7-10, 2005.
- [9] LILENBAUM, W. Bovine Leptospirosis in Brazil: A Review, **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.
- [10] JUNG, D.L.; BECKER, D.; RENNER, J.D.P. Efeito prozona no diagnostico de sífilis pelo método VDRL: experiência de um serviço de referência no sul do Brasil. **Revista de epidemiologia e controle da infecção**, v.4, n.1, p.2-6, 2013.