

## USO DE QUIMERA RECOMBINANTE MULTIEPÍTOPO DE *Leptospira interrogans* PARA DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE BOVINA

NATALI LIMA DIAS<sup>1</sup>; THAYNÁ LANER CARDOSO<sup>2</sup>; SAMUEL RODRIGUES CARVALHO<sup>3</sup>; BEATRIZ BATISTA BRITES<sup>4</sup> AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO<sup>5</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – natali.dias.754@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – samukrc17@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – beatriz.batista.brites@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma antropozoonose negligenciada, sendo descrita pela primeira vez por Arthur Stimson em 1917 e, atualmente, é reconhecida como um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, principalmente em países subdesenvolvidos e tropicais (KARPAGAM e GANESH, 2021). A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto ou indireto com a urina de roedores, acometendo tanto humanos quanto animais. A enfermidade é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp., o qual compreende aproximadamente 300 sorovares de *L. interrogans* divididas em 25 sorogrupos (HERRMANN et al., 2012).

Leptospiras patogênicas, sendo as principais *L. interrogans*, sorovar Hardjo, tipo Hardjoprajitno, *L. borgpetersenii*, sorovar Hardjo, tipo Hardjobovis (HERRMANN et al., 2012) e Pomona (DELGADO et al., 2022), causam elevados prejuízos para a pecuária, podendo estar relacionadas direta ou indiretamente a problemas reprodutivos, como abortamentos, natimortalidade e nascimento de bezerros fracos (CLAZER et al., 2015). A infecção em animais pode apresentar diferentes aspectos clínicos, dependendo da interação entre o hospedeiro e a cepa infectante (JAMAS et al., 2023). A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pode variar de acordo com a presença de reservatórios, clima, tipo de produção, manejo alimentar, programa de vacinação e sub-notificação (ANDERSON, 2007).

De acordo com Aduña (2016), o diagnóstico de rotina se sucede de dados epidemiológicos, sinais clínicos e técnicas laboratoriais, como o isolamento microbiano. O teste laboratorial mais utilizado e recomendado como método padrão ouro para diagnóstico da leptospirose é o de soroaglutinação microscópica (MAT), onde são feitas diluições das amostras de soro a serem testadas, as quais são misturadas às culturas de leptospira em uma concentração padrão, e, em seguida, a aglutinação é verificada através de microscópios de campo escuro. Entretanto, o MAT tem sérias limitações na identificação da doença em fase aguda (REZENDE, 2016). Além de possuir baixa sensibilidade para a detecção do sorovar infectante, devido a ocorrência de reações cruzadas entre sorovares, especialmente dentro de um mesmo sorogrupo (FAINE et al., 2000).

Em estudos anteriores, a proteína recombinante ErpY-Like apresentou-se promissora no diagnóstico da leptospirose suína (PADILHA et al., 2019) e a proteína recombinante LemA junto a rErpY-like conseguiu conferir, através da vacinação, uma alta taxa de proteção contra infecção letal por *Leptospira* (OLIVEIRA et al., 2018). Frente a este cenário, o presente estudo teve como

objetivo avaliar uma quimera recombinante contendo epítomos destas duas proteínas, como antígeno no desenvolvimento de um teste sorológico do tipo ELISA para o diagnóstico da leptospirose bovina.

## 2. METODOLOGIA

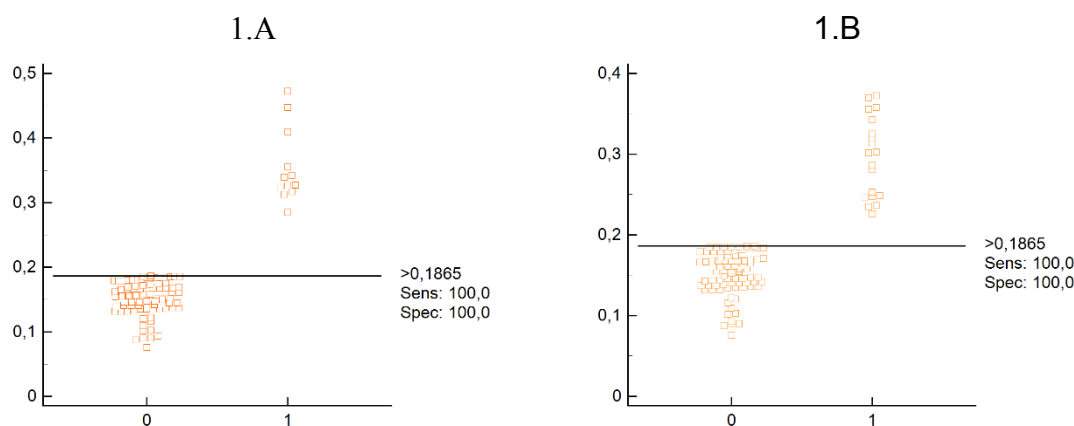
**2.1. Produção da quimera recombinante rErpy-LemA:** realizada conforme descrito no depósito de patente (BR1020230106161).

**2.2. Soros bovinos:** foram avaliados 112 soros bovinos, todos previamente testados pela MAT. Desses soros, 30 são positivos para leptospirose (12 com titulação superior à 800 e 18 com titulação inferior a 800, entre 400 e 700), o restante, 82 soros negativos.

**2.3. ELISA indireto:** microplacas de poliestireno (Nunc, Polysorp – *Thermo Scientific*, Waltham, MA) foram sensibilizadas com 200 ng de proteína rErpY-like/LemA, diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (100 µL por poço), e posteriormente incubada *overnight* à 4°C. As placas foram bloqueadas com solução de leite em pó 5% diluído em PBS 1x, por 90 minutos a 37°C. Os soros adicionados a placa em duplicatas na diluição 1:100, e estas mantidas *overnight* à 4°C. Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo formado, foi utilizado o anticorpo anti-IgG bovino conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), na diluição 1:6000 e as placas incubadas por 1h a 37°C. Entre todas as etapas, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1x (100µL por poço). As reações foram reveladas com solução substrato/cromógena contendo o-phenylenediamine (0,4mg/mL) em 0,1M tampão citrato pH 4,0 e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 20 min, posteriormente a reação foi parada com a solução 2N de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 492 nm usando VICTORTM X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA). A análise da curva ROC foi realizada com o software estatístico MedCalc(versão 8.0.0.0).

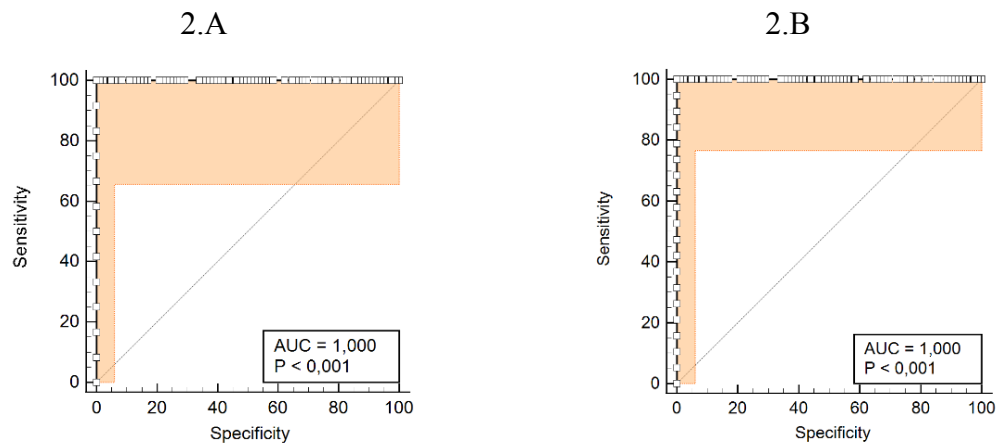
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram promissores para o diagnóstico da leptospirose bovina. Em ambos os grupos de soros avaliados (soros com titulação superior à 800 e inferior a 800), a sensibilidade e especificidade obtidas foi de 100% e *cut-off* de 0,185 ( Fig 1.A e 1.B). A curva ROC apresentou um AUC = 1,00 (  $P < 0,00001$ ), sendo considerada excepcional ( Fig.2A e Fig.2B).



**Figura 1:** Comparação dos soros testados avaliados pelo padrão-ouro (MAT), *cut-off*, sensibilidade e especificidade. O número 1 representa os soros positivos

na MAT e 0 os soros negativos. **1.A:** Soros com titulação superior à 800. **2.B:** Soros com titulação inferior a 800 (de 400 a 700).



**Figura 2:** Curva ROC do ELISA indireto com soros bovinos. **1.A:** Soros de titulação superior à 800. **2.B:** Soros com titulação inferior a 800 (de 400 a 700).

O diagnóstico preciso desta enfermidade segue sendo um desafio, contribuindo para perdas significativas quando acomete o rebanho (SALDANHA et al., 2023). Atualmente, o diagnóstico da leptospirose é feito por MAT, que é um teste sorológico, laborioso e demorado, não sendo viável sua aplicação para grandes rebanhos. Esse teste detecta anticorpos produzidos contra *Leptospira* no hospedeiro (BANDARA et al., 2016). No presente trabalho, propomos o desenvolvimento de um teste de diagnóstico sorológico, assim como o MAT. Contudo, no teste ELISA há a possibilidade de avaliar de forma mais rápida, várias amostras de soro, facilitando o diagnóstico. Este teste ELISA aqui proposto, pode servir como diagnóstico ou como um teste de triagem associado ao diagnóstico pelo MAT.

A proteína recombinante rErpY-like já foi avaliada anteriormente no desenvolvimento de teste do tipo ELISA indireto, para diagnóstico da leptospirose em suínos, apresentando especificidade e sensibilidade de 100% e 96,8%, respectivamente, e um *cut-off* menor que 0,031 (PADILHA, et al., 2019). Em comparação com os resultados apresentados aqui, se justifica a utilização da quimera recombinante multi-epítomos como potencial antígeno para testes de diagnóstico sorológico, pois obteve-se 100% de especificidade e sensibilidade.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, percebe-se a eficácia da quimera recombinante rErpY-LemA, quando utilizada como antígeno no teste sorológico ELISA indireto para o diagnóstico de leptospirose bovina, indicando uma alta sensibilidade e especificidade. Assim, o uso da quimera rErpY-LemA demonstra ser um excelente alvo para o diagnóstico da leptospirose bovina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADUGNA, Simegnew. A review of *bovine leptospirosis*. *Eur. J. Appl. Sci*, v. 8, n. 6, p. 347-355, 2016.

ANDERSON, Mark L. Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 474-486, 2007.

BANDARA, Kanchana et al. Utility of modified Faine's criteria in diagnosis of *leptospirosis*. **BMC infectious diseases**, v. 16, p. 1-7, 2016.

CLAZER, M.; RODRIGUES, G. V.; ARAÚJO, L. *Leptospirose* e seu aspecto ocupacional: revisão de literatura. **Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR**. 2015; 18: 191-8. 2015.

DELGADO, G. B. .; CUNHA, R. C. .; VASCONCELLOS, F. A. .; SILVA, Éverton F. da. *Bovine leptospirosis* and its importance in one health: an integrative review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3. 2022.

FAINE, Solomon et al. **Leptospira and leptospirosis**. CRC Press Inc., 1994.

HERRMANN, Geder Paulo et al. Soroprevalência De *Leptospirose* Em Bovinos Nas Mesorregiões Sudeste E Sudoeste Do Estado Rio Grande Do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, 2012.

Jamas, L. T.; Barcellos, R. R.; Menozzi, B. D.; Langoni, H. *Leptospirose bovina*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 1-19, 2020.

KARPAGAM, Krishnan Baby; GANESH, Balasubramanian. *Leptospirosis*: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 835-846, 2020.

OLIVEIRA, T. L., SCHUCH, R. A., INDA, G. R., ROLOFF, B. C., NETO, A. C. P. S., AMARAL, M; HARTWIG, D.D. *LemA* and *EryY-like* recombinant proteins from *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge using *AddaVax*<sup>TM</sup> as adjuvant. **Vaccine**, v. 36, n. 19, p. 2574-2580, 2018.

PADILHA, B. C. R.; SIMÃO,, H. Q.; OLIVEIRA, T. L.; HARTWIG, D. D. The use of *EryY-like* recombinant protein from *Leptospira interrogans* in the development of an immunodiagnostic test for swine leptospirosis. **Acta tropica**, v. 193, p. 31-34, 2019.

REZENDE, Laís Miguel. Diagnóstico de leptospirose bovina em duas propriedades rurais utilizando MAT, ELISA e PCR. 2016.

SALDANHA, Leonardo Boçon et al. Ocorrência de *leptospirose* em bovinos de leite no município de Xanxerê, em Santa Catarina: Relato de caso. 2023.