DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira interrogans* EM BOVINOS

CAROLINE DEWES[1]; JOÃO PEDRO MELLO SILVA[2]; SAMUEL RODRIGUES FELIX[3]; TANISE PACHECO FORTES[3]; FLÁVIA ALEIXO VASCONCELLOS[3]; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA[4]

[1]*Pós-Graduando do PPG em Veterinária UFPel – caroldewesvet@hotmail.com*
[2]*Graduando em Medicina Veterinária UFPel – jptam97@gmail.com*
[3]*Doutor em ciências – samuelrf@gmail.com, tanisefortes@gmail.com, aleixo.fv@gmail.com*
[4]*Professor da Faculdade de Veterinária UFPel – fagondee@gmail.com*

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 (ELLIS, 2015). As leptospiras pertencentes ao sorovar hardjo são a maiores causadoras de leptospirose bovina no mundo (ADLER, 2014). Entretanto, outros sorovares podem causar a enfermidade nos bovinos (BHARTI, 2003). 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 (ELLIS, 2014). Além da importância econômica, a doença nos bovinos é considerada como um fator de risco ocupacional para veterinários (LEVETT, 2001), magarefes (DORJEE et al., 2011) e produtores rurais (ELLIS, 2014) 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 (WHO, 2003), apesar de apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade, ele possui importantes limitações (ADLER; de la PEÑA MOCTEZUMA, 2010). 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 (HARTSKEERL, 2005).

Devido as limitações do MAT, principalmente na identificação rápida de enfermos na fase aguda e por necessitar de amostras de sangue pareadas (WHO, 2003), 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 (ELLIS, 2015). Neste contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver e testar um formato de ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em bovinos.

2. METODOLOGIA

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, 6 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.

MAT

O MAT foi realizado em todas as amostras de sangue conforme recomendações (WHO, 2003). A triagem das amostras foi realizada através de uma diluição inicial do soro em PBS com pH 7,2, na proporção de 1:100. Para o teste, os antígenos vivos foram mantidos a uma temperatura de 29°C em estufa bacteriológica, sendo utilizados com 7 dias de crescimento. Um painel de quatro antígenos patogênicos (Ag1, Ag2, Ag3 e Ag4) foram utilizados em uma concentração de 10^8 leptospiras/mL. As amostras reagentes na etapa de triagem foram tituladas até 1:3.200. O teste foi considerado reagente quando encontrou-se 50% ou mais do antígeno aglutinado, ou quando a densidade do antígeno no complexo antígeno-anticorpo fosse menor que 50%.

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. Para sensibilizar a placa com 96 poços, o antígeno (Ag3) foi adicionado na concentração de10^5 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 1:600 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 (TMB n°9) , mantendo-as no escuro por 15 minutos, até ser aplicado o reagente de parada (n°3) para assim ser feita a leitura da placa em 450 nm, em espectrofotômetro (BioTek- Modelo Elx800).

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) x 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) x 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) x 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 para pelo menos um antígeno no MAT. As titulações 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 60 soros testados no MAT de acordo com os antígenos utilizados. Apenas os resultados positivos foram considerados.

Antígenos	Soros / Títulos												
	2	10	16	21	25	32	37	39	48	50	57	58	60
Ag1						100					100	100	
Ag2							100	100					
Ag3	400	1600		100	1600					100			
Ag4			100						400		100		100

No ELISA indireto, de acordo com os soros (n=6) 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).

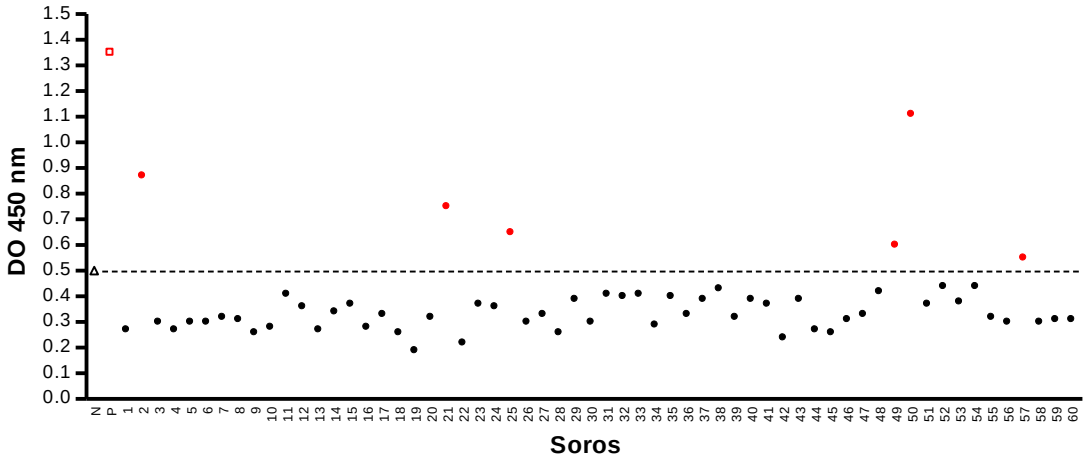

Figura 1. ELISA indireto com os 60 soros bovinos, onde (Δ) representa o controle negativo; (□) o controle positivo; (●) os soros reagentes e (●) os não reagentes. Leitura realizada em Densidade Ótica (DO) de 450nm.

De acordo com a análise realizada, detectamos uma alta especificidade no teste, mas uma sensibilidade baixa. Isso foi evidenciado quando realizamos a comparação dos resultados do ELISA com todos os soros reagentes no MAT (Figura 2 A), independente do antígeno reagente. Quando comparamos apenas os soros reagentes para o Ag3, o qual foi utilizado para a sensibilização das placas, a sensibilidade do teste atinge 80% (Figura 2 B).

A

ELISA	MAT		Total
	+	-	
+	5	1	6
-	8	46	54
Total	13	47	60

Sensibilidade = 38,46%
Especificidade = 97,87%
Acurácia = 85%

B

ELISA	MAT		Total
	+	-	
+	4	1	5
-	1	54	55
Total	5	55	60

Sensibilidade = 80%
Especificidade = 98,18%
Acurácia = 96,7%

Figura 2. Comparação entre ELISA indireto e MAT em uma tabela de contingência 2x2. Onde “A” representa reações do ELISA para todos os resultados reagentes no MAT e em “B” evidenciamos o resultado do ELISA apenas para os soros reagentes com o Ag3 no MAT.

Este trabalho descreve a padronização e o teste 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 (LILENBAUM, 1996). Embora o MAT possua reconhecidas limitações, ele ainda é considerado padrão-ouro (WHO, 2003). Em nosso estudo, a especificidade do ELISA variou entre 97 e 98%. Por outro lado, a sensibilidade do teste aumentou de 38 para 80% à medida que o formato compara os resultados do MAT com soros bovinos reagentes para o antígeno utilizado no teste. Este achado demonstra a baixa homologia do LPS entre os sorovares leptospirais, o qual é o principal antígeno na parede celular das leptospiras. Neste sentido, futuras avaliações são necessárias para aumentar o espectro da detecção dos anticorpos bovinos.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste estudo e a evidente necessidade de refinamento na padronização do teste, conclui-se que o ELISA indireto é um candidato promissor para ser utilizado na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. *Leptospira* and leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, 293p. 2015.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.

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.

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.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.99-137, 2015.

HARTSKEERL, R.A. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 1, p. 7-10, 2005.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 296–326.V 14. 2001.

LILENBAUM, W. Bovine Leptospirosis in Brazil: A Review, **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.

WHO. World Health Organization. **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**. 2003.