

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Leptospirose bovina: abordagens para o diagnóstico sorológico individual e do rebanho

Caroline Dewes

Pelotas, 2020

Caroline Dewes

Leptospirose bovina: abordagens para o diagnóstico sorológico individual e de rebanho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Éverton Fagonde da Silva
Coorientadora: Flávia Aleixo Vasconcellos

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D517. Dewes, Caroline

Leptospirose bovina: abordagens para o diagnóstico sorológico individual e do rebanho / Caroline Dewes ; Everton Fagonde da Silva, orientador ; Flávia Aleixo Vasconcellos, coorientadora. — Pelotas, 2020.

55 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Imunodiagnóstico. 2. Anticorpos. 3. Bovinos. 4. Leptospirose. I. Silva, Everton Fagonde da, orient. II. Vasconcellos, Flávia Aleixo, coorient. III. Título.

CDD : 636.2089607

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Caroline Dewes

Leptospirose bovina: abordagens para o diagnóstico sorológico individual e do rebanho

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14/12/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais por todo amor e carinho.

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente à Deus, pela oportunidade de estar vivenciando tudo isso, de possuir uma vida grandiosa com a minha família e amigos.

Aos meus pais, Mariza e Plínio, por todas as oportunidades que conseguiram me dar ao longo desses anos: não foi nada fácil, porém valeu a pena.

Ao meu irmão, Fernando, que sempre tentou e ainda tenta me ajudar de todas as formas possíveis para que me torne uma pessoa e uma profissional melhor.

Quero agradecer ao Professor Dr. Éverton, que me ajudou e antes de qualquer coisa me possibilitou a oportunidade de trabalhar no GEDTA, desenvolver meu projeto e aprender mais.

À toda equipe que passou pelo GEDTA, todos me ajudaram, me ensinaram e posso dizer que fiz ótimos amigos que levo até hoje em minha vida.

Aos meus amigos, são tantos que nem posso citar aqui, mas cada um deles sabe o que sinto e o quão sou agradecida por fazerem parte da minha vida.

Quero agradecer à minha querida UFPEL, minha segunda casa, tenho imenso orgulho de dizer que fiz parte dessa instituição, e aonde vou sempre digo: sou UFPEL.

E à minha amada Pelotas, vivi tantas coisas boas, aprendi tanto! Foram onze anos, então posso dizer que sou Pelotense também. Sentirei saudades, mas nunca vou deixar de dizer “merece” por onde passar.

“Por mais longe que um homem vá, jamais fugirá de si.”

Jayme Caetano Braun

Resumo

DEWES, Caroline. **Leptospirose bovina: abordagens para o diagnóstico sorológico individual e do rebanho**. 2020. 55f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A leptospirose bovina está distribuída em todo o mundo. No Brasil, a leptospirose bovina é uma enfermidade de grande preocupação, causando prejuízos econômicos à pecuária. Além disso, essa doença é de importante risco na saúde única, já que bovinos assintomáticos podem eliminar leptospiros através da urina por longos períodos. Atualmente, o teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é recomendado como a principal ferramenta para o diagnóstico da leptospirose nos rebanhos bovinos. Nos últimos anos, o Rio Grande do Sul (RS) se consolidou como importante exportador de gado vivo, refletindo diretamente na economia nacional. Nesse contexto, nosso estudo teve como objetivos: (1) determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira*, através do MAT, em bovinos que aguardam exportação na cidade de Pelotas, RS; (2) Padronizar e testar um ELISA indireto, utilizando o sorovar Hardjo como antígeno, comparando os resultados com o MAT; e (3) Padronizar e testar um *Dot*-ELISA em uma avaliação inicial para o diagnóstico individual e rápido da leptospirose bovina, utilizando o sorovar Hardjo como antígeno, comparando os resultados com o MAT. Para tanto, foi calculada uma amostra da população de 4.552 animais alojados em um confinamento em Pelotas, de 34 municípios do RS, sendo coletado o sangue e realizado o teste de aglutinação microscópica (MAT). Para a realização do ELISA indireto, 60 soros foram aleatoriamente utilizados, dos quais 21,6% eram reagentes no MAT. Para o *Dot*-ELISA, 34 soros bovinos, sendo 17 reagentes e 17 não reagentes no MAT, foram usados. Nenhum animal incluído no estudo tinha história de vacinação contra a leptospirose. Dos 355 animais amostrados, 24 (6,76%; IC 95% 4,58-9,86) foram reativos para pelo menos um dos antígenos do MAT. Os sorovares Hardjo e Icterohaemorrhagiae tiveram prevalência de 2,53%, seguidos de Canicola com 1,97% e Grippotyphosa com 1,12%. Dos 60 soros bovinos analisados 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%). Por outro lado, o *Dot*-ELISA foi capaz de detectar anticorpos anti-*Leptospira* em 16 (sensibilidade = 94%) dos 17 soros bovinos reagentes no MAT. Em uma amostra de bovinos jovens, com 24 meses ou menos, a prevalência encontrada indica a necessidade de medidas preventivas, como a vacinação dos rebanhos. Além disso, nossos resultados mostram a exposição dos bovinos ao agente, que por sua vez, pode levar a problemas na saúde única. Pesquisas futuras podem utilizar nossos resultados para o planejamento de estudos epidemiológicos com o objetivo de descrever a situação da leptospirose em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul. 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.

Palavras-chave: Imunodiagnóstico. Anticorpos. Bovinos. Leptospirose.

Abstract

DEWES, Caroline. **Bovine leptospirosis: approaches to individual and herd serological diagnosis**. 2020. 55f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Bovine leptospirosis is a worldwide disease. In Brazil, bovine leptospirosis is a major disease, causing economic damage to livestock. In addition, the disease is an important one health risk since asymptomatic cattle can eliminate leptospire through urine for long periods. Currently, the microscopic agglutination test (MAT) is recommended as the main tool for the diagnosis of leptospirosis in cattle herds. In recent years, Rio Grande do Sul (RS) has consolidated as an important exporter of live cattle, directly reflecting on the national economy. In this context, our study aimed to: (1) Determine the prevalence of anti-*Leptospira* antibodies, through MAT, in cattle awaiting export in the city of Pelotas, RS; (2) Standardize and test an indirect ELISA, using the serovar Hardjo as antigen, comparing the results with the MAT; and (3) Standardize and test a Dot-ELISA in an initial evaluation for the individual and rapid diagnosis of bovine leptospirosis, using the serovar Hardjo as an antigen, comparing the results with the MAT. A representative sample was calculated from 4,552 animals housed in Pelotas, from 34 municipalities in RS, blood was drawn, and the microscopic agglutination test (MAT) performed for serological analysis. Indirect ELISA was performed with 60 randomly sera, of which 21.6% were reagents in MAT. For Dot-ELISA, 34 bovine sera, being 17 reagents and 17 non-reagents in MAT, were used. No animals included in the study had a history of vaccination against leptospirosis. Of the 355 animals sampled, 24 (6.76%; 95% CI 4.58-9.86) were reactive for at least one of the MAT antigens. The serovars Hardjo and Icterohaemorrhagiae had a prevalence of 2.53%, followed by Canicola with 1.97% and Grippotyphosa with 1.12%. Of the 60 bovine sera analyzed in the ELISA, six (10%; 95% CI 4.6-20.1) sera were considered reactive. According to the statistical analysis performed, it was possible to detect a high specificity in the test (97.87%), but a low sensitivity (38.46%). On the other hand, Dot-ELISA was able to detect anti-*Leptospira* antibodies in 16 (sensitivity = 94%) of the 17 bovine sera reactive in MAT. A sample of young cattle aged 24 months or less, the prevalence found indicates the need for preventive measures, such as vaccination of herds. In addition, our results show cattle exposure to the agent, which in turn can lead to one health problems. Future research may use our results to plan epidemiological studies aiming at describing the status of leptospirosis in cattle herds in Rio Grande do Sul. 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.

Keywords: Immunodiagnosis. Antibodies. Cattle. Leptospirosis.

Lista de Figuras

- Figura 1 Distribuição espacial da procedência dos animais confinados. A amostra abrangeu animais oriundos de 34 municípios do RS, das regiões sul, centro e da campanha..... 21
- Figura 2 Mapa de calor representando a localização das reações dos soros bovinos frente aos antígenos testados, com titulação variando de 100 a 600..... 22
- Figura 3 ELISA indireto com os 60 soros bovinos..... 37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Reações dos 355 soros testados no MAT de acordo com os antígenos utilizados. Apenas os resultados positivos foram considerados.....	23
Tabela 2	Reações dos soros bovinos testados no MAT de acordo com os antígenos utilizados. Apenas os resultados positivos foram considerados.....	36
Tabela 3	Comparação entre ELISA indireto e MAT realizados com os soros bovinos.....	37
Tabela 4	Resultados do MAT com 17 soros bovinos, reagentes no teste, de acordo com o soro e os títulos de anticorpos.....	49
Tabela 5	Comparação entre <i>Dot</i> -ELISA e MAT realizados com os soros bovinos.....	50

Sumário

1 Introdução.....	12
2.1 Artigo 1.....	16
2.2 Artigo 2.....	29
2.3 Artigo 3.....	41
3 Considerações finais.....	54
Referências.....	55

1 Introdução

Conhecida como “Doença de Weil”, a história da leptospirose começou em 1886 quando Adolph Weil descreveu um tipo de icterícia acompanhada de esplenomegalia, conjuntivite, disfunção renal e algumas erupções cutâneas (ADLER, 2015). No Japão e na Europa a *Leptospira* foi isolada pela primeira vez simultaneamente, Arthur Stimson em 1907, descreveu a técnica da coloração de prata para observar espiroquetas em tecido renal de um paciente. Stimson chamou o organismo de *Spirocheta interrogans*, pois sua aparência era de um ponto de interrogação (ADLER, 2015).

As *Leptospiras* também chamadas de espiroquetas medem aproximadamente 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento, são pertencentes à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*. É formado por um material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática, com parede celular peptidoglicana e dois filamentos axiais fixados cada um nas extremidades da *Leptospira*. Sua temperatura ótima para crescimento é na faixa de 28 °C a 30 °C, sendo elas aeróbias obrigatórias (HINES, 2007; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Já em temperaturas inferiores a 7 °C a 10 °C ou superiores a 34 °C a 36 °C as *Leptospiras* são inibidas e em um pH inferior a seis ou superior a oito (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A estrutura geral da *Leptospira* é semelhante a das bactérias gram-negativa, pois possui uma membrana externa com lipopolissacarídeo (LPS), o qual está incorporado no folheto externo, além de uma membrana interna e um espaço periplasmático contendo peptidoglicano (ADLER, 2015). As bactérias pertencem a duas espécies: *Leptospira biflexa* de vida livre, considerada saprófita, e *Leptospira interrogans*, considerada patogênica (COSATE *et al.*, 2015). Sua classificação está em 22 espécies com 24 sorogrupos e aproximadamente 300 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; BOURHY *et al.*, 2014).

Amplamente distribuída, a leptospirose é uma zoonose causada por espécies de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (LUCAS *et al.*, 2011). A doença pode afetar humanos e animais, tornando assim, um problema sério de saúde única e

veterinária (HARTSKEERL *et al.*, 2011). A relação entre pessoas, animais e o meio ambiente estão cada dia mais relevante, visto que, a prevalência de doenças zoonóticas, contaminação de água, e solos, vem aumentando a cada dia (CDCP, 2018; OSBUN *et al.*, 2009). As epidemias podem estar relacionadas aos fatores socioeconômicos, estruturas precárias, crescimento de comunidades desorganizadas e falta de saneamento básico (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

Os roedores albergam a bactéria nos túbulos renais antes de eliminar na urina, contaminando o ambiente (MIRAGLIA *et al.*, 2013). Roedores como *Rattus norvegicus* (ratazana) são portadores sadios, ou seja, não demonstram sinais de infecção, albergando as *Leptospiras* em seus rins e eliminando no meio ambiente, contaminando o solo, a água e os alimentos, mantendo assim um equilíbrio biológico com o patógeno (ADLER; MOCTEZUMA, 2009; DAHER *et al.*, 2010; PEREZ *et al.*, 2011; NALLY *et al.*, 2011).

As *Leptospiras* infectam animais selvagens e domésticos e sua transmissão se dá principalmente por meio do contato com a urina desses reservatórios, além do consumo de água ou alimentos contaminados (PICARDEAU, 2013). Embora os roedores sejam considerados os principais, outros animais podem atuar como reservatórios de *Leptospiras*, assim contribuindo para a disseminação da doença (ANDERSEN-RANBERG *et al.*, 2016). Os bovinos são considerados hospedeiros do sorovar Hardjo, além de outros membros do sorogrupo Sejroe, sofrendo infecção clínica e subclínica (LILENBAUM; MARTINS, 2014).

Para Ellis (2015) o agente pode manifestar doenças graves em bovinos, como anemia hemolítica, icterícia, meningite e, às vezes, levar a morte, como consequência resultar em perdas econômicas aos produtores, como no caso de problemas reprodutivos, aborto, queda na produção de leite e, até mesmo, doença aos seus proprietários. Alguns fatores de risco como abate de animais na propriedade, presença de animais silvestres que entram em contato com bovinos, a compra de reprodutores para o rebanho sem origem confirmada, a utilização de pastos compartilhados, e as lavouras irrigadas favorecem a proliferação de roedores transmitindo assim a leptospirose (JULIANO *et al.*, 2000; OLIVEIRA, 2008; SILVA, 2011; MIASHIRO *et al.*, 2018).

A exportação de bovinos vivos ascendeu, atualmente, na pecuária de corte brasileira, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, sendo um excelente negócio para os produtores rurais e sua importância se dá pelo interesse no

mercado externo, as condições climáticas do Estado e a situação financeira dos pecuaristas (ZASLAVSKY, 2019). No ano de 2018, o Brasil exportou cerca de 810 mil bovinos vivos (CANAL RURAL, 2020). Esse aumento vem ocasionando discussões sobre o tema entre os pecuaristas, frigoríficos e ativistas defensores do bem-estar-animal (VELLOSO, 2018). O interesse do mercado externo, principalmente da Turquia, na aquisição de bovinos vivos para engorda e, posteriormente, abate, sugere que o Estado possui animais produtores de ótima qualidade de carne, com sabor, gordura e marmoreio agradáveis (ZASLAVSKY, 2019).

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre a leptospirose bovina surgiram com a identificação da infecção pelo sorovar Pomona em um feto bovino (FREITAS, 1957). A partir desse estudo, a pesquisa de anticorpos e o isolamento do agente em bovinos passaram a ser realizados com maior interesse no Brasil (LILENBAUM, 1996). Embora os inúmeros trabalhos disponíveis publicados apresentem delineamentos experimentais, taxas de prevalência e incidência, períodos de execução e amostragem variáveis, todos convergem para que a leptospirose bovina no país seja considerada uma enfermidade endêmica (SEIXAS NETO, 2012). De acordo com os estudos realizados no RS, a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* varia de 38 a 50% (SEIXAS NETO, 2012; HERRMANN *et al.*, 2012), sendo o sorovar Hardjo considerado o mais prevalente, seguido por Hebdomadis, Wolffi e Grippytyphosa (HERRMANN *et al.*, 2012).

O diagnóstico da leptospirose bovina baseia-se no conjunto das manifestações clínicas, na epidemiologia e no diagnóstico laboratorial. O teste sorológico padrão é o teste de aglutinação microscópica (MAT), o qual se baseia na reação antígeno-anticorpo, e pode ser utilizado em nível de rebanho ou individual (OTAKA *et al.*, 2012; PICARDEAU, 2013; ELLIS, 2015; HAAKE; LEVETT, 2015). Por outro lado, nos últimos anos, alguns formatos de testes imunoenzimáticos vêm sendo desenvolvidos para suplantarem as limitações do MAT, como o custo, o tempo demasiado para a obtenção dos resultados e a subjetividade deles (ADLER, 2015).

Neste sentido, apresentamos o artigo 1 que foi publicado no periódico ***Research, Society and Development***, o qual determinou a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos estacionados em um confinamento localizado em Pelotas/RS, de animais sem histórico de vacinação contra a leptospirose,

oriundos de 34 municípios do RS, através do MAT, utilizando-se para isso um painel de cepas padrão.

Em seguida, o artigo 2 e o artigo 3, os quais foram publicados no periódico ***Brazilian Journal of Development***, descrevem a padronização de dois testes imunoenzimáticos visando o diagnóstico sorológico da leptospirose bovina. Para isso, um ELISA indireto (Artigo 2) e um *Dot*-ELISA (Artigo 3) foram padronizados e testados com o painel de soros bovinos amostrados no trabalho que originou o artigo 1. A nossa hipótese é de que a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos confinados, pertencentes a um confinamento para a exportação de animais localizado em Pelotas/RS, os quais não possuem histórico de vacinação contra a leptospirose, é superior à média do RS.

O objetivo geral é determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em uma população de bovinos confinados para a exportação, oriundos de 34 municípios do Rio Grande do Sul, sem histórico de vacinação contra a leptospirose.

Os objetivos específicos são:

- Realizar o MAT com o soro de bovinos confinados para a exportação a fim de determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* na população amostrada;
- Padronizar e testar de forma preliminar um ELISA indireto para a detecção de anticorpos *anti-Leptospira* nos soros dos bovinos;
- Padronizar e testar de forma preliminar um *Dot*-ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos confinados para exportação

Caroline Dewes; João Pedro Mello Silva; Tanise Pacheco Fortes; Iuri Vladimir Piolly Marmitt; Flávia Aleixo Vasconcellos; Samuel Rodrigues Félix; Éverton Fagonde da Silva

Publicado na revista *Research, Society and Development*.

Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos confinados para exportação
Prevalence of anti-*Leptospira* antibodies in cattle confined for exportation
Prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en ganado vacuno confinado a la exportación

Resumo

No Brasil, a leptospirose bovina é uma enfermidade de grande preocupação, causando prejuízos econômicos à pecuária e um importante risco à saúde pública. Nos últimos anos, o Rio Grande do Sul (RS) se consolidou como importante exportador de gado vivo, refletindo diretamente na economia nacional. Nesse contexto, nosso estudo teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos que aguardam exportação na cidade de Pelotas, RS. Para tanto, foi calculada uma amostra da população de 4.552 animais alojados em Pelotas, de 34 municípios do RS, sendo coletado o sangue e realizado o teste de aglutinação microscópica (MAT) para análise sorológica. Nenhum animal incluído no estudo tinha história de vacinação contra a leptospirose. Dos 355 animais amostrados, 24 (6,76%; IC 95% 4,58-9,86) foram reativos para pelo menos um dos antígenos do MAT. Os sorovares Hardjo e Icterohaemorrhagiae tiveram prevalência de 2,53%, seguidos de Canicola com 1,97% e Grippotyphosa com 1,12%. Em uma amostra de bovinos jovens, com 24 meses ou menos, a prevalência encontrada parece elevada, e indica a necessidade de medidas preventivas, como a vacinação dos rebanhos. Além disso, nossos resultados mostram a exposição do gado ao agente, que, por ser uma zoonose, pode levar a problemas de saúde pública. Pesquisas futuras podem utilizar nossos resultados para o planejamento de estudos epidemiológicos com o objetivo de descrever a situação da leptospirose em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Leptospirose; Confinamento; Vacina; Diagnóstico.

Abstract

In Brazil, bovine leptospirosis is disease of major concern, causing economic losses for livestock and an important risk to public health. In recent years, Rio Grande do Sul (RS) has consolidated as an important exporter of live cattle, directly reflecting on the national economy. In this context, our study aimed to determine the prevalence of anti-*Leptospira* antibodies in cattle awaiting exportation in the city of Pelotas, RS. A representative sample was calculated from 4,552 animals housed in Pelotas, from 34 municipalities in RS, blood was drawn, and the microscopic agglutination test (MAT) performed for serological analysis. No animal included in the study had a history of vaccination against leptospirosis. Of the 355

animals sampled, 24 (6.76%; 95% CI 4.58-9.86) were reactive for at least one of the antigens in the MAT. Serovars Hardjo and Icterohaemorrhagiae had a prevalence of 2.53%, followed by Canicola with 1.97% and Grippotyphosa with 1.12%. As a sample of young cattle, 24 months or younger, the prevalence found seems high, and indicates a need for preventive measures, such as vaccination of herds. In addition, our results show cattle exposure to the agent, which, as a zoonosis, can lead to public health issues. Future research may use our results to plan epidemiological studies aiming at describing the status of leptospirosis in cattle herds in Rio Grande do Sul.

Keywords: Leptospirosis; Feedlot; Vaccine; Diagnosis.

Resumen

En Brasil, la leptospirosis bovina es una enfermedad de gran preocupación, que causa pérdidas económicas para el ganado y un riesgo importante para la salud pública. En los últimos años, Rio Grande do Sul (RS) se ha consolidado como un importante exportador de ganado en pie, reflejándose directamente en la economía nacional. En este contexto, nuestro estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en bovinos en espera de exportación en la ciudad de Pelotas, RS. Se calculó una muestra representativa de 4.552 animales alojados en Pelotas, de 34 municipios de RS, se extrajo sangre y se realizó la prueba de aglutinación microscópica (MAT) para análisis serológico. Ningún animal incluido en el estudio tenía antecedentes de vacunación contra la leptospirosis. De los 355 animales muestreados, 24 (6,76%; IC95%: 4,58-9,86) fueron reactivos para al menos uno de los antígenos en el MAT. Las serovares Hardjo e Icterohaemorrhagiae tuvieron una prevalencia de 2.53%, seguidas de Canicola con 1.97% y Grippotyphosa con 1.12%. Como muestra de bovinos jóvenes, de 24 meses o menos, la prevalencia encontrada parece alta e indica la necesidad de medidas preventivas, como la vacunación de los rebaños. Además, nuestros resultados muestran la exposición del ganado al agente, que, como zoonosis, puede provocar problemas de salud pública. Las investigaciones futuras pueden utilizar nuestros resultados para planificar estudios epidemiológicos con el objetivo de describir el estado de la leptospirosis en los rebaños de ganado en Rio Grande do Sul.

Palabras clave: Leptospirosis; Corral de engorde; Vacuna; Diagnóstico.

1. Introdução

A leptospirose animal é uma doença endêmica na América Latina, sendo considerada como uma das principais causas de perdas econômicas para a pecuária (Campos et al., 2017, Yatbantoong et al., 2019). No Brasil, em bovinos e outros ruminantes, a leptospirose tem sido implicada em falhas reprodutivas, como abortos, natimortos e recém-nascidos fracos e debilitados, além da importante diminuição na produção de carne e leite (Lilenbaum et al., 2014). Nos bovinos o sorovar Hardjo é implicado como a principal causa da leptospirose bovina no mundo, porém outros sorovares podem causar a doença (Bharti et al., 2003, Adler, 2015).

Por se tratar de uma zoonose, a leptospirose é considerada como fator de risco ocupacional para magarefes, produtores rurais além de médicos veterinários (Levett, 2001, Dorjee et al., 2011, Ellis, 2015). No entanto, devido ao diagnóstico clínico ser dificultado pela diversidade de manifestações clínicas nos humanos e nos animais, o diagnóstico laboratorial e o epidemiológico são fundamentais para a confirmação do caso de leptospirose. Dessa forma, o teste de soroglutinação microscópica (MAT) é o teste sorológico recomendado para o diagnóstico laboratorial da leptospirose (WHO, 2003). O MAT é um teste que se baseia na reação antígeno-anticorpo, sendo realizado em microscopia de campo escuro (Adler, 2015).

Em 2018, o Brasil consolidou-se no cenário internacional como um grande exportador de bovinos vivos, faturando cerca quinhentos milhões de dólares, refletindo diretamente na economia nacional (BRASIL, 2019). O avanço do Brasil no mercado de bovinos vivos é um testemunho do alto padrão genético e da qualidade dos animais brasileiros (BRASIL, 2019).

Neste contexto, o nosso estudo objetivou determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos confinados para a exportação, em uma propriedade localizada no município de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul.

2. Material e Métodos

2.1. Confinamento

No distrito de Santa Silvana em Pelotas (RS), nas coordenadas 31°30'40"S e 52°12'21"O, situa-se uma estação de pré-embarque de bovinos, os quais são destinados à exportação. A capacidade estacionária é de 7.000 bovinos, sendo estes reunidos e mantidos em quarentena. A identificação e o rastreamento individual dos animais se dão através de

brinco eletrônico, com os dados da raça, sexo, idade, município e propriedade de origem. Após a chegada dos animais na quarentena, e o lacre da propriedade, não é permitida a entrada e saída de novos animais no estabelecimento. Todos os bovinos confinados são submetidos à coleta de sangue para exames sorológicos exigidos pelo país importador. A coleta de sangue é realizada por Médicos Veterinários habilitados pelo Plano Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose e Encefalopatias Espongiformes (PNCEBT) e a numeração das amostras de sangue é correspondente ao brinco eletrônico dos animais.

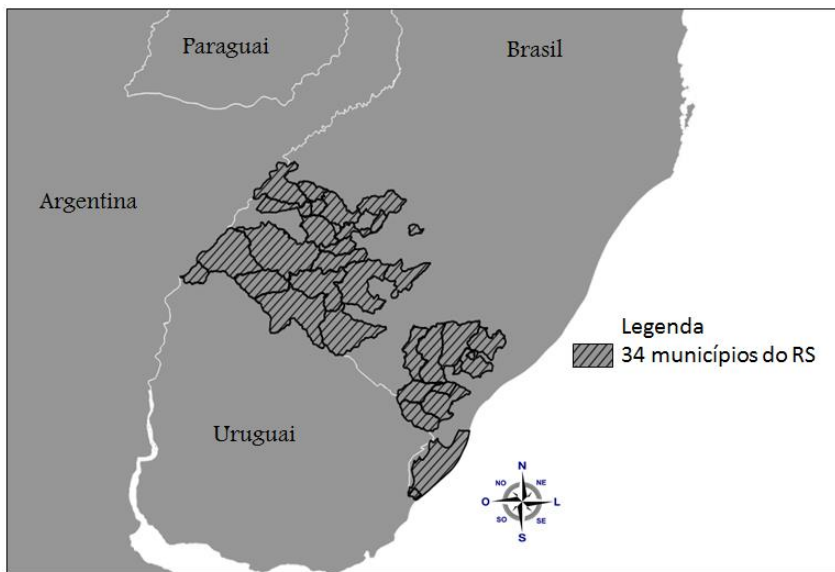
2.2. Amostragem

Neste trabalho realizamos um estudo de natureza quantitativa (Pereira et al., 2018). Para os testes e posterior análise estatística dos resultados, a amostragem foi realizada de forma probabilística estratificada, de acordo com o número de propriedades e municípios de origem dos animais, utilizando-se o programa OpenEpi Versão 3 (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Para isso, a amostra foi calculada utilizando-se o número total dos animais do confinamento, uma população finita de 4.552 animais, contendo animais oriundos de 34 municípios do RS (Figura 1). Os demais parâmetros utilizados foram os seguintes: (1) prevalência de 50%; (2) nível de significância de 5%; e (3) erro de 1% (Thrusfield, 2007). Após a obtenção do número total de animais, houve uma estratificação baseada no percentual da amostra em relação a população finita, calculando-se o número de animais a ser utilizado por município e propriedade. Após, dentro de cada município, houve a seleção randomizada dos animais utilizando-se o programa *Research Randomizer* (<https://www.randomizer.org/>). Neste estudo, nenhum dos bovinos tinha histórico de vacinação contra a leptospirose.

2.3. Amostras

Para a realização do nosso estudo, utilizou-se os soros provenientes de um banco de sangue do próprio confinamento, os quais eram armazenados para possíveis contraprovas. Após este período, as amostras de sangue foram encaminhadas ao nosso laboratório pelos responsáveis pelo confinamento e os tubos de sangue foram centrifugados a 3.000 r.p.m. durante cinco minutos, a fim de obter os soros. Todos os soros foram organizados e mantidos em nosso banco de soros a -20°C até o uso.

Figura 1. Distribuição espacial da procedência dos animais confinados. A amostra abrangeu animais oriundo de 34 municípios do RS, das regiões sul, centro e da campanha.



Fonte: Autores.

2.4. MAT

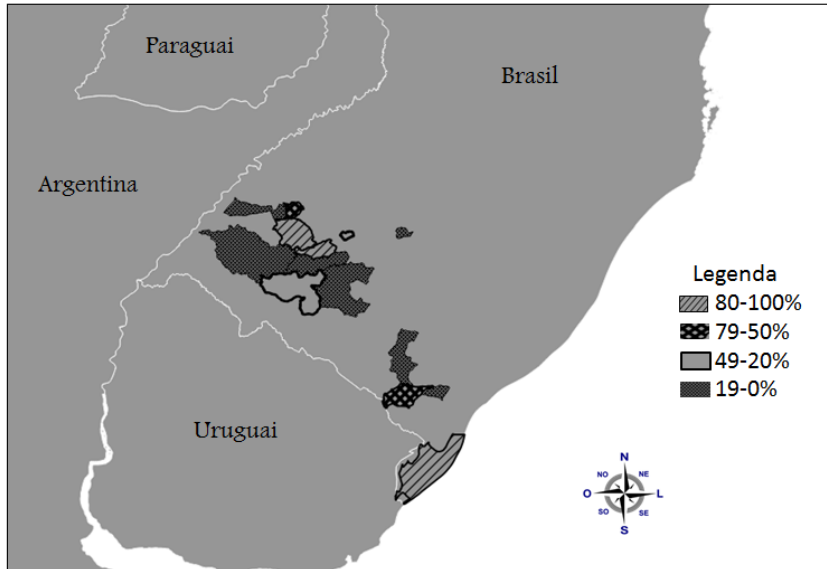
O MAT foi realizado com os soros amostrados conforme recomendações (WHO, 2003). A triagem das amostras foi realizada através da diluição dos soros em PBS (pH 7,2) para uma leitura. Para o teste, uma bateria com 12 antígenos vivos foi mantida em estufa bacteriológica a 29°C, sendo utilizados com 7 dias de crescimento e uma concentração de 10^8 leptospiras/mL. As amostras reagentes na etapa de triagem foram tituladas até 1:6.400. O teste foi considerado reagente quando 50% ou mais do antígeno foi aglutinado, ou quando a densidade do antígeno no complexo antígeno-anticorpo foi menor que 50%.

3. Resultados e Discussão

Dos 355 animais amostrados, 24 (6,76%; IC95% 4,58-9,86) foram reagentes para pelo menos para um dos antígenos no MAT. A Figura 2 mostra um mapa de calor, onde a prevalência varia de acordo com os resultados encontrados no MAT, onde a variação de 80 a 100%, conforme a legenda, mostra animais que reagiram com títulos superiores a 600 e variações de 19% mostrando reações com títulos de 100.

A Tabela 1 mostra os sorovares reagentes no MAT e os títulos de cada município. Os sorovares Hardjo e Icterohaemorrhagiae apresentaram uma prevalência de 2,53%, seguido de Canicola com 1,97% e Grippytyphosa com 1,12%.

Figura 2. Mapa de calor representando a localização das reações dos soros bovinos frente aos antígenos testados, com titulação variando de 100 a 600.



Fonte: Autores.

Na tabela 1 podemos evidenciar que no nosso estudo os títulos de anticorpos variaram de 1:100 a 1:1600. Os sorovares com os mais altos títulos (1:1600) encontrados foram o sorovar Grippytyphosa e o sorovar Hardjo. Esses bovinos não apresentavam sinais clínicos ou uma infecção aguda e assim o título poderia estar aumentando após a coleta de sangue para o exame (Shafbauer et al., 2019). Esses anticorpos poderiam ser relacionados ao procedimento de vacinação, mas conforme informado, os bovinos desse trabalho não foram vacinados.

Os resultados do nosso estudo revelaram uma maior prevalência do sorovar Hardjo, (sorogrupo Serjoe) com 2,53%, o qual está relacionado com bovinos (Ellis, 2015). A identificação deste sorovar como o mais predominante nos animais pode ser explicada através do seu mecanismo de transmissão de bovino para bovino (Figueiredo et al., 2009). No Rio de Janeiro, autores também demonstraram uma maior prevalência desse sorovar nos rebanhos estudados (Balamurugan et al., 2017, Pinna et al., 2018). Este fato também pode ser evidenciado através de uma alta prevalência desse sorovar em rebanho do Paraná e do Rio Grande do Sul (Hashimoto et al., 2012, Herrmann et al., 2012).

Tabela 1. Reações dos 355 soros testados no MAT de acordo com os antígenos utilizados. Apenas os resultados como os 24 soros bovinos reagentes foram mostrados.

Municípios	Soro (ID)	Antígenos reagentes			
		Canicola	Grippotyphosa	Hardjo	Icterohaemorrhagiae
Alegrete	6737		100		
Cacequi	6716				100
Herval	1021			800	
Maçambará	6760				100
Nova Palma	6750			100	
Pedro Osório	18	100			
Pinheiro Machado	6748		100		
Rosário do Sul	6702			400	
Santa Vitória	33				100
Santa Vitória	272				200
Santa Vitória	709			400	
Santa Vitória	1978		1600		
São Francisco	6725			1600	
São Francisco	6732	100			
São Francisco	6749				400
São Francisco	6757	100			100
São Gabriel	6721			100	
São Vicente do Sul	995	400			400
São Vicente do Sul	6710			1600	
São Vicente do Sul	6758	100			
Toropi	244	100	200		400
Toropi	288	100			100
Toropi	351			100	
Unistalda	2391			800	

Fonte: Autores.

Desde o ano de 2004 a exportação de animais vivos, como bovinos e bubalinos, começou a se intensificar no Brasil. Esse fato se deve as melhorias nas condições sanitárias que o rebanho brasileiro vem sofrendo ao longo dos anos, atraindo o interesse de países importadores de animais vivos (BRASIL, 2019). Nos dois semestres de 2018, as exportações

de bovinos atingiram 535 milhões de dólares (BRASIL, 2019), e segundo dados disponíveis, o Brasil exporta animais vivos para todos os continentes, exportando para países como Venezuela, Egito, Turquia, Angola, Iraque, Equador, entre outros

Por se tratar de uma amostra de bovinos jovens (até 24 meses), a prevalência encontrada nos animais demonstra a necessidade de intensificação de medidas de prevenção nas propriedades, principalmente a vacinação, pois é um procedimento prático e eficaz, contribuindo para a redução da doença nos rebanhos e as perdas econômicas causadas pela enfermidade (Pimenta et al., 2014).

A técnica utilizada como teste sorológico, o teste de soroaglutinação microscópica (MAT), é usada para o diagnóstico da doença em nível de rebanho, para prevalência de sorogrupos circulantes nos municípios, e para a detecção individual quando necessário (Otaka et al., 2012, Picardeau, 2013, Ellis, 2015). No entanto, um resultado não reagente ou um título menor do que 1:100, não deve ser usado para definir um diagnóstico laboratorial definitivo, necessitando dessa forma de uma amostra pareada (Hernández-Rodriguez et al., 2011).

A ocorrência do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* nos animais amostrados também foi relatado anteriormente em bovinos (Suepal et al., 2011), demonstrando uma importância na saúde pública. Este sorovar possui maior frequência em seres humanos e está ligado a presença de roedores, podendo os bovinos se infectarem entrando em contato com alimentos ou água contaminada com a urina desses animais (Adler, 2015). Já as reações para o sorovar *Canicola* pode sugerir uma infecção cruzada entre os cães e bovinos, além disso, esses animais infectados podem gerar riscos zoonóticos para agricultores, ordenadores e trabalhadores rurais e de matadouros (Abdollahpour et al., 2009, Balamurugan et al., 2017, Sunder et al., 2018). Por outro lado, a frequência do sorovar *Grippotyphosa*, assim como de sorovares *Pomona*, *Tarassovi* e *Javanica* podem ocorrer como consequência do contato direto e indireto, criações de gado em ambientes fechados onde há contato com outros lotes ou animais de outras espécies que atuam como reservatório de *Leptospira* (Guernier et al., 2016) Além disso, o sorovar *Grippotyphosa* pode estar associado com roedores o que mostram uma transmissão comum de pequenos mamíferos a infecção de animais como os bovinos (Desvars et al., 2013).

Os municípios que se destacaram no estudo, apresentando animais com títulos altos e uma porcentagem de 80-100% no mapa de calor, como Santa Vitória do Palmar, São Francisco de Assis e São Vicente do Sul, são locais onde há predomínio de várzeas e locais alagadiços. Nessas regiões, destaca-se a produção de arroz e a pecuária extensiva, evidenciando-se um ecossistema propício para a presença de animais silvestres e um ambiente

que contribui para a sobrevivência de bactérias como a *Leptospira* (Levett, 2001). Além disso, outras regiões onde há a cultura de tabaco, a correção do pH do solo para valores próximos da neutralidade (7,2-7,4), beneficia a sobrevivência da bactéria (Schneider et al., 2016).

4. Conclusão

A prevalência de 6,76% nos 355 animais amostrados no nosso estudo evidencia uma exposição dos bovinos as leptospirosas, podendo levar a problemas de saúde pública por se tratar de uma zoonose. Dessa forma, os autores sugerem que os proprietários dos animais sejam orientados a realizar a vacinação dos animais.

Estudos futuros poderão utilizar os nossos resultados para planejar estudos epidemiológicos visando a descrição do status da leptospirose nos rebanhos bovinos gaúchos.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

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

Abdollahpour, G., Shafighi, T., & Tabrizi, S. (2009). Serodiagnosis of leptospirosis in cattle in north of Iran, Gilan. *International Journal of Veterinary Research*, 3, 7-10.

Adler, B. (2015). *Leptospira* and leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Berlin, 387, 293.

Balamurugan, V., Alamuri, A., Bharathkumar, K., Patil, S. S., Govindaraj, N., Nagalingam, M., Krishnamoorthy, P., Rahman, H., & Shome, B. R. (2018). Prevalence of *Leptospira* serogroup-specific antibodies in cattle associated with reproductive problems in endemic states of India. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 1131–1138.

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., & Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, 3, 757–71.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2019). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/equador-abre-o-mercado-de-bovinos-vivos-para-o-brasil>. Acesso em 04/11/2020.

Campos, A. P., Miranda, D. F. H., Rodrigues, H. W. S., Lustosa, M. S. C., Martins, G. H. C., Mineiro, A. L. B. B., Castro, V., Azevedo, S. S., & Sousa Silva, S. M. M. (2017). Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Tropical Animal Health Produce*, 49, 899-907.

Desvars, A., Michault, A., & Bourhy, P. (2013). Leptospirosis in the western Indian Ocean islands: What is known so far? *Veterinary Research*, 44, 80.

Dorjee, S., Heuer, C., Jackson, R., West, D. M., Collins-Emerson, J. M., Midwinter, A. C., & Ridler, A. L. (2011). Assessment of occupational exposure to leptospirosis in a sheep-only abattoir. *Epidemiology and Infection*, 139, 797-806.

Ellis, W.A. (2015). Animal leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 99-137.

Figueiredo, A. O., Pellegrin, A. O., Gonçalves, V. S. P., Freitas, E. B., Monteiro, L. A. R. C., Oliveira, J. M., & Osório, A. L. A. R. (2009). Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 375-381.

Guernier, V., Lagadec, E., Cordonin, C., Le Minter, G., Gomard, Y., Pagès, F., Jaffar-Bandjee, M.C., Michault, A., Tortosa, P., & Dellagi, K. (2016). Human leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are rodents the (only) ones to blame? *PLoS Neglected Tropical Disease*, e0004733.

Hashimoto, V. Y., Dias, J. A., Spohr, K. A. H., Silva, M. C. P., Andrade, M. G. B., Muller, E. E., & Freitas, J. C. (2012). Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 99-105.

Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C. A., Dalmau, E. A., & Quintero, G. M. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 1-7.

Herrmann, G. P., Rodrigues, R. O., Machado, G., Lage, A. P., Moreira, E. C., & Leite, R. C. (2012). Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, 13, 131-138.

Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical and Microbiology Review*, 14, 296-326.

Lilenbaum, W., & Martins, G. (2014). Leptospirosis in Cattle: A challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61, 63-68.

Otaka, D., Penna, B., Martins, G., & Lilenbaum, W. (2012). Serology and PCR for bovine leptospirosis: a herd and individual approaches. *Veterinary Record*, 170, 338.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1. Acesso em: 19 Outubro 2020.

Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 43, 1-9.

Pimenta, C. L. R. M., Castro, V., Clementino, I. J., Alves, C. J., Fernandes, L. G., Brasil, A. W. L., Santos, C. S. A. B., & Azevedo, S.S. (2014). Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34, 332-336.

Pinna, M. H., Martins, G. M., Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2018). Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Tropical Animal Health Production*, 50, 883–888.

Schafbauer, T., Dreyfus, A., Hogan, B., Rakotozandrindrainy, R., Poppert, S., & Straubinger R. K. (2019). Seroprevalence of *Leptospira* spp. Infection in Cattle from Central and Northern Madagascar. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 2014.

Schneider, M. C., Najera, P., Pereira, M. M.; Machado, G., Anjos, C. B., Rodrigues, R. O., Cavagni, G. M., Muñoz-Zanzi, C., Corbellini, L. G., Leone, M., Buss, D. F., Aldighieri, S., & Esinal, M. A. (2015). Leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: ecosystem approach in the animal-human interface. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 12, 1-20.

Suepaul, S. M., Carrington, C. V., Campbell, M., Borde, G. A., & Adesiyun, A. (2011). Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical Animal Health Production*, 43, 367e375.

Sunder, J., Sujatha, T., Kundu, A., & Kundu, M. S. (2018). Carrier status and seroprevalence of leptospirosis in cattle of South Andaman. *Indian Journal Animal Research*, 52, 140-143.

Thrusfield, M. (2007). *Veterinary Epidemiology*. 3rd ed. *Blackwell Science*, Oxford.

WHO. World Health Organization (2003) *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*, Malta.

Yatbantoong, N., & Chaiyarat, R. (2019). Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Cattle in Salakphra Wildlife Sanctuary, Thailand. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1042.

2.2 Artigo 2

Padronização de ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros bovinos

Caroline Dewes; João Pedro Mello Silva; Iuri Vladimir Pioly Marmitt; Paula Soares Pacheco; Tanise Pacheco Fortes; Flávia Aleixo Vasconcellos; Samuel Rodrigues Félix; Éverton Fagonde da Silva

Publicado na revista *Brazilian Journal of Development*

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

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 $1-2 \times 10^8$ leptospiiras/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						100					100	100	
Grippytyphosa							100	100					
Hardjo	400	1600		100	1600					100			
Icterohaemorrhagiae			100						400		100		100

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.

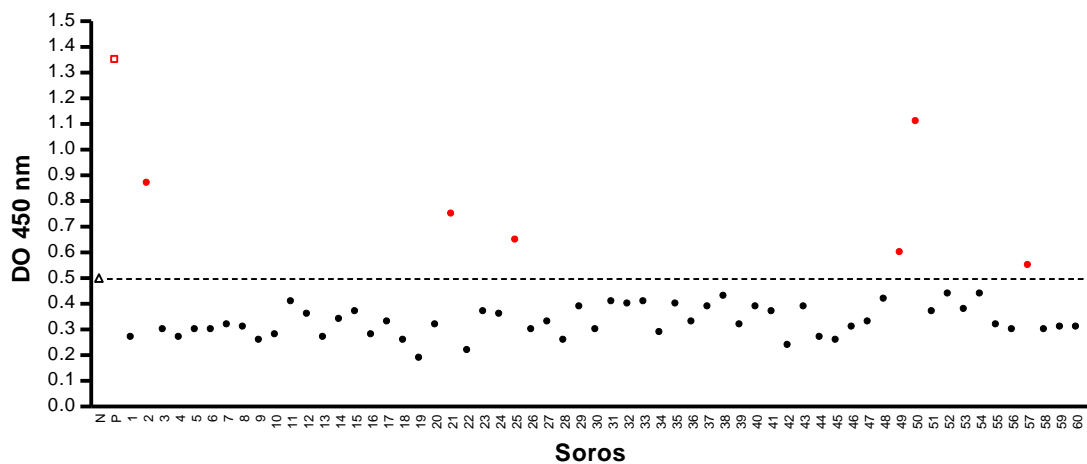


Figura 1. ELISA indireto com os 60 soros bovinos, onde [Δ] representa o pool de soros do controle negativo = N; [□] representa o pool de soros do controle positivo = P; [●] representa os soros reagentes e [●] representa os soros não reagentes. A linha tracejada indica o ponto de corte.

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.; RICARDI, 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 diagnóstico 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.

2.3 Artigo 3

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

Caroline Dewes; João Pedro Mello Silva; Flávia Aleixo Vasconcellos; Gabriele Benatto Delgado; Iuri Vladimir Pioly Marmitt; Samuel Rodrigues Félix; Éverton Fagonde da Silva

Publicado na revista *Brazilian Journal Development*

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**

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 leptospire 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 soroglutinação 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 Encefalopatas 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 $1-2 \times 10^8$ 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 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=Ícterohaemorrhagiae

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, Grippytyphosa 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.

3 Considerações Finais

De acordo com o MAT, a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* nos 355 animais amostrados é de 6,76% (n=24; IC 95% 4,58-9,86). Os sorovares mais prevalentes no estudo são Hardjo e Icterohaemorrhagiae com 2,53%, seguidos de Canicola com 1,97% e Grippotyphosa com 1,12%. Embora a prevalência encontrada foi considerada inferior à média do RS, nossos resultados poderão servir de referência para estudos futuros, tendo em vista que a amostra foi constituída de animais jovens (até 24 meses), machos e sem histórico de vacinação para a enfermidade.

A análise do ELISA indireto revela uma alta especificidade (97,87%), mas uma sensibilidade baixa (38,46%). Por outro lado, o *Dot*-ELISA foi capaz de detectar anticorpos anti-*Leptospira* em 16 (sensibilidade = 94%) dos 17 soros bovinos reagentes no MAT.

De forma geral, nossos resultados demonstram a exposição dos bovinos ao agente, que por sua vez, pode levar a problemas de saúde pública, tendo em vista que os animais não possuíam histórico de vacinação. 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.

Referências

- ADLER, B. History Of Leptospirosis and Leptospira. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, 2015. 301p.
- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2009.
- ANDERSEN-RANBERG, E.U.; PIPPER, C.; JENSEN, P. M. Global patterns of leptospira prevalence in vertebrate reservoir hosts. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, p. 468-477, 2016.
- BOURHY, P. *et al.* Leptospira mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus Leptospira isolated from humans. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4061-4067, 2014.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **One Health basics**. 2018.
- COSATE, M. R. V. *et al.* Whole-genome sequence of leptospira interrogans serovar hardjo subtype hardjoprajitno strain norma, isolated from cattle in a leptospirosis outbreak in Brazil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. e01302-15, 2015.
- DAHER, E. F.; ABREU, K. L. S.; SILVA JUNIOR, G. B. Leptospirosis-associated acute kidney injury. **Journal of Brazilian Nefrology**, v. 4, n. 43, p. 400-407, 2010.
- ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. In: Leptospira and Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1st ed. V. 387. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2015. pp. 99-137.
- FREITAS, D. C. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da USP**, v. 16, n. 1, p. 81-83, 1957.
- GENOVEZ, M. E. Leptospirose em animais de produção. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. (Orgs.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Roca, 2016.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. In: ADLER, B. (Ed.) **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 387, p. 65–97, 2015.
- HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 494–501, 2011.

HERRMANN, G. P. *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, p. 131-138, 2012.

HINES, M. T. Leptospirosis, In: SELTON, D.C.; LONG, M.T. (Ed.). **Equine infectious diseases**. Saint Louis: Elsevier, p. 301-309, 2007.

JULIANO, R. S. *et al.* Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia - GO. **Ciência Rural**, v. 30, n.5, p. 857-862, 2000.

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

LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, p. 63-68, 2014.

LUCAS, D. S. D. *et al.* Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, p. 3413-3418, 2011.

MIASHIRO, A. F. *et al.* Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 41-47, 2018.

MIRAGLIA, F. Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 1, p. 117-121, 2013.

NALLY, J. E.; MONAHAN, A. M.; MILLER, I. S. *et al.* Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the urina of reservoir hosts of leptospirosis. **PLOS One**, v. 6, n. 10, p. 1-9, 2011.

OLIVEIRA, F. C. S. **Leptospirose bovina no Estado da Bahia Brasil**. Prevalência, sorovares predominantes, distribuição espacial e fatores de risco. 123f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OSBUN, B.; SCOTT, C.; GIBBS, P. One World – One Medicine – One Health: emerging veterinary challenges and opportunities. **Revue Scientifique et Technique**, v. 28, n. 2, p. 481-486, 2009.

OTAKA, D. *et al.* Serology and PCR for bovine leptospirosis: a herd and individual approaches. **Veterinary Record**, v. 170, n. 13, p. 338, 2012.

PEREZ, J. *et al.* Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in na área of hyper-endemicity in New Caledonia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. 1-9, 2011.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, p. 1-9, 2013.

PINTO, P. S. *et al.* Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Acta Tropica**, v. 149, p. 163-167, 2015.

RADOSTITS, O. M. *et al.* **Clínica Veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.17-37, 2002.

ROSA, C. A. S. *et al.* Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 29/30, p.19-27, 1969/1970.

SEIXAS NETO, A. C. P. **Isolamento de leptospiras em bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas/RS**. 2012. 39f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SILVA, F. J. da. **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2011.

VASCONCELOS, CH. *et al.* Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição descasos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001–2009. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 20, n. 1, p. 49-56, 2012.

VELLOSO, F. F. **Exportação de bovinos: conhecer para apoiar (ou não)**. 2018.

Disponível em:

<<https://www.google.com.br/amp/s/www.beefpoint.com.br/exportacao-de-bovinosconhecer-para-apoiar-ou-nao-por-fernando-furtado-velloso/>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

ZASLAVSKY H. A. **Exportação de bovinos vivos e análise da rastreabilidade bovina no Brasil para o mercado da carne**. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.