

CARACTERIZAÇÃO DE UMA SOROTECA CANINA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIROSE CANINA

DOMINGUES, Micaela¹; PEREIRA, Wallace Moraes¹; XAVIER, Rafaela Gomes¹; CRUZ MCBRIDE, Flávia Weykamp²; MCBRIDE, Alan John Alexander³

¹Universidade Federal de Pelotas/Graduação em Biotecnologia; ²Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA; ³Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia.
Micaela_domingues@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença zoonótica emergente de nível global e de grande importância para saúde pública, merecedora de uma atenção redobrada principalmente nos países em desenvolvimento (MCBRIDE et al., 2005; REIS et al., 2008; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). A leptospirose, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, trata-se de uma doença que pode perpetuar tanto para falência renal aguda quanto hemorragia pulmonar severa. Em humanos, a leptospirose é geralmente transmitida através do contato com animais carreadores da doença (reservatórios) ou água e/ou solo contaminado pela urina destes quando infectados. De fato diversos mamíferos estão envolvidos na transmissão por carregarem leptospiras patogênicas, dentre eles os ratos, cães, bovinos, suínos, além de outros mamíferos (BHARTI et al., 2003). Dentre os reservatórios, o rato é destacado como o animal de maior incidência na transmissão da leptospirose para humanos, principalmente no ambiente urbano (FAINE et al., 1999). Entretanto, os cães também são importantes reservatórios (TREVEJO et al., 1998), sendo considerados como a segunda principal fonte de infecção para o homem (BROD et al., 2005). A importância dos cães como um dos principais reservatórios se dá devido ao contato com seus donos, o que pode resultar na infecção de humanos.

Comumente, a apresentação da doença na fase inicial não é específica, devido a isso os testes disponíveis atualmente para diagnóstico não apresentam uma sensibilidade adequada na detecção da leptospirose em fase inicial (MCBRIDE et al., 2005). Sendo assim, há uma grande necessidade de desenvolvimento de um teste de diagnóstico que identifique os animais que apresentam a doença durante sua fase inicial.

Um teste confiável e rápido para a leptospirose canina traria diversos benefícios importantes tanto para animais como para a saúde pública. Devido ao exposto, este trabalho tem como objetivo a caracterização de uma soroteca canina visando o desenvolvimento de um ensaio imunodiagnóstico para leptospirose canina, tanto no formato ELISA quanto pela elaboração de um teste rápido.

2 METODOLOGIA

2.1. Vigilância sanitária

Nossos colaboradores da Fiocruz-BA foram responsáveis por uma vigilância ativa para leptospirose canina em Salvador, desde agosto de 2007, em colaboração com o Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Salvador.

2.2. Caracterização dos soros caninos pelo MAT

Do resultado da vigilância, 358 amostras de soros caninos foram caracterizadas pelo teste de microaglutinação (MAT) utilizando 11 sorovares de *Leptospira* spp: Autumnalis, Ballum, Bataviae, Copenhageni, Canicola, Grippotyphosa, Hardjobovis, Hebdomadis, Javanica, Pomona e Panama. Títulos $\geq 1:50$ foram considerados evidência de exposição prévia. O MAT foi realizado como descrito anteriormente (WHO e ILS, 2003).

2.3. Caracterização dos soros caninos por ELISA

O ELISA foi padronizado utilizando *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni como antígeno. Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 10^7 células por poço de um extrato de leptospirosas. As diluições de soro e do anticorpo anti-IgG canina conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch) foram padronizadas com um banco prévio de nove soros negativos e oito positivos pelo MAT (G1), como descrito anteriormente (MCBRIDE et al., 2007). Em uma segunda etapa, 32 soros de animais sadios e 20 soros verdadeiros positivos (animais não vacinados) caracterizados pelo MAT (G2) foram usados para estabelecer o ponto de corte para o ELISA-IgG.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 358 amostras de soro testadas pelo MAT, foram identificados 274 animais positivos e 84 animais negativos. Sendo assim, 45,5% foram soropositivas para pelo menos um dos 11 sorovares usado no MAT. Houve o predomínio do sorovar Copenhageni como provável agente infectante em 37% dos cães seguido por Hardjobovis (26,1%), Grippotyphosa (4,3%), Ballum (4,0%), Autumnalis (4,0%) e Canicola (2,2%). Ao analisar os dados obtidos por MAT, foi visto que, dentre 273 soros coletados de cães vacinados contra leptospirose, 233 (85,3%) foram positivos pelo MAT e 40 (14,6%) foram negativos. Dos cães não vacinados, 41 (48,2%) foram positivos pelo MAT e 44 (51,8%) foram negativos (Tab.1).

Tabela 1 - Caracterização de soros de cães vacinados e não vacinados contra leptospirose por MAT e ELISA.

Tipo de caracterização	Vacinados	Não Vacinados	Total
MP	233(85,3%)	41(48,2%)	274(76,5%)
MN	40(14,6%)	44(51,8%)	84(23,5%)
EP	137(50,1%)	36(48,0%)	173(49,7%)
EN	136(49,9%)	39(52,0%)	175(50,2%)

MP – MAT positivo; MN – MAT negativo; EP – ELISA positivo; EN – ELISA negativo

Ao usar os soros de G1 para padronizar o ELISA IgG para leptospirose canina, a média DO_{450} dos soros negativos obtidas foi de $0,13 \pm 0,05$ (desvio padrão

[DP]) e o ponto de corte foi igual a média mais duas vezes o DP, sendo $DO_{450} = 0,22$. Os soros de G2 foram usados para confirmar esses dados, tendo uma absorbância média de $0,13 \pm 0,05$, conforme (Fig. 1A). Com este ponto de corte foi possível discriminar os soros negativos e positivos (Fig. 1A). Logo o ELISA dos soros de G2 apresentou 100% especificidade e sensibilidade. A caracterização dos soros coletados durante a vigilância pelo ELISA ($n = 348$) identificou 173 (49,7%) soros como positivo ($DO_{450} > 0,22$) e 175 (50,2%) como negativo. Ao analisar os soros de animais não vacinados ($n = 75$) identificou-se 36 (48,0%) como positivo e nos animais vacinados ($n = 273$) 137 (50,1%) (Fig. 1B). Desta forma, quando comparado o MAT com o ELISA, 45,7% dos soros no grupo NV e 19,5% no grupo V foram positivo pelos dois métodos.

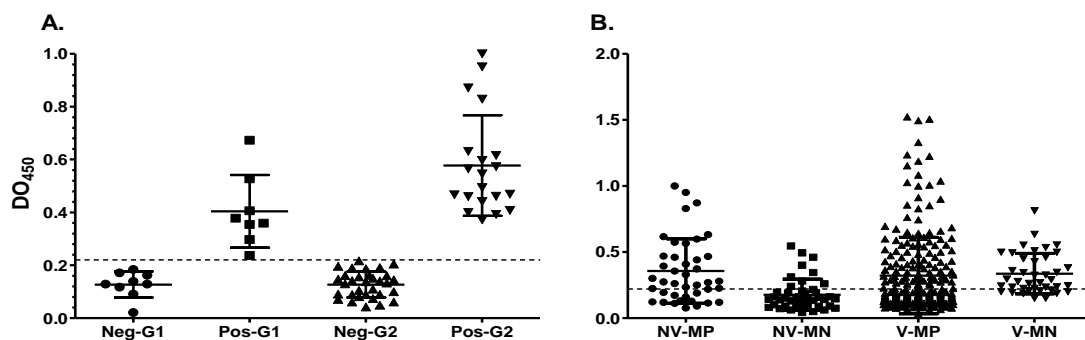


Figura 1. ELISA IgG para soros caninos. A. Ponto de corte do ELISA e seu desempenho com os soros de G2. B. Soros caninos da vigilância ($n = 358$). NV – Não vacinados; V – vacinados; MP – MAT positivo; MN – MAT negativo. O ponto de corte (linha pontilhado) é exibido ($DO_{450} = 0,22$). A linha horizontal representa a média de cada grupo e as barras de erro o desvio padrão (DP).

Durante a vigilância coletou-se 358 amostras de soro, caracterizados por MAT e ELISA. A prevalência de leptospirose com base no teste padrão para leptospirose, o MAT, foi 45,5%, o que apresenta semelhança com outros estudos no Brasil (HAGIWARA e ROSA, 1975; CASTRO et al., 2011). Entretanto, deve-se considerar o fato de que a maioria dos cães foram vacinados pelo menos uma vez, e isso pode confundir o resultado do MAT, aumentando artificialmente a prevalência. Dos cães que nunca foram vacinados, a prevalência de leptospirose foi 48%. O principal sorovar foi Copenhageni, o mesmo agente responsável para a maioria dos casos de leptospirose humana no Brasil (MCBRIDE et al., 2005; REIS et al., 2008). O ELISA IgG foi padronizado com dois grupos de soro independentes, e na análise dos soros coletados na vigilância, identificou 48 e 50% dos animais não vacinados e vacinados, respectivamente, como positivo. A concordância entre o MAT e o ELISA foi baixa, provavelmente devido ao uso do conjugado IgG. Devido a isso, um conjugado IgM está sendo avaliado, pois pode aumentar a sensibilidade do ELISA.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho obtivemos um banco de soros caninos bem caracterizados, incluindo tanto animais saudáveis quanto animais positivos para leptospirose. Foi possível identificar animais positivos que não foram vacinados contra leptospirose e animais na infecção aguda. Atualmente estes soros estão sendo usados na avaliação de antígenos recombinantes para o desenvolvimento de um teste rápido para leptospirose canina.

5 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p. 287-96, 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. e VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.12, p. 757-71, 2003.
- BROD, C. S.; ALEIXO, J. A.; JOUGLARD, S. D.; FERNANDES, C. P.; TEIXEIRA, J. L. e DELLAGOSTIN, O. A. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.4, p. 294-300, 2005.
- CASTRO, J. R.; SALABERRY, S. R.; SOUZA, M. A. e LIMA-RIBEIRO, A. M. Predominant Leptospira spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlandia, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.2, p. 217-222, 2011.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C. e PEROLAT, P. Leptospira and leptospirosis. **Melbourne: MediSci**, 1999
- HAGIWARA, M. K. e ROSA, C. A. Canine leptospirosis in the state of Sao Paulo (author's transl). **Arq Inst Biol**, São Paulo, v.42, p. 111-8, 1975.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p. 376-86, 2005.
- MCBRIDE, A. J.; PEREIRA, F. A.; DA SILVA, E. D.; DE MATOS, R. B.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; REIS, M. G. e KO, A. I. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospire assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Acta Trop**, v.102, n.3, p. 206-11, 2007.
- REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G. e KO, A. I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p. e228, 2008.
- TREVEJO, R. T.; RIGAU-PEREZ, J. G.; ASHFORD, D. A.; MCCLURE, E. M.; JARQUIN-GONZALEZ, C.; AMADOR, J. J.; DE LOS REYES, J. O.; GONZALEZ, A.; ZAKI, S. R.; SHIEH, W.-J.; MCLEAN, R. G.; NASCI, R. S.; WEYANT, R. S.; BOLIN, C. A.; BRAGG, S. L.; PERKINS, B. A. e SPIEGEL, R. A. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, n.5, p. 1457-1463, 1998.
- WHO e ILS. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **Malta: World Health Organization**, 2003.