



ERP-Y-LEMA: TECNOLOGIA BRASILEIRA ALTERNATIVA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM OVINOS

LAURA DIAS DA SILVA RIBEIRO; THAYNÁ LANER CARDOSO; DANIELA
RODRIGUERO WOZEAK; ISABEL LADEIRA PEREIRA; DAIANE DRAWANZ
HARTWIG

RESUMO

Introdução: A leptospirose é uma zoonose globalmente prevalente, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Prejudica humanos e animais de diferentes regiões, sendo uma das principais causas de perdas econômicas na agricultura. A transmissão ocorre pelo contato com urina, água ou solo contaminados, sendo todos os mamíferos suscetíveis. O diagnóstico é desafiador devido à baixa disponibilidade de testes e sintomas inespecíficos. **Objetivo:** Desenvolver um modelo de diagnóstico alternativo mais eficiente, rápido e econômico para a leptospirose em ovinos, substituindo o teste padrão de aglutinação microscópica (MAT) por um ELISA indireto baseado na quimera recombinante Erpy-LemA como antígeno, resultando em um teste mais sensível e rápido. **Materiais e Métodos:** A quimera recombinante foi produzida em trabalhos anteriores conforme o depósito de patente BR10202301061. Através do ELISA indireto foram avaliadas 259 amostras de soros ovinos, todas previamente positivadas previamente pela MAT e correspondente a diferentes sorovares e titulações. Os resultados foram submetidos à análise ROC, utilizando o software de estatística. **Resultados:** O ELISA indireto com a rErpy-LemA como antígeno apresentou excelentes resultados, nos quais os soros ovinos com título equivalente a 200 apresentaram ponto de corte de 0,254 e AUC=0,998, enquanto a sensibilidade e especificidade obtidas foram de 97,9% e 98%, respectivamente. Os soros com título 100, apresentaram ponto de corte de 0,254, e AUC=0,954, a sensibilidade e especificidade obtidas foram de 84,1% e 98,5%. **Conclusão:** O desenvolvimento do ELISA com rErpy-LemA oferece uma alternativa viável ao MAT para diagnóstico da leptospirose em ovinos, especialmente em regiões com recursos diagnósticos limitados. Esta abordagem pode contribuir para o controle eficaz da leptospirose em áreas rurais e impactar positivamente a economia, reduzindo os prejuízos associados à doença em rebanhos, como no contexto brasileiro.

Palavras-chave: Zoonose; Leptospirose; Diagnóstico; Sorologia; Proteínas recombinantes.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é a zoonose mais comum do mundo, afeta animais domésticos e silvestres, bem como o humano (Haji Hajikolaei et al., 2022). A maior incidência de casos se concentra em regiões de climas tropicais e subtropicais. A prevalência dessa doença se dá em locais onde há falta de saneamento básico, e o acesso a diagnósticos é dificultado (Azócar-Aedo, 2023).

A transmissão ocorre pelo contato com leptospirosas patogênicas presentes, principalmente na urina de roedores, bem como, água, leite ou solo contaminados (Caimi et al., 2020). As leptospirosas pertencem ao gênero *Leptospira*, sendo a *Leptospira interrogans* a

principal espécie causadora da doença; até o momento, foram descritos 300 sorovares distintos deste gênero (ESTEVES et al., 2018).

Os sintomas clássicos da fase aguda da leptospirose em animais incluem febre, letargia, hemoglobínúria e anorexia grave (Zacarias et al., 2008). A FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) declara que o Brasil é um dos maiores produtores de carne ovina do mundo, estando dentre os dez maiores produtores mundiais, desse modo, os impactos financeiros causados pela leptospirose são de grande importância nacional.

O Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) é o teste padrão ouro, sendo referência sorológica para diagnósticos de leptospirose (Jayasundara et al., 2021), contudo, é um método laborioso e necessita de um elevado de recurso financeiro. Além disso, diversos estudos relatam uma baixa sensibilidade quando comparado com outros métodos como o ELISA indireto (Zin et al., 2019). Neste contexto, a proteína recombinante ErpY-like é descrita como epítipo de *L. Interrogans*, sorovar Pomona, demonstrou eficácia na proteção de hamsters contra infecções letais (Oliveira et al., 2018) e principalmente, apresentou precisão quando utilizada como antígeno para diagnóstico de infecções em modelos suínos através de ELISA sorológico (Padilha et al., 2019). A lipoproteína LemA apesar de não ter sido utilizada para o diagnóstico, mostrou eficácia para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose (Hartwig et al., 2013, 2011; Oliveira et al., 2020, 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho visou a produção de uma tecnologia brasileira para o diagnóstico sorológico de leptospirose ovina, baseado na quimera multi-epítipos rErpy-LemA, avaliando assim seu potencial antigênico, sendo uma alternativa benéfica tanto para a segurança dos manipuladores de amostras contaminadas, quanto para a economia como um todo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção da quimera recombinante (rErpy-LemA)

A expressão foi realizada previamente conforme o depósito de patente (BR10202301061).

2.2 Amostras de soro

Um total de 259 amostras de soro ovino foram avaliadas, todas previamente testadas por MAT, com titulação e sorovares determinados. Destas amostras, 66 soros eram negativos e 193 positivos para leptospirose, sendo 145 amostras com títulos de 1:100 e 48 com títulos de 1:200. Além disso, todos os 193 soros positivos tiveram a pré-determinação de sorovares por MAT, totalizando 15 referenciados nas amostras avaliadas, sendo Australis, Autumnalis, Castelloni, Celledoni, Grippotyphosa, Hardjo, Hardjo Norma, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Sejroe, Shermani e Wolff.

2.3 ELISA indireto

Com o objetivo de avaliar o potencial da quimera recombinante rErpy-LemA para o diagnóstico da leptospirose em ovinos, bem como a eficácia no reconhecimento de diferentes sorovares, todos os soros de animais naturalmente infectados com diferentes sorovares de *Leptospira* spp. foram avaliados. Para isso, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Polysorp – Thermo Scientific, Waltham, MA) foram sensibilizadas com 200 ng de proteína, diluídas em tampão carbonato- bicarbonato pH 9,6 (100 µL por poço) e armazenadas durante a noite a 4°C. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com uma solução (PBS 1×, 5% de leite em pó) por 90 minutos, sendo então os soros adicionados (diluídos 1:100 em solução de PBS 1×, pH 7,4) e mantidos durante a noite a 4°C. Para detecção do complexo antígeno-

anticorpo formado, foram utilizados anticorpos anti-IgG ovino conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) na diluição de 1:6.000 e incubados por 1 hora a 37°C. Entre todas as etapas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1×. As reações foram reveladas com uma solução de substrato/cromógeno contendo o-fenilenodiamina (0,4 mg/mL em tampão citrato 0,1 M, pH 4,0) e 0,03% de H₂O₂ por 20 minutos, sendo então a reação interrompida com solução de ácido sulfúrico H₂SO₄ 2N. Como controle de qualidade, todas as placas tiveram um controle negativo e positivo. Além disso, os testes foram realizados em duplicata e em diferentes dias, evitando resultados errôneos. As densidades ópticas (OD) foram medidas a 492 nm utilizando um leitor de placas VICTORTM X5 Multilabel (Perkin Elmer, EUA).

2.4 Análises estatísticas

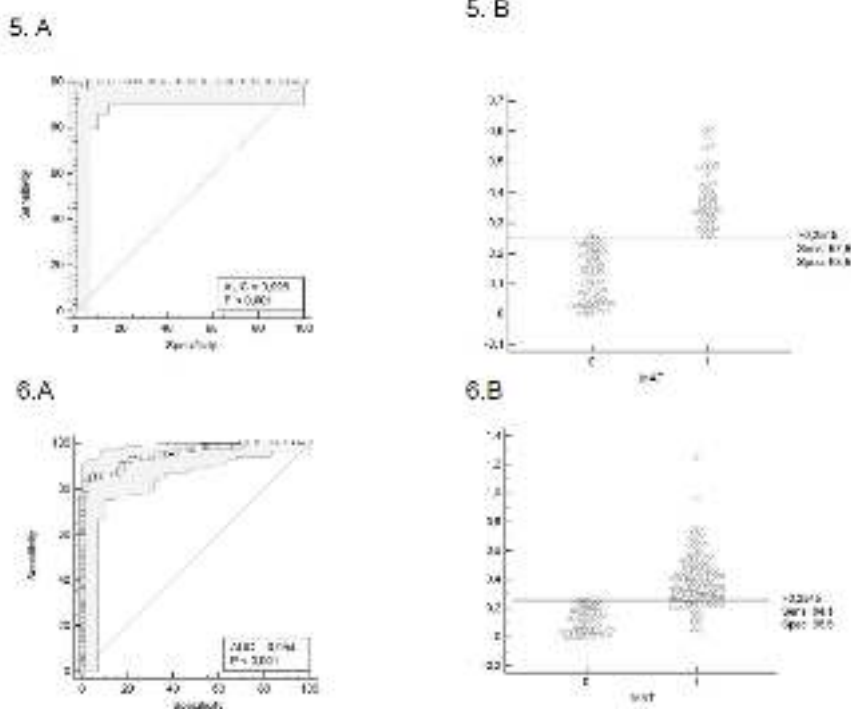
As análises estatísticas para determinar o ponto de corte, sensibilidade, especificidade e curva ROC (AUC) foram realizadas usando o software estatístico MedCalc (versão 8.0.0.0). Para avaliar a resposta do teste em relação aos sorovares, o ponto de corte obtido foi analisado e comparado com a absorbância de cada amostra, permitindo a identificação de sorovares reativos ou não reativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização da químera recombinante, ErpY-LemA, como antígeno em um ensaio ELISA, para avaliação de soros ovinos previamente avaliados pela MAT, apresentou resultados promissores. Quando avaliamos os soros ovinos com titulação equivalente a 200, o cut-off estabelecido foi de 0,254 e AUC= 0,998, assim a sensibilidade e especificidade obtidas foram de 97,9% e 98%, respectivamente. Os soros com títulos iguais a 100, apresentaram uma leve queda em relação a sensibilidade, alcançando 84,1%, enquanto a especificidade permaneceu em 98,5%, com uma AUC= 0,954 e um cut-off de 0,254 (Fig.1). Além disso, a identificação dos sorovares correspondentes em amostras de ovinos indica grande aplicabilidade desses antígenos no reconhecimento de diferentes cepas de *Leptospira* spp., ressaltando a importância da diversidade sorológica na epidemiologia dessa doença (Caimi et al., 2020).

Esses resultados são inovadores, pois a busca por um diagnóstico em ovinos não é um tema recorrente e isto se deve principalmente a reduzida suscetibilidade dos ovinos à leptospirose, quando comparada a outros animais (MELO et al., 2010). No entanto, a infecção é comum, e muitas vezes esses animais atuam como hospedeiros assintomáticos e portadores, sendo uma característica preocupante, pois facilita a transmissão da doença para indivíduos que tenham um contato direto, como fazendeiros e veterinários (AGUIAR et al., 2020). É crucial destacar que, apesar da leptospirose ovina ser relacionada, principalmente, como uma questão econômica, é também um problema de saúde pública. Assim, medidas eficazes para prevenir e controlar a leptospirose ovina não são apenas restritas a proteger a saúde animal e os interesses econômicos, mas também proteger a saúde humana.

Figura 1: Diagrama e Curva ROC das amostras de ovinos avaliadas, demonstrando a sensibilidade, especificidade, ponto de corte e AUC do teste sorológico ELISA. 5- Amostras com títulos iguais a 200. 6-Amostras com títulos iguais a 100. A- Curva ROC; B- Diagrama comparativo, onde 0 são soros verdadeiramente negativos e 1 são soros variantes positivos. (P<0,001).



4 CONCLUSÃO

A leptospirose representa um desafio significativo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, devido à falta de saneamento básico e recursos para um diagnóstico e tratamento adequado. A prevalência da doença afeta não apenas a saúde pública, mas também gera grandes impactos financeiros, especialmente em países com grandes setores agrícolas, como o Brasil. A busca por métodos diagnósticos mais eficazes, como o desenvolvimento de um ELISA utilizando a quimera recombinante rErpy-LemA, representa uma promissora alternativa ao teste de aglutinação microscópica (MAT) tradicional. Os resultados obtidos demonstram uma sensibilidade e especificidade elevadas, destacando o potencial desse antígeno na detecção de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. em ovinos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do município de Monte Negro, estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 529– 532, 2020. DOI: 10.1590/1808-1657v77p5292010.
- AZÓCAR-AEDO, L. Basic Aspects and Epidemiological Studies on Leptospirosis Carried Out in Animals in Chile: A Bibliographic Review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 2, p. 97, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020097>. Acesso em: 18/04/2024.
- CAIMI, K.; RUYBAL, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, p. 104241, 2020. ISSN 1567-1348. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>. Acesso em: 18/04/2024.
- HAIJ HAJIKOLAEI, M. R. et al. The role of small ruminants in the epidemiology of leptospirosis. **Scientific Reports**, v. 12, p. 2148, 2022. Disponível em: <https://doi.org/>

10.1038/s41598-022-05767-x.

HARTWIG, D. D. et al. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p. 747-752, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00034-13>.

ESTEVES, L. M. et al. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real- Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of **Leptospira at the Onset of Disease**. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27555-2>.

MELO, L. De S. S. et al. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* sp em ovinos. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1235–1241, 2010. DOI: 10.1590/ S0103-84782010005000072.

OLIVEIRA, T.L. et al. DNA nanovaccines prepared using LemA antigen protect Golden Syrian hamsters against *Leptospira* lethal infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. 1-6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760190396>.

PADILHA, B. C. R. et al. ErpY-like protein, a promising antigen to leptospirosis control: characterization of antigenic and immunogenic potential. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 44, p. 1-9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v44i1.61160>.

ZACARIAS, F. G. D. S. et al. Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 744-748, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400028>.