

Rev Biomed 1999; 10:167-172.

Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología por ensayo inmuno enzimático (ELISA) en leptospirosis canina.

Artículo Original

Daniel Arias¹, Sandra Arauz², Alejandra Stornelli², Nestor Oscar Stanchi¹, Enrique Renner³, Pablo E. Martino^{1,4}, Mercedes Gatti¹.

¹Cátedra de Microbiología. Laboratorio de Leptospirosis, ²Servicio del Laboratorio Central de Clínicas. ³Cátedra de Clínica de Grandes Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, ⁴Comisión de Investigaciones Científicas. Provincia de Buenos Aires. Argentina.

RESUMEN.

Introducción. La Leptospirosis es una enfermedad, que frecuentemente pasa sub diagnosticada debido a la falta de una prueba de diagnóstico de fácil realización. Dentro de las técnicas de laboratorio, las inmuno-enzimáticas, se encuentran entre las de mayor sensibilidad. El presente trabajo tiene por objetivo el desarrollo de la técnica de ELISA, que permita la detección diagnóstica de la Leptospirosis en forma rápida, sencilla y económica.

Material y métodos. Se utilizaron como antígeno (Ag) cultivos vivos de *Leptospira interrogans* sv. *icterohaemorrhagiae* con distintos tratamientos: cultivo total, sonicado, termo resistente (TR) y TR sonicado. La prueba se realizó con 29 sueros caninos sospechosos clínicamente de leptospirosis, diluido en PBS 1/8; utilizándose 3 controles negativos y 3 controles positivos. Todos los sueros fueron comparados con la técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) utilizando como Ag la misma

cepa utilizada para ELISA.

Resultados. Los resultados de este estudio muestran que de 29 sueros analizados 10 (34%) dieron resultados positivos. Todos los controles positivos dieron desarrollo evidente de color en los pocillos, no variando su color los controles negativos. La correlación con la técnica de MAT fue de +0,80 (Ag sonicados) y +0,70 (Ag sin sonicar) según los antígenos utilizados.

Discusión. Esta técnica de rápida realización (150 minutos) podría ser adaptada a cualquier laboratorio y permitiría su uso como método de diagnóstico tamiz de Leptospirosis en caninos. (*Rev Biomed 1999; 10:167-172*)

Palabras clave: Leptospirosis, caninos, ELISA.

SUMMARY.

Comparison of four antigens in immuno

Solicitud de sobretiros: Prof. Dr. Nestor Oscar Stanchi CC 296 (1900) La Plata, Argentina. TEL/FAX: +54-221-4257980

E-mail: stanchi@fcv.medvet.unlp.edu.ar

Recibido el 22/Julio/1998. Aceptado para publicación el 13/Abril/1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991035.pdf>

D Arias, S Arauz, A Stornelli, NO Stanchi, E Renner, PE Martino, M Gatti.

enzymatic assay (ELISA) for specific antibody determination in a serology of leptospirosis in dogs.

Introduction. Leptospirosis is a disease that frequently turns out sub diagnosed due to the lack an easily performed diagnostic test. Among the diagnostic techniques, the immuno enzymatic ones are among those of greater sensibility. The aim of this study is to develop the techniques of ELISA that allow for the diagnostic detection of Leptospirosis in a quick, simple and economic way.

Material and methods. Live cultivation of *Leptospira interrogans* sv *icterohaemorrhagiae* were used as antigen (Ag) with different treatment: total Ag, sonicated Ag, thermo resistant Ag (TR) and sonicated TR Ag. The test was carried out on 29 clinically suspicious canine sera of leptospirosis, diluted in PBS 1/8; using 3 negative and 3 positive controls. All sera were compared with Microscopic Agglutination Test (MAT) using as Ag the same strain used in ELISA.

Results. The results of this study show that out of 29 analyzed sera 10 (34%) were positive. All the positive control gave evident color development in the wells, with no change in the negatives ones. Correlation with the technique of MAT was +0.80 (sonicated TR) and +0.70 (TR) according to the antigen used.

Discussion. This quick technique (150 min) could be adapted to almost any laboratory and could be used as a diagnostic screening method of canine leptospirosis.

(Rev Biomed 1999; 10:167-172)

Key Words: Leptospirosis, dog, ELISA.

INTRODUCCIÓN.

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica, que es frecuentemente subdiagnosticada debido, entre otras causas, a la falta de una prueba de diagnóstico de fácil realización (1).

La serología es todavía el método de diagnóstico más importante en leptospirosis tanto en

animales como en el hombre. A pesar que la técnica de aglutinación microscópica (MAT) es el método de referencia en el diagnóstico serológico, presenta varias desventajas como la necesidad de mantener cepas de leptospiras vivas por repique y personal altamente entrenado en su realización. Una gran variedad de métodos alternativos de diagnóstico tales como fijación de complemento, aglutinación macroscópica, ensayo inmunoenzimático (ELISA), entre otros, han sido desarrollados. Dentro de las técnicas de laboratorio, los ELISA, se encuentran entre las de mayor sensibilidad (2,3). Estas pruebas pueden ser realizadas usando una simple preparación antigénica. Sin embargo un número importante de diferentes procedimientos han sido descritos para el desarrollo del ELISA, así como diferentes preparaciones antigénicas, conjugados a distintas enzimas y distintos sistemas de detección. Sin embargo la preparación antigénica es el elemento fundamental que podrá hacer variar la sensibilidad y especificidad de esta técnica.

Entre las distintas preparaciones antigénicas utilizadas se encuentran: a) suspensión de leptospiras rotas por sonicación; b) leptospiras enteras pegadas a la placa mediante poly-L-lisina y glutaraldehído; c) extracto etanólico de leptospiras, y d) sobrenadante de un cultivo calentado de leptospiras (3).

En un estudio realizado por Terpstra y col. (4) examinando sueros de pacientes humanos recientemente infectados por distintas serovares de leptospiras usando ELISA, observaron que los sueros reaccionaban prácticamente en forma idéntica entre la serovar infectante y otras serovares, concluyendo que el ELISA, usando un solo Ag, puede ser usado como prueba género específica para el diagnóstico de la leptospirosis.

Banfi y col. (5) evaluaron un ELISA en el cual una cepa de *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* se pegó a placas de poliestireno por evaporación. Por otro lado Chapman y col. (6, 7) compararon el ELISA con la prueba de MAT usando Ag sonicado mientras

ELISA en leptospirosis canina.

que Adler y col. (8) utilizaron la cepa Winjberg sonicada, centrifugada y usando el sobrenadante como Ag, mientras que Terpstra (4) utilizó una preparación calentada de leptospiras.

No hemos encontrado referencia bibliográfica en donde ambos procesos se evaluaran en un mismo Ag, por lo que se ha realizado en este trabajo una comparación entre los antígenos sonicados y sin sonicar sometidos a calentamiento.

Además el presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de la técnica de ELISA, que permite la detección diagnóstica de la Leptospirosis en forma rápida, sencilla y más económica que la prueba de MAT.

MATERIALES Y MÉTODOS.**Antígenos:**

Se utilizó una cepa de referencia internacional de *Leptospira interrogans* sv. *icterohaemorrhagiae* Winjberg, desarrollada en medio Ellinghausen modificado por Jhonson y Harris (EMJH) en cultivo agitado a 28°C hasta consumo total de Tween 80, en 1 litro de medio de cultivo (9). Una vez comprobado el desarrollo de leptospiras, el cultivo fue procesado de la manera abajo indicada a los efectos de producir finalmente los antígenos seguidos: a) antígeno total; b) antígeno total sonicado; c) antígeno termoresistente; d) antígeno termoresistente sonicado.

Antígeno total (AT): a un volumen de 250 mL de antígeno preparado en el paso anterior se le agregó formol a una concentración del 0,5 % (v/v), denominándosele antígeno total.

Antígeno total sonicado (ATS): un volumen de 250 mL de medio formolado como el paso anterior (AT) fue sonicado en pequeños volúmenes en un sonicador a potencia de 10 khz en 2 períodos de 15 segundos.

Antígeno termo resistente (ATR): 250 mL del cultivo fueron calentados en baño María a

ebullición durante 30 minutos. Adicionándole formol a una concentración del 0,5 % (v/v). A este antígeno se lo denominó ATR.

Antígeno termo resistente sonicado (ATRS): 250 mL de cultivo obtenido como en el paso anterior (ATR) fueron sonicados en pequeños volúmenes en un sonicador a potencia de 10 khz en 2 períodos de 15 segundos.

Técnica de ELISA:

Se realizó la técnica de ELISA sensibilizando placas Nunc, con 100 µl del cultivo en cada pocillo. La dilución de corte y titulación de uso de gamma globulina marcada fue establecida en un ensayo previo de acuerdo a la metodología recomendada por Kurstak E. (10).

Se estudiaron 29 sueros caninos provenientes de clínicas veterinarias privadas de la ciudad de La Plata, Berisso y Ensenada (Provincia de Buenos Aires) con signos clínicos de leptospirosis, los que fueron diluidos en PBS 1/8 utilizándose 3 controles negativos y 3 controles positivos (sueros positivos por MAT a la dilución 1/200) por cada policubeta de ELISA.

Los sueros fueron incubados 1 hora a 37°C. Luego del lavado con PBS/Tween 20 se agregó anti inmunoglobulina G (IgG) canina marcada con peroxidasa (Bethyl Laboratories, USA), incubándose 1 hora a la misma temperatura. Luego de un nuevo lavado se reveló la prueba con H₂O₂ y OPD como reactivo de color, frenándose a los 15 min la reacción con SO₄H₂ 2N. La lectura se realizó a ojo desnudo. Todos los sueros fueron comparados con la técnica de MAT utilizando como Ag la misma cepa utilizada para ELISA (11).

Prueba de Aglutinación Microscópica:

Se realizó paralelamente la prueba de aglutinación microscópica para leptospirosis (técnica de referencia internacional) para evaluar la correlación de resultados entre los distintos antígenos y técnicas utilizados. La misma fue realizada en policubetas según Faine S. (9), que

D Arias, S Arauz, A Stornelli, NO Stanchi, E Renner, PE Martino, M Gatti.

básicamente consiste en enfrentar diluciones del suero con antígeno vivo de leptospiras. Luego de incubar 1 hora a 28°C se observa la presencia de grumos de aglutinación en microscopía en fondo oscuro. Se consideraron reactivos aquellos sueros que aglutinaron 50% o más leptospiras con respecto a un control. Los estudios estadísticos fueron realizados mediante el programa EPI6 (12).

RESULTADOS.

Los resultados de este estudio muestran que de los distintos antígenos estudiados aquellos que fueron sonicados (ATS y ATRS) se comportaron mejor con los sueros controles.

Por otro lado de los 29 sueros analizados 10 (34%) mostraron desarrollo evidente de color por lo que se los consideró como positivos. Todos los controles positivos dieron desarrollo evidente de color en los pocillos, no variando su color los controles negativos.

El análisis de correlación mostró para los antígenos ATS y ATRS un valor de +0,80 mientras que para los antígenos AT y ATR una correlación de +0,70 con respecto a los valores obtenidos por MAT.

DISCUSIÓN.

La elección de un antígeno para su uso en técnicas inmunoenzimáticas, es de fundamental importancia ya que es el eslabón inicial para la especificidad y sensibilidad de la técnica. El uso de distintos antígenos ha sido probado por diferentes autores con resultados diversos, evidenciando la mayoría de ellos un buen nivel de correlación para la detección de la enfermedad en casos clínicos.

L. interrogans sv. *icterohaemorrhagiae* preparada como antígeno total (AT) ha probado en estudios realizados en humanos, ser útil para el diagnóstico de la leptospirosis producidas por otras especies y serovares de *Leptospiras* (13). Los resultados de nuestro estudio muestran que de 29 sueros analizados, 10 (34%) dieron resultados

positivos. La correlación con la técnica de MAT fue de +0,70 con los Ag AT y ATR, y +0,80 con ATS y ATRS, que puede explicarse por la utilización de un solo Ag en la prueba de MAT, dado que el ELISA podría detectar infección de otras especies o serovares de *Leptospiras* (13).

Si bien la lectura espectrofotométrica podría ayudar a definir con mayor exactitud aquellos sueros con tenue reacción (10), escaparía a la posibilidad pretendida del ELISA para uso en laboratorios de baja complejidad por lo que se decidió la evaluación del desarrollo del color sólo a ojo desnudo.

Es de destacar que un suero que fue analizado como primera y segunda muestra de un mismo animal, fue positivo por ELISA en ambas, mientras que sólo lo fue en la segunda muestra por MAT, esto permitiría un diagnóstico temprano y así instaurar un tratamiento precoz. Esta técnica de rápida realización (5 horas) podría ser adaptada a prácticamente cualquier laboratorio y permitiría su uso como método de diagnóstico tamiz de Leptospirosis en caninos. La evaluación de IgG por medio del ELISA podría estar determinando exclusivamente animales que no estén en la etapa aguda de la enfermedad (14,15) por lo que nuevos ensayos utilizando los mismos antígenos deberían ser realizados evaluando otras inmunoglobulinas (16).

Los datos obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que los Ag sonicados presentan mejor correlación con la prueba de MAT que los no sonicados. El uso de Ag sonificado con tratamiento térmico no parece brindar mejores resultados que el Ag sonificado sólo; presumiblemente la disrupción de las leptospiras y la exposición por ende de Ag más profundos sería más importante que la exposición de Ag termoresistentes. Por otro lado podría inferirse que el Ag termoresistente podría ser semejante a los Ag profundos expuestos mediante el método de sonicación. Otros estudios han empleado la sonicación como método de preparación del antígeno pero ninguno de ellos ha empleado el antígeno ATR como base de la sonicación

ELISA en leptospirosis canina.

(17-19).

La técnica de ELISA permitiría poner en evidencia además aquellos sueros que presenten fenómeno de zona por la prueba de MAT (20, 21). Nuevos estudios con mayor número de muestras y con animales con leptospirosis corroborado mediante aislamientos deberán realizarse para establecer el grado de reproducibilidad y confiabilidad de los distintos antígenos utilizados en esta técnica.

REFERENCIAS.

- 1.-Baranton G. Control and prevention of Leptospirosis. Leptospirosis on the African Continent. Proceedings of the CEC/STD3 Research Meeting, Harare, Zimbabwe, The Netherlands: W. Terpstra; 1992. p. 17-20.
- 2.-Boerrigher G. Direct measurement of *in vitro* antibody production using and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1983; 61:377-84.
- 3.-Tersptra W, Collares-Pereira M. ELISA for the diagnosis of Leptospirosis. Leptospirosis on the African Continent. Proceedings of the CEC/STD3 Research Meeting, Harare, Zimbabwe, The Netherlands: W.Terpstra; 1992. p. 17-20.
- 4.Terpstra W, Ligthart GS, Schone GJ. Serodiagnosis of human Leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA). *Zbl Bakt I Abt Orig* 1980; A247:400-5
- 5.Banfi E, Cinco M, Delia S, Castagnari L, Vuollo V, Mastorianni CM, et al. New trends in the rapid serodiagnosis of Leptospirosis. *Zbl Bakt Mikrobiol Hyg I Abt Orig* 1984; A257:503-7.
- 6.Chapman AJ, Adler B, Faine S. Antigen recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J Med Microbiol* 1988; 25:269-78.
- 7.Chapman AJ, Adler B, Faine S. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent *hardjo/pomona* leptospiral vaccine. *FEMS Microbiol Immunol* 1990; 64:111-8.
- 8.Adler B, Murphy AM, Lacardi SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1980; 11:452-7.
- 9.-Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. Geneva: WHO; 1982. p. 171. Publication n° 67.
- 10.-Kurstak E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, control designs, and interpretation. *Bull WHO* 1985; 63:793-811.
- 11.- Ritaco V. Algunas sugerencias de interés práctico en ELISA. Uppsala: FAO/IAEA; 1987. p. 5.
- 12.-Kish L, Wiley J. EPI 6.0 Epidemiological Software. OMS. 1995.
- 13.-Zochowski WJ, Waitkins SA, Palmer MF. The use of ELISA in the diagnosis of human leptospirosis. *Isr J Vet Med* 1987; 43:330-9.
- 14.-Costa E. Estado inmunológico en Leptospirosis. *Rev Inst A Lutz* 1981; 41,2:93-100.
- 15.-Milner A. Enzyme linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infection caused by *Leptospira interrogans sv hardjo*. *J Clin Microbiol* 1985; 22:539-42.
- 16.-Watt G. The rapid diagnosis of Leptospirosis: a prospective comparison of the dog EIA, on the genus specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J Infec Dis* 1988; 157:840-2.
- 17.-Ellis W. Animal Leptospirosis. Constraints in diagnosis and research. Leptospirosis on the African Continent. Proceedings of the CEC/STD3 Research Meeting, Harare, Zimbabwe. The Netherlands: W. Terpstra; 1993. p. 17-20.
- 18.-Cousins D. Use of EIA in a serological survey of Leptospirosis in sheep. *Aust Vet J* 1986; 63:36-9.
- 19.-Gussenhoven G, Van Der Hoorn M, Goris M, Terps-tra W, Hartskeerl R, Mol B, et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1997; 35:92-7.
- 20.-Stanchi N, Pennimpepe E, Gómez C. Serología de la Leptospirosis experimental en cobayos (*Cavia porcellus*). Fenómeno de zona. *Acta Bioq Clin Latin* 1991; 25:29-31.
- 21.-Takimoto T. Affinity constant of antileptospiral monoclonal antibody, numbers of antigenic determinants on leptospira, and their influence on the microscopic agglutination test and ELISA. *Microbiol Immunobiol* 1988; 32:775-84.