

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IgY anti-rLigBNI DE *Leptospira interrogans*

JÉSSICA WALDMAN¹;AMILTON CLAIR SEIXAS NETO²; GILMAR BATISTA MACHADO³; TANISE PACHECO FORTES⁴; CAROLINE DEWES⁵; EVERTON FAGONDE DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas- jessica.waldman@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- amiltonseixas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- gilmar.machado84@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- tanisefortes@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas- caroldewesvet@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas- fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, a qual é causada por sorovares patogênicos do gênero *Leptospira* (PICARDEAU et al., 2014). A enfermidade ocorre tanto em áreas urbanas como rurais de países com clima tropical, onde a prevalência é elevada (KO et al., 2009). Atualmente, os testes disponíveis para o diagnóstico da leptospirose humana e animal apresentam uma capacidade limitada para detectar os casos durante a fase aguda da infecção (HARTSKEERL et al., 2011).

O teste de soroaglutinação microscópida (MAT), reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose. Porém, o teste apresenta algumas importantes limitações como o requerimento de uma bateria de antígenos vivos em cultura, a necessidade de amostras pareadas de soro, além da subjetividade da interpretação dos resultados (OMS, 2013). Dessa forma, surge o desenvolvimento de novos testes diagnósticos que apresentem boa sensibilidade na fase aguda da doença, que sejam rápidos e de execução simples.

Nos últimos anos, houve a identificação de um grupo de proteínas antigênicas, as quais são reconhecidas durante as fases aguda e convalescente da leptospirose. Este grupo foi denominado de Lig (*Leptospiral Immunoglobulin – Like*) (MATSUNAGA, 2003), onde a proteína LigB foi identificada como uma molécula de adesão envolvida na patogenicidade da doença, e por conseguinte, revelando-se com um grande potencial para o desenvolvimento de testes diagnósticos e de vacinas recombinantes contra leptospirose (FIGUEIRA, 2011).

A imunoglobulina Y (IgY) é o principal anticorpo encontrado em gema de ovos de galinhas (*Gallus domesticus*) (GUIMARÃES, 2005). A produção de IgY possui um método rápido para a sua obtenção, não interferindo no bem-estar do animal. VASCONCELLOS et al. (2010) desenvolveram anticorpos policlonais IgY contra *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, aplicados em diferentes formatos de ELISA, os quais foram capazes de detectar pequenas concentrações desta bactéria em soros experimentalmente contaminados.

O objetivo deste estudo foi produzir IgY contra a proteína recombinante LigBNI (rLigBNI), visando o posterior desenvolvimento de um teste diagnóstico para a leptospirose humana e animal.

2. METODOLOGIA

2.1 Imunizações: Uma galinha poedeira da raça Leghorn, de 29 semanas de idade, foi selecionada e alocada no aviário do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG). Quatro imunizações, com intervalo de 15 dias cada, através da via intramuscular, foram realizadas. Cada dose possuía 100 µg de rLigBNI, emulsificadas em adjuvante oleoso. Amostras de 3 a 5 mL do sangue da ave foram coletadas nos dias 0, 15, 30 e 45, através da punção da veia ulnar. Anteriormente a cada uma das imunizações, a produção de anticorpos de interesse foi verificada por ELISA indireto.

2.2 Obtenção dos anticorpos IgY: A extração da IgY total da gema foi realizada utilizando precipitação por polietilenoglicol (PEG 6000) (SCHADE et al., 2005). As gemas foram separadas por semanas, homogeneizada em PBS 1x e centrifugadas por 20 min a 4 °C para precipitação, utilizando concentrações crescentes de PEG. O extrato foi dialisado e a concentração de IgY foi mensurada através de quantificação por espectrofotometria a 280nm.

2.3 ELISA indireto: No ELISA foram utilizados como anticorpo primário a IgY na diluição de 1:800 e como secundário o conjugado anti-IgY de galinha e peroxidase diluído (1:2000) em PBS.

2.4 SDS-PAGE para avaliação da purificação das IgY total: Treze amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos em tampão de amostra (SDS 5%). Para a corrida, 20 µL de cada amostra, com exceção do marcador (5 µL), foram aplicados em um gel de poliacrilamida 12% e separados eletroforeticamente.

2.5 SDS-PAGE e Western Blotting: Cinco amostras foram separadas eletrofereticamente, de acordo com o processo citado acima. As amostras do gel foram então, eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% e PBS e incubada a 4 °C overnight. Realizou-se a lavagem da membrana com PBS-Tween 20 por 3 vezes e se fez a adição do anticorpo primário, na proporção 1:50, sendo a membrana incubada por 1 h, a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada com PBS-T por 3 vezes e o processo repetido com anticorpo secundário anti-chicken conjugado na diluição 1:4000, e a revelação com diaminobenzidine (DAB).

2.6 Aspectos Éticos: Este trabalho faz parte de um projeto cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 50502153 e analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA 5237) da UFPel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ELISA com o sangue coletado previamente às imunizações demonstrou que houve produção de anticorpos contra a proteína recombinante logo após a primeira dose. Uma vez que os anticorpos estão presentes no sangue do animal, são transferidos para a gema do ovo, de onde podem ser extraídos e purificados.

A purificação da IgY total da gema dos ovos coletados foi confirmada por gel SDS-PAGE na diluição 1:100, apresentando as bandas esperadas para a IgY (Figura 1).

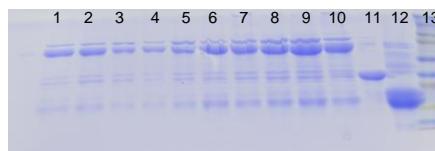


Figura 1: SDS-PAGE da purificação da IgY total da gemas dos ovos: 1. IgY Semana 10 (S10), 2. S9, 3. S8, 4. S7, 5. S6, 6. S5, 7. S4, 8. S3, 9. S2, 10. S1, 11. rLigB, 12. IgY anti-LigA, 13. Marcador pré-corado (Protein Ladder).

A IgY obtida da semana 3, foi escolhida para utilização no *Western Blotting* e foi visualizada em gel de SDS-PAGE, juntamente com a proteína rLigBNI, apresentando tamanho esperado de 60 KDa (Figura 2).

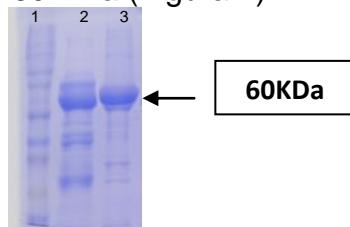


Figura 2: SDS-PAGE para visualização da IgY S3 e da proteína LigBNI: 1. Marcador pré-corado (Protein Ladder), 2. IgY s3, 3. rLigBNI.

O WB realizado com o antígeno rLigBNI demonstrou que esses anticorpos reconhecem fortemente a proteína nativa no tamanho esperado de 60 kDa (Figura 3).

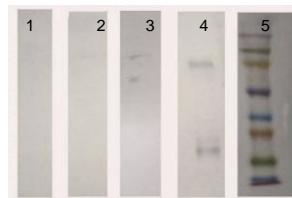


Figura 3: *Western Blotting* utilizando antígeno rLigBNI: 1. LIC 11207, 2. Antígeno bruto da cepa L1-130, 3. rLigBNI, 4. IgY S3 1:100, 5. Marcador pré-corado (Protein Ladder)

Recentemente, o uso de galinhas tem sido uma alternativa a produção de anticorpos policlonais (SHADE, 2005). A imunoglobulina Y é o principal anticorpo produzido por aves e se mostra equivalente a IgG de mamíferos, tanto na estrutura quanto na transferência para a gema que se assemelha a transferência placentar ou colostral (GUIMARÃES, 2005). As IgYs não reagem com IgG ou IgM e nem com componentes do sistema complemento de mamíferos.

A IgY já tem sido amplamente utilizada como imunoterapia em animais e humanos (KOVACS-NOLAN, 2012), bem como em imunohistoquímica detectando vírus, bactérias e parasitos. Por fim, a produção de IgY contra leptospires inteiras bem como contra proteínas recombinantes constitui-se em uma alternativa ética, de baixo custo e com uma boa quantidade de anticorpos obtidos, quando comparada a produção de anticorpos em mamíferos.

4. CONCLUSÕES

A IgY anti-rLigBNI obtida reconhece a proteína LigB nativa em leptospires virulentas. O próximo passo será a conjugação dos anticorpos com fluoresceína e peroxidase para a sua utilização em formatos de testes que façam a detecção de leptospires em amostras clínicas de humanos e animais suspeitos de leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FIGUEIRA, C. P. **Caracterização de Mutantes de *Leptospira* spp. na Identificação de Fatores de Virulência.** 2011. Tese (Doutorado em Patologia) – Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal da Bahia.

GUIMARÃES, M. C. C. **Produção e aplicação de anticorpos da gema do ovo de galinha.** 2005. Tese (Doutorado em Produção Animal com ênfase em imunogenética) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

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.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature**, v. 459, n. 7367, p. 736-747, 2009.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v.3, p.163-182, 2012.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; KO, A.L. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929–945, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Métodos laboratoriais para diagnóstico de leptospirose.** Ministério da Saúde, Brasília, 26 mar. 2013. Acessado em 01 de julho de 2015. Online. Disponível em: <http://saude.to.gov.br/index.php/publicacoesdownloads/category/104leptospirose%3Fdownload%3D1011:metodos-laboratoriais-paradiagnosticos&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOLOUDIS, A.N.; DURSKI, K.; HARTSKEERL, R.A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic, Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 1–8, 2014.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative to Laboratory Animals**, v.33, n. 2, p.129–154, 2005.

VASCONCELLOS, F.A.; COUTINHO, M.L.; SILVA, E.F.; FERNANDES, C.P.; MONTE, L.G.; SEYFFERT, N.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, n. 4, p. 259-264, 2010.