

SELEÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA TESTE DE DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE CANINA

MAURÍCIO TAVARES TAMBORINDEGUY¹; CAROLINE AMURIM DA SILVA GONÇALVES²; JÚLIA COUGO²; KARLA SEQUEIRA MENDONÇA²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – mauriotamborindeguy@gmail.com

²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – carolamurim@gmail.com; juliapetrarca@gmail.com; karlasmend@gmail.com

³Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia CDTec, UFPel – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Espiroquetas patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira* são as agentes causadoras da leptospirose, considerada a zoonose com maior distribuição global (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). A leptospirose tem incidência média de 873.000 casos graves e cerca de 49.000 mortes por ano (PICARDEAU et al., 2014). O maior impacto da doença ocorre em populações pobres de países em desenvolvimento e regiões tropicais, onde instalações sanitárias inadequadas e enchentes constantes favorecem a transmissão da doença (MCBRIDE et al., 2005). A leptospirose humana geralmente é contraída diretamente através do contato com animais reservatórios, ou indiretamente, através do contato com água ou solo contaminado com a urina desses animais (FAINE, 1999). Os cães são considerados a segunda principal fonte de infecção para o homem, já que vivem em estreito contato com humanos, se tornando assim, importantes reservatórios (BROD et al., 2005).

A ausência de um diagnóstico laboratorial adequado é o principal obstáculo na implementação de medidas de saúde pública apropriadas para leptospirose humana e animal. (MCBRIDE et al., 2005). O diagnóstico precoce se torna prioridade por permitir tratamento eficaz e medidas de controle mais efetivas (ADLER, 2010). O teste de referência para diagnóstico da leptospirose é o teste de microaglutinação (MAT), embora seja um teste complexo de controlar, executar e interpretar (LEVETT, 2001). Portanto, há uma necessidade urgente no desenvolvimento de um teste de diagnóstico para a leptospirose canina, que identifique animais positivos durante a fase inicial da doença e que forneça resultados rápidos (HARTSKEERL et al., 2011).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar antígenos recombinantes de *L. interrogans* a partir da técnica de *dot blot*, visando futuramente o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para leptospirose canina.

2. METODOLOGIA

2.1. *Banco de soros caninos*: Uma colaboração entre a Fiocruz-BA e o Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Salvador, permitiu a obtenção de um banco de soros caninos caracterizados por MAT e ELISA de antígeno bruto. O banco é composto por soros de animais pertencentes a uma área endêmica para leptospirose e engloba tanto animais vacinados quanto não vacinados.

2.2. *Expressão e purificação de proteínas recombinantes*: As proteínas

recombinantes utilizadas neste trabalho foram produzidas previamente conforme descrito e indicado na Tabela 1.

2.3. Protocolo para execução dos dot blots: A concentração desejada de antígeno foi aplicada em membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, GE Healthcare) respeitando um volume entre 2 e 3,5µl. O controle positivo das reações foram células de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* (10^9 células por ponto), lisadas por aquecimento a 100°C por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 50% (PBS-T) com 5% de leite em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente sob agitação. Entre cada uma das etapas as membranas foram lavadas quatro vezes com PBS-T. Após, as membranas foram incubadas com os *pools* de soros diluídos em PBS-T com 1% de leite em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, incubadas com o anticorpo anti-canino, podendo este ser anti-IgG canino conjugado com fosfatase alcalina (Rockland) (anti-IgG:AP) ou anti-IgM conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch) (anti-IgM:HRP), diluídos para a concentração desejada em PBS-T com 1% de leite em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. A revelação foi realizada utilizando o kit *AP Conjugate Substrate* (Bio-Rad) para as membranas incubadas com anticorpo secundário anti-IgG e diaminobenzidina (DAB) e H_2O_2 para as membranas incubadas com anticorpo secundário anti-IgM. Nove proteínas recombinantes foram analisadas testando anti-IgG e anti-IgM canino, usando três concentrações de cada antígeno (300, 500 e 1000ng por ponto de antígeno) e duas diluições (1:200 e 1:500) dos *pools* de dez soros caninos positivos e dez soros negativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção inicial das proteínas recombinantes: Foram selecionadas nove proteínas recombinantes, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Antígenos recombinantes selecionados para as análises.

Nome dos antígenos	Fonte (sorovar)	Massa molecular (kDa)*	Referência
rLigBrep	Copenhageni ¹	54	Silva et al., 2007
rLigBct1	Canicola ²	45	Schuch et al., 2011
rLigANI	Canicola ²	64	Schuch et al., 2011
rLipL32	Copenhageni ¹	29	Grassmann et al., 2012a
rFlaA1	Copenhageni ¹	34	Grassmann et al., 2012b
rFlaB1	Copenhageni ¹	32	Grassmann et al., 2012b
rLigANI	Copenhageni ¹	63	Silva et al., 2007
rOmp37	Copenhageni ¹	37	Oliveira et al., 2012
rLemA	Copenhageni ¹	17	Hartwig et al., 2011

¹ *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130

² *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Honda Utrecht

*Sem cauda de 6xhis

3.2. Desenvolvimento do dot blot: A maior parte dos antígenos testados apresentaram reações fracas e inespecíficas, sem distinção entre o *pool* de soros positivos e negativos (Figura 1). Porém, com as proteínas rLigBrep e rLipL32, foi possível distinguir em algum grau as respostas para *pool* de soros positivos daquelas para *pool* de soros negativos, sendo estes os resultados mais promissores.

Croda e colaboradores (2007), demonstraram a utilidade diagnóstica do fragmento LigBrep, composto pela região idêntica entre LigA e LigB. A utilidade da proteína rLipL32 também já foi reportada em outros ensaios sorológicos, para a detecção de leptospirose (BOMFIM et al., 2005; CHALAYON et al., 2011). No formato *dot blot*, foi possível diferenciar adequadamente os *pools* com anti-IgG:AP para rLipL32 e com anti-IgM:HRP para rLigBrep. Em vista dos resultados obtidos neste trabalho, bem como dos relatos da literatura, as proteínas rLigBrep e rLipL32 parecem promissoras para o diagnóstico de leptospirose canina.

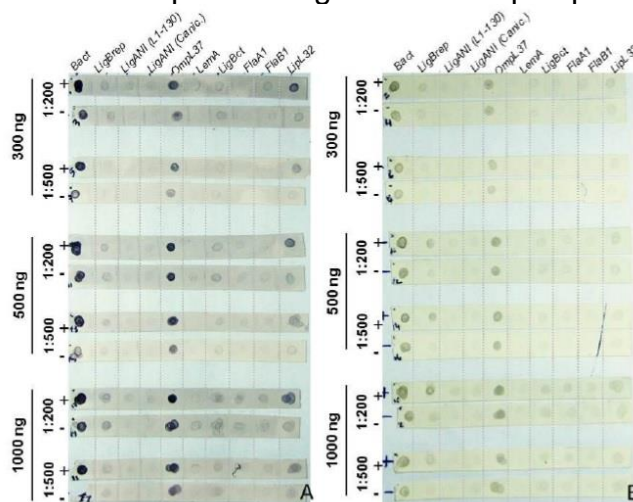


Figura 1. *Dot blot* tipo *checkerboard* para 9 diferentes antígenos recombinantes. **A:** anti-IgG:AP 1:1000. **B:** Conjugado anti-IgM:HRP 1:5000.

4. CONCLUSÕES

Os antígenos rLigBrep e rLipL32 tiveram o melhor desempenho quando foram analisados com soros caninos individuais positivos e negativos para leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p. 287-96. 2010.
- BOMFIM, M. R.; KO, A. e KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.109, n.1-2, p. 89-94. 2005.
- 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.
- CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P. e KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.105, n.5, p. 289-97. 2011.
- CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like

proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.5, p. 1528-34. 2007.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C. e PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: MediSci. 1999

GRASSMANN AA, FÉLIX SR, DOS SANTOS CX, AMARAL MG, et al. Protection against Lethal Leptospirosis after Vaccination with LipL32 Coupled or Coadministered with the B Subunit of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin. **Clin Vaccine Immunol**.19:740-5, 2012a.

GRASSMANN, AA; VALIATI, F; OLIVEIRA, TL, DOS SANTOS, CX; DELLAGOSTIN, AO; MCBRIDE, AJA. Recombinant leptospiral flagellins towards developing new leptospirosis diagnostic tests. Em: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria 1:196, 2012b.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M. e ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.4, p. 494-501. 2011.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p. 296-326. 2001.

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.

OLIVEIRA, TL; PEREIRA, MB; GRASSMANN, AA; VALIATI, FE; HARTWIG, DD; DELLAGOSTIN, AO. Production of the recombinant protein OmpL37 of *Leptospira interrogans* for use as a subunit vaccine against Leptospirosis. . Em: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria 1:197, 2012.

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

SCHUCH, R; BACELO, KL; HARTWIG, DD; FORSTER, KM; DELLAGOSTIN, AO. Clonagem, Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes da Superfície da Membrana de *Leptospira* em *Escherichia Coli*. Em: XX Congresso de Iniciação Científica, UFPel, 2011. Disponível em: <http://ufpel.edu.br/cic/2011/anais/cb.htm>. Acessado em: julho, 2015.

SILVA EF, MEDEIROS MA, MCBRIDE AJ, MATSUNAGA J, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethalinfection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**. v.25, n.33, p. 6277-86. 2007.