

PADRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) UTILIZANDO ANTICORPOS IgM E IgG PARA O DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE HUMANA

**CAROLINE AMURIM DA SILVA GONÇALVES¹; MAURÍCIO TAMBORINDEGUY²;
JÚLIA COUGO², NEIDA CONRAD², KARLA SEQUEIRA MENDONÇA², ALAN
JOHN ALEXANDER MCBRIDE³**

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – carolamurim@gmail.com

²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - mauriciotamborindeguy@gmail.com; juliapetrarca@gmail.com; neidaconrad@yahoo.com.br; karlasmend@yahoo.com.br

³Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada e com distribuição mundial, causada por espiroquetas patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*, capaz de acometer homens e animais (ESTEVES et al., 2014). Existem fatores que aumentam a incidência da leptospirose, como climas tropicais, águas estagnadas, baixos níveis de saneamento e a alta proximidade de animais reservatórios com a população humana (GUERRA, 2013). Isto resulta em uma estimativa de ocorrência de aproximadamente 873.000 casos de leptospirose por ano no mundo, gerando índices de letalidade superiores a 5% (PICARDEAU et al., 2014).

A infecção em humanos pode ocorrer durante a exposição direta com animais infectados, ou indiretamente em contato com ambientes contaminados pela urina de animais acometidos pela doença (CRODA et al., 2007). Existem dois métodos principais para a detecção da doença, sendo elas o teste de diagnóstico padrão-ouro para leptospirose, o Teste de Microaglutinação (MAT) e a cultura da bactéria (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Todavia, ambas técnicas apresentam limitações, e a carência de um diagnóstico laboratorial rápido, barato e eficaz, faz com que em muitos casos essa doença seja diagnosticada incorretamente (MCBRIDE et al., 2005).

Uma alternativa de um teste de diagnóstico rápido, é a utilização de proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*), como o polipeptídeo LigBrep, por estarem presentes na membrana externa da bactéria e consequentemente, serem reconhecidas por soros de pacientes com a doença (CRODA et al., 2007). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo padronizar o teste de ELISA indireto, utilizando a proteína rLigBrep como antígeno, para o desenvolvimento de um teste diagnóstico mais eficaz para a leptospirose humana.

2. METODOLOGIA

Soros:

As amostras de soro humano tiveram origens de pacientes suspeitos de estarem com a doença, na cidade de Salvador – Bahia, as quais foram gentilmente cedidas pela FIOCRUZ e também, amostras decorrentes do projeto de vigilância realizado na cidade de Pelotas – Rio Grande do Sul. Todas as amostras foram previamente submetidas à técnica-padrão ouro de diagnóstico da doença, o MAT, caracterizando-as como positivas ou negativas para a doença.

Preparação da rLigBrep:

A proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) foi clonada e expressada segundo o protocolo descrito por Conrad et al (2013).

Padronização do ELISA:

Para avaliar a melhor concentração do antígeno na sensibilização da placa de ELISA, placas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas *overnight*, com 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng/poço da rLigBrep (anticorpo anti-humano IgM) e 50 ng e 100 ng/poço da rLigBrep (anticorpo anti-humano IgG), todas diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (pH=9,6). Ensaios foram realizados para determinar as diferentes diluições dos soros para o anticorpo testado. Assim, os soros foram diluídos a 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 para a proteína rLigBrep, e incubados durante 1h a 37°C. Em seguida, foram adicionadas as diferentes concentrações do anticorpo anti-humano IgG conjugado com peroxidase, diluídos em 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:6000, seguido de incubação a 37°C durante 1h. As reações foram reveladas com o substrato o-fenilenodiammina (OPD), adicionado de peróxido de hidrogênio, e a placa armazenada no escuro por 15 minutos. A absorbância foi avaliada a 450nm usando um leitor de placas de ELISA. Entre as diferentes etapas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (PBS 0,05% de Tween 20).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase de incubação para o aparecimento de sintomas da leptospirose demora em média de 7 a 12 dias. Sendo assim, anticorpos IgM tornam-se detectáveis durante a primeira semana da doença, permitindo o diagnóstico correto e o tratamento ser iniciado. A maioria dos casos de leptospirose são diagnosticados por sorologia, porque a capacidade de detecção por outras técnicas, como a de cultura e a de PCR é limitada (HAAKE & LEVETT, 2015). No entanto, a especificidade de detecção de IgM por ELISA seja afetada pelo antígeno utilizado no ensaio, este permite que seja possível o diagnóstico precoce da doença (BAJANI et al., 2003).

Os anticorpos IgG, começam a atingir altas quantidades no sangue, de 3-4 semanas após a infecção pela bactéria. Sendo assim, a avaliação da presença do anticorpo IgG, é necessária para o diagnóstico tardio da doença, pois este está relacionado a infecção crônica da doença (CHALAYON et al., 2011).

Tendo como finalidade, o desenvolvimento de um teste de diagnóstico para ambos os anticorpos citados, foram avaliadas diferentes concentrações de antígeno, anticorpo primário e secundário, para a padronização dos testes. Com isso, pode-se analisar as concentrações avaliadas para o anticorpo anti-humano IgM (Figura 1) e para o anticorpo anti-humano IgG (Figura 2).

Para o anticorpo anti-humano IgM, observou-se que entre as diferentes quantidades de antígeno utilizadas nos diferentes testes, os valores de absorbâncias (DO_{450}) foram mais relevantes nas diluições de 1:100 dos soros e 1:2000 do anticorpo secundário, tendo valores variando entre 0,098 – 0,100; 0,083 – 0,094; 0,115 – 0,109 e 0,109 – 0,09, para as quantidades de 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng de rLigBrep, respectivamente, Figura 1.

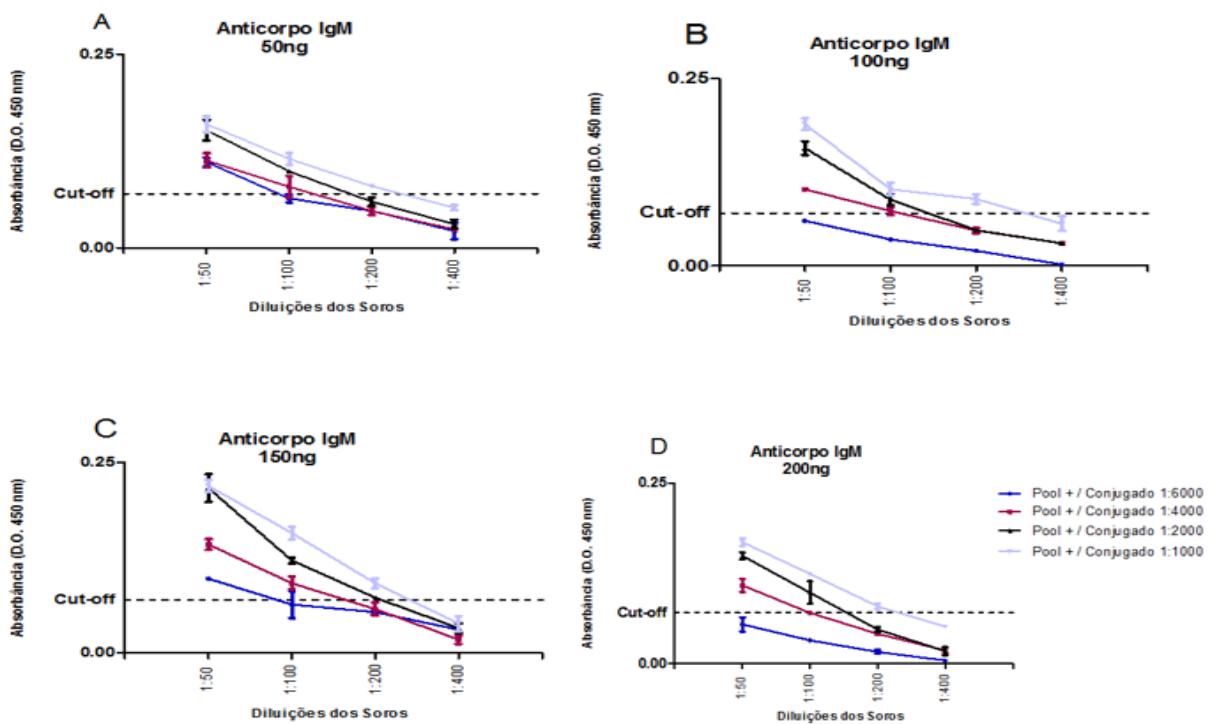


Figura 1: Avaliação do anticorpo anti-humano IgM nas quantidades de 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng do antígeno recombinante LigBrep. Utilizando as diluições de conjugado 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:6000 e diluições dos soros 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

Em relação ao anticorpo anti-humano IgG, os valores de absorbâncias (DO₄₅₀) mais satisfatórios obtidos com a quantidade de 50 ng de rLigBrep variaram entre 0,53-0,78. Sendo esses valores relacionados a diluição de soro 1:100 e diluição do anticorpo secundário 1:1000. Porém, para a quantidade de 100 ng de antígeno recombinante, as absorbâncias mais desejáveis estavam relacionadas a diluição de soro 1:100 e 1:200 e diluição do anticorpo secundário 1:1000 e 1:2000.

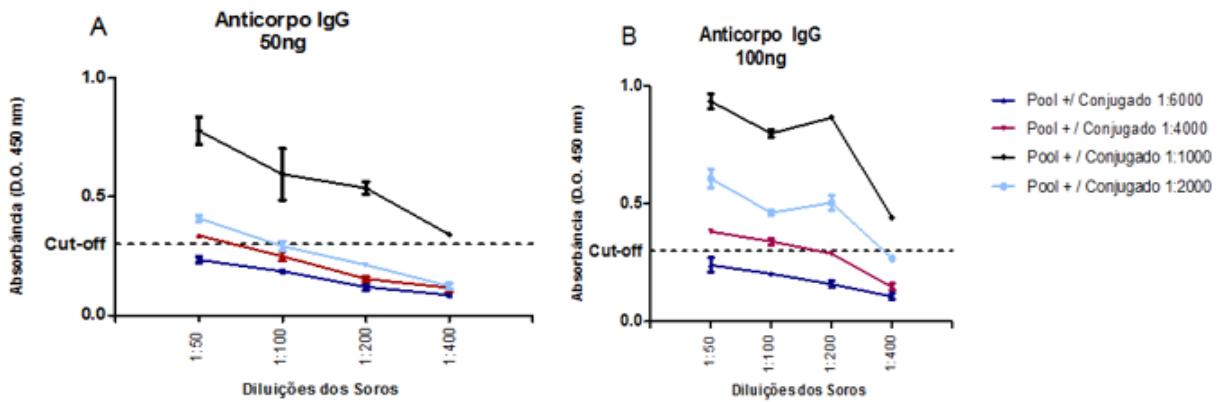


Figura 2: Avaliação do anticorpo anti-humano IgG nas quantidades de 50 ng e 100 ng do antígeno recombinante LigBrep. Utilizando as diluições de conjugado 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:6000 e diluições dos soros 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados alcançados nos diferentes testes de ELISA para os anticorpos anti-humano IgM e IgG, utilizando a proteína rLigBrep, constata-se a necessidade da realização de testes adicionais confirmatórios dos resultados obtidos no presente estudo, para que então, seja possível a detecção mais precisa da leptospirose humana, através de ensaios imunoenzimáticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJANI, M.D, ASHFORD, D.A., BRAGG, S.L., WOODS, C.W., AYE, T., SPIEGEL, R.A., PLIKAYTIS, B.D., PERKINS, B.A., PHELAN, M., LEVETT, P.N., WEYANT, R.S. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol.** 41:803-809.2003.
- BUDIHAL, S. V., & PERWEZ, K. Leptospirosis diagnosis: Competency of various laboratory tests. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 8(1), 199–202. 2014.
- CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.; KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, p.289-297. 2011.
- CONRAD, N; TAMBORINDEGUY, M; GONÇALVES, C; PEREIRA, W; FABRES, M; MCBRIDE, A. J. A. Expressão da proteína rLigBrep na forma solúvel e caracterização com soro humano. **ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO DA UFPel, XV**. Pelotas, 2013. Anais: Expressão da proteína rLigBrep na forma solúvel e caracterização com soro humano. Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PRPPG). 2013.
- CRODA, J.; RAMOS, J. G. R.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospira Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. **Jounal of Clinical Microbiology.**, v.45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.
- ESTEVES, L. M., BULHOES, S. M., BRANCO, C. C., MOTA, F. M., PAIVA, C., CABRAL, R., MOTA-VIEIRA, L. Human leptospirosis: seroreactivity and genetic susceptibility in the population of são miguel island (azores, portugal). **PloS One**, 9(9).2014.
- GUERRA, M. Leptospirosis: public health perspectives. **Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization**, 41(5), 295–7. 2013.
- HAAKE, D.A.; LEVETT, P.N., Leptospirosis in Human. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 387,65-97.2015.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, n. 5, p. 376-86. 2005.
- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULoudis, A. N., DURSKI, K., & HARTSKEERL, R. a.Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 78(1), 1–8.2014.