

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-fenilenodiamnina (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.

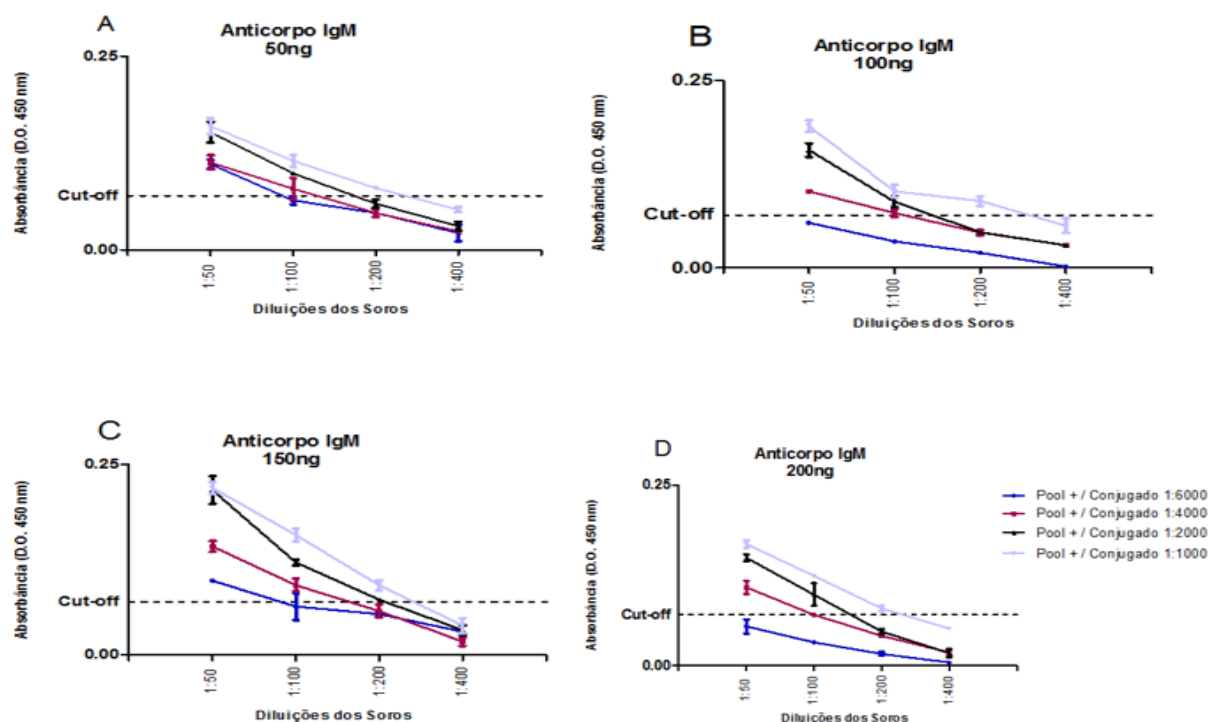


Figura 1: Avaliação do anticorpo anti-humano IgM nas quantidades de 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng do antígeno recombinante LigBrep. Utilizando as diluições de conjugado 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:6000 e diluições dos soros 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

Em relação ao anticorpo anti-humano IgG, os valores de absorbâncias (DO_{450}) 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.

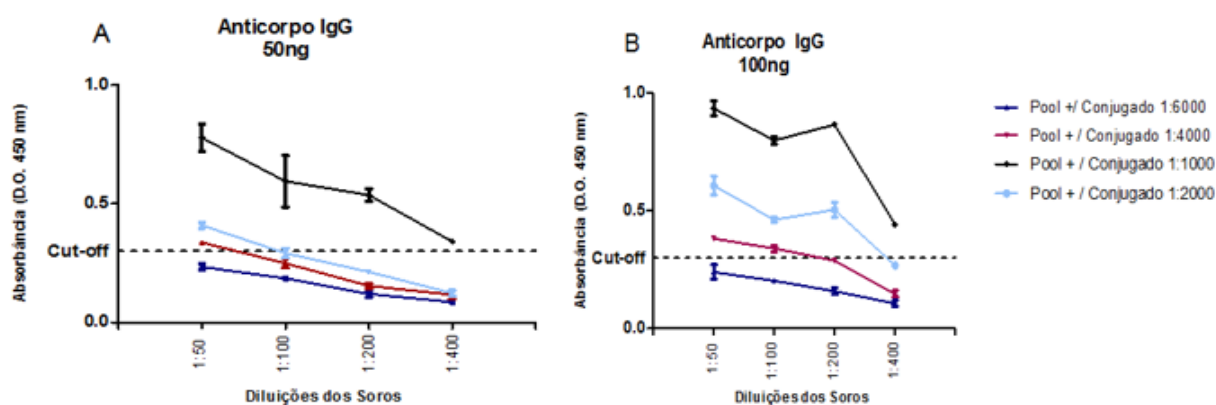


Figura 2: Avaliação do anticorpo anti-humano IgG nas quantidades de 50 ng e 100 ng do antígeno recombinante LigBrep. Utilizando as diluições de conjugado 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:6000 e diluições dos soros 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

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.

BUDIHAN, 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. **Journal 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., SKOULLOUDIS, A. N., DURSKEI, 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.