

IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA NA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ErpY-like DE *Leptospira interrogans*

HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO¹; STELLA BUCHHORN DE FREITAS¹; BÁRBARA
COUTO ROLOFF²; THAÍS FARIAS COLLARES²; LEONARDO GARCIA MONTE²;
DAIANE DRAWANZ HARTWIG^{2,3}.

¹Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel, Pelotas/RS – henrique15@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel, Pelotas/RS

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas/RS -
daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose mundialmente disseminada causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Esta é uma doença endêmica em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em países em desenvolvimento (SILVA et. al., 2016). Os hospedeiros mais frequentes de leptospirosas patogênicas são roedores, que albergam o microrganismo nos rins e, disseminam o patógeno através da urina (MUSSO; LA, 2013). A infecção humana ou animal ocorre a partir de contato direto ou indireto com esta urina, através de água ou solo contaminados.

Os sintomas desta enfermidade são semelhantes aos da gripe, incluindo febre, dor de cabeça, anorexia, dor muscular, dentre outros. Em alguns casos, pode evoluir para a forma mais grave da doença, como a síndrome de *Weil*, com comprometimento renal e hepático, uveíte, hemorragia pulmonar grave e até a morte. Esta doença é considerada um problema de saúde pública, além de causar grandes prejuízos econômicos no setor agrícola (FAINE et. al., 1999; SILVA et. al., 2016).

O teste de aglutinação microscópica (MAT) é a técnica considerada referência para o diagnóstico da leptospirose, a qual consiste em confrontar um painel de sorovares de leptospirosas patogênicas vivas como o soro de pacientes com suspeita da doença, estimando assim, os níveis de anticorpos presentes na amostra (FAINE et. al., 1999; PICARDEAU, 2013). No entanto, a MAT é uma técnica subjetiva, uma vez que apresenta um elevado número de reações cruzadas entre os sorovares e baixa sensibilidade na fase aguda da doença, além de ser de difícil implementação (HARTLEBEN et al., 2013; PICARDEAU, 2013). Devido aos inconvenientes da MAT, técnicas mais sensíveis, como a imunofluorescência indireta (IFI) e outros ensaios imunoquímicos, que fazem uso de antígenos de *Leptospira*, têm sido desenvolvidos como métodos alternativos de diagnósticos para leptospirose (HARTLEBEN et. al., 2013).

A análise da sequência genômica dos isolados de *Leptospira* spp. tem propiciado a identificação de novos alvos candidatos ao desenvolvimento de vacinas ou de testes para diagnóstico. Assim, a lipoproteína ErpY-like (LIC11966) foi reportada como sendo uma proteína de *L. interrogans*, que possui sequência muito parecida a fatores de virulência encontrados em outros patógenos, além disso, foi evidenciado a expressão desta durante a infecção *in vivo* (ESHGHI et al., 2009). Essas descobertas demonstram um importante papel desta proteína durante a infecção bacteriana, assim, se tornando um futuro alvo potencial para ser utilizado em testes de diagnóstico e como antígeno vacinal. Além disto, a produção de anticorpos policlonais (pAbs) contra essa proteína é muito importante

no avanço dos estudos de virulência da bactéria e desenvolvimento de diagnósticos sensíveis e específicos, baseados na detecção de anticorpos gerados contra estes antígenos durante a infecção.

Desta maneira, o objetivo desse trabalho foi a realização da técnica de imunofluorescência indireta para investigação da interação de pAb anti-rErpY-like com a proteína nativa ErpY-like de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130.

2. METODOLOGIA

Para a produção dos pAbs, foram administradas cinco doses de rErpY-like (100 µg/dose) nos dias 0, 14, 21, 28 e 39. As inoculações foram realizadas individualmente em três camundongos Balb/c fêmeas com seis semanas de idade. Para o primeiro inóculo, foi utilizado adjuvante completo de Freund (1:1) e, nos posteriores, adjuvante incompleto de Freund (1:1). Os camundongos foram submetidos a uma dose reforço de proteína e, após a confirmação da soroconversão, o sangue total foi coletado, centrifugado a 3000 rpm por 5 min, e os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare, USA). Então, foi realizada a titulação dos pAbs através de ELISA indireto. Para tal, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng/cavidade de rErpY-like por 16 h a 4 °C em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,8. As placas foram bloqueadas com soro fetal bovino (SFB) 1%, e adicionadas de 11 diluições (1:100 – 1:102.400) dos pAbs. A seguir, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase. Como controle negativo foi utilizado soro normal de camundongo e como controle positivo, soro policlonal anti-*L. interrogans* sorovar Canicola cepa CCZ463 produzido em coelho (BROD et al., 2005). Entre todas as etapas as placas foram incubadas a 37 °C por 1 h, e posteriormente, foram realizadas três lavagens com *phosphate buffered saline* (PBS) contendo 0,05% de *tween* 20 (PBS-T). As reações foram reveladas com solução substrato/cromógena contendo *o-phenylenediamine* (0,4 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 15 min. As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 450 nm usando VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA).

Para a imunofluorescência indireta, lâminas de vidro (ICN Biomedicals Inc., USA) foram revestidas com uma solução de poly-L-lisina 0,1%, por 1 h a 37° C, utilizada para promover maior aderência. Alíquotas de 10 µl contendo 10⁸ células.mL⁻¹ de leptospiros, crescidas em meio EMJH (Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris) por 7 dias a 28 °C, foram adicionadas as lâminas e incubadas a 37 °C. Após, foi realizado bloqueio com soro fetal bovino (SFB) 10%, para que não houvessem reações inespecíficas e, em seguida, foi adicionado o pAb anti-rErpY-like por 1 h a 37 °C, na diluição 1:100 em PBS 1X. Então, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com *fluorescein isothiocyanate* (FITC) (Invitrogen, EUA), na diluição 1:100 e incubando em câmara úmida e escura, por 1 h a 37 °C. Por fim, adicionou-se uma gota de meio de montagem (glicerol 90%) e foi realizada visualização em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51) com comprimento de onda de excitação de 450 nm. Entre todas as etapas foram realizadas duas lavagens com PBS-T, para que todo material que não se ligou fosse retirado. Como controle positivo, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-rLipL32 e, como controle negativo soro normal de camundongo. Para confirmar a presença de leptospiros no campo microscópico foi realizada coloração do DNA com Hoechst 33258.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se reação do pAb anti-rErpY-like, marcando com fluorescência, com a proteína ErpY-like nativa na *Leptospira* (Fig. 1A e 1B), bem como, com o mAb anti-LipL32 utilizado com controle positivo (Fig. 1C e 1D). Não houve reação no controle negativo, apesar da presença de leptospiros na lâmina.

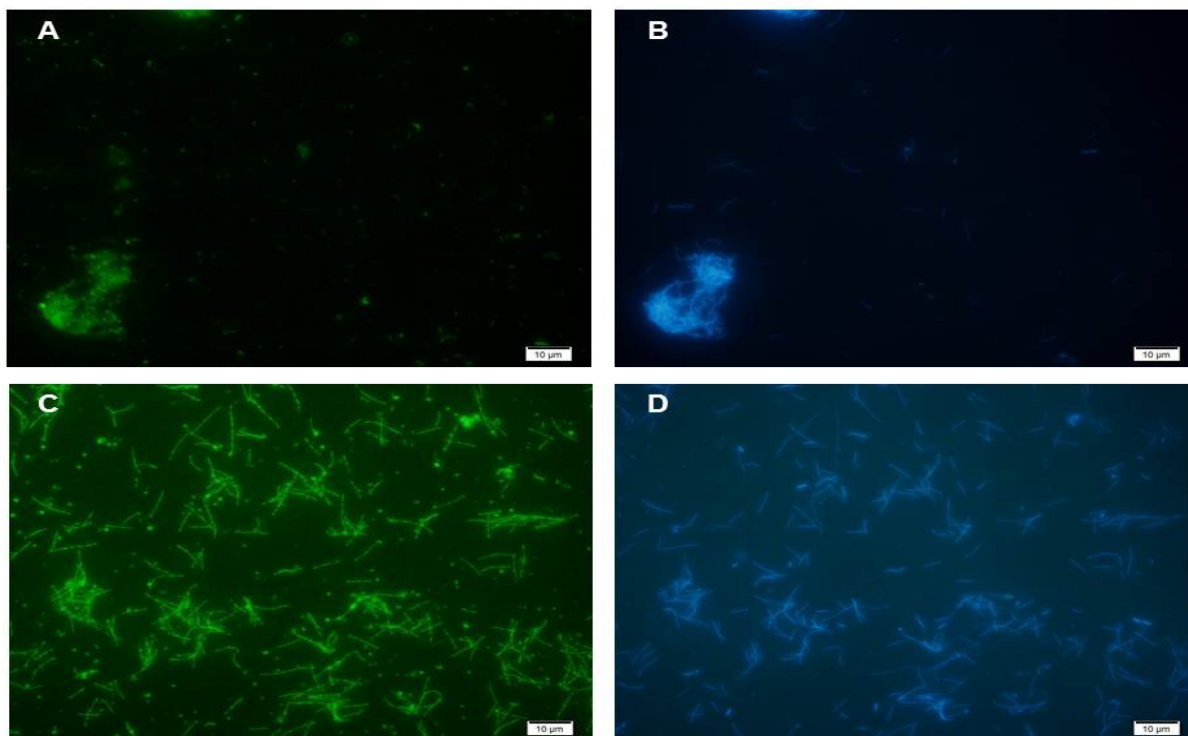


Figura 1: Imunofluorescência indireta utilizando o pAb anti-ErpY-like e *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Painéis A e B: *L. interrogans* com pAb contra a proteína ErpY-like, reação com FITC e Hoechst 33258, respectivamente. Painéis C e D: *L. Interrogans* com mAb contra a proteína rLipL32, reação com FITC e Hoechst 33258, respectivamente. Visualização em microscópio de fluorescência Olympus BX51. Microfotografias com câmera digital Olympus BP72. As barras representam 10 µm.

Esses resultados mostram que apesar dessa proteína ter sido expressa em outro organismo e o pAb ter sido produzido a partir desta proteína recombinante, este foi capaz de reconhecer a proteína nativa presente em *Leptospira*.

4. CONCLUSÕES

Estes resultados mostram que a proteína ErpY-like é um potencial alvo no desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico para leptospirose. No entanto, mais estudos são necessários para uma melhor elucidação da função e potencial imunogênico desta proteína.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESHGHI, A., CULLEN, P. A., COWEN, L., ZUERNER, R. L., & CAMERON, C. E. Global Proteome Analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of Proteome Research**, 8(10), 4564–4578, 2009.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., & PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, Melbourne: MedSci 1999

FERNANDES, L.G., SIQUEIRA, G.H., TEIXEIRA, A.R.F., SILVA, L.P., FIGUEREDO, J.M., COSATE, M.R., VIEIRA, M.L., & NASCIMENTO, A.L. *Leptospira* spp.: Novel insights into host–pathogen interactions. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 1-8, 2015.

HARTLEBEN, C.P; LEAL, F.M; MONTE, L.G; HARTWIG, D.D; SEIXAS, F.K; VASCONCELLOS, S.A; BRIHUEGA, B; DELLAGOSTIN, O.A. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. **Curr. Microbiol.**, 2:106-109, 2013.

HARTWIG, D.D; FORSTER, K.M; OLIVEIRA, T.; AMARAI, M; MCBRIDE, A.J; DELLAGOSTIN, O.A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clin. Vaccine Immunol.**, 5:747-752, 2013.

MUSSO, D. & LA, S.B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **J. microbiol. immunol. infect.**, 46, (4) 245-52, 2013.

PICARDEAU, M..Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Med. Mal. Infect.**, 1,1-9, 2013.

SILVA, L.P; FERNANDES L.G.V; VIEIRA, M.L; SOUZA, G.O; HEINEMANN, M.B; VASCONCELLOS, S.A; ROMERO, E.C; NASCIMENTO, A.L.T.O Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with host components. **Phatogens and Disease**, 2016.