

ANTICORPOS POLICLONAIOS ANTI-ErpY-like E SUA APLICAÇÃO EM ENSAIO DE ELISA INDIRETO

STELLA BUCHHORN DE FREITAS¹; HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO¹; BÁRBARA COUTO ROLOFF²; THAÍS FARIAS COLLARES²; MARTA GONÇALVES AMARAL^{1,2}; DAIANE DRAWANZ HARTWIG^{2,3}.

¹Graduação em Biotecnologia, CDTEc, UFPel, Pelotas/RS – stellafreitas@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 zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, ao qual pertencem 20 espécies e mais de 250 sorovares. As espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* são as mais frequentes em casos de leptospirose humana e animal (ADLER & DE LA PENA, 2010; RAJAPAKSE et al., 2015) e o processo de infecção pode ser atribuído ao contato direto ou indireto com a urina de animais portadores do agente patogênico (FAINE et al., 1999; REIS et al., 2008). Esta doença é considerada um problema de saúde pública, além de causar prejuízos econômicos no setor agrícola (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Atualmente, a soroaglutinação microscópica (MAT) é considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico da leptospirose. Baseando-se em métodos imunológicos, esse teste utiliza cepas de leptospiras vivas para a reação com soros de humanos e animais (OIE, 2014). Contudo, além de apresentar baixa sensibilidade na fase aguda da doença (MCBRIDE et al., 2005; MUSSO & LA, 2013; RAJAPAKSE et al., 2015), esse teste apresenta alto grau de reações cruzadas entre diferentes sorovares (ADLER & DE LA PENA, 2010).

Diante das limitações existentes, novos testes de diagnóstico tem sido desenvolvidos com objetivo de aumentar a sensibilidade e fornecer resultados mais precisos e confiáveis. O teste de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e outros ensaios imunoquímicos utilizando抗ígenos recombinantes de *Leptospira* são exemplos de testes que veem sendo desenvolvidos como métodos alternativos para o diagnóstico da doença (BOMFIM et al., 2005; HARTLEBEN et al., 2013; MARIYA et al., 2006). Além disto, a utilização de anticorpos é uma importante ferramenta, tanto para a caracterização da proteína como para a busca por teste de diagnóstico. Os anticorpos policlonais (pAbs) tem sido uma alternativa mais acessível que os anticorpos monoclonais (mAbs) e também útil para a pesquisa (HARLOW & LANE, 1988).

Análises de sequências genômicas de isolados de *Leptospira* spp. têm sido exploradas com objetivo de conhecer novos alvos com potencial antigênico. Dentre eles, uma série de proteínas, presentes em leptospiras patogênicas, tem sido avaliadas (HARTWIG et al., 2011; HARTWIG et al., 2013), como a lipoproteína ErpY-like, alvo deste estudo. Esta foi reportada como sendo uma proteína de *L. interrogans*, que possui sequência muito similar a fatores de virulência encontrados em outros patógenos, e sua expressão foi demonstrada durante a infecção *in vivo* (ESHGHI et al., 2009). Desta forma, a proteína ErpY-like apresenta-se como uma importante ferramenta no processo de infecção e sugere um grande potencial para aplicação em testes diagnósticos e sua capacidade como antígeno vacinal. Assim, a produção de 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抗ígenos durante a infecção.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi a produção de anticorpos policlonais (pAbs) contra a proteína ErpY-like em sua forma recombinante (rErpY-like) e a caracterização destes pAbs através de ELISA indireto, avaliando seu potencial em reconhecer a proteína nativa presente em *L. interrogans* sorovar Copenhagen cepa Fiocruz L1-130.

2. METODOLOGIA

Para a produção dos pAbs, dois camundongos BALB/c fêmeas, com 6 semanas de idade, foram inoculados com 100 µg/dose de rErpY-like nos dias 0, 14, 21 e 28. Para o primeiro inóculo, foi utilizado adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich, USA) e, nos posteriores, adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich, USA). Em todas as imunizações, a concentração do adjuvante foi de 1:1. Após a última imunização, um ensaio ELISA indireto foi realizado para determinar o título dos anticorpos contra a proteína rErpY-like (pAbs). Os camundongos foram submetidos a uma dose reforço de proteína e, posteriormente, o sangue total foi coletado, centrifugado e os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare, USA).

Com o objetivo de recuperar a virulência das leptospiras, foi realizado um cultivo prévio de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 em 5mL de meio *Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris* (EMJH, Difco-USA) com adição de 10% de suplemento Difco-USA. O cultivo foi incubado a 30 °C por um período de 7 dias, sendo as células posteriormente lavadas com PBS 1x e ressuspensas à uma densidade aproximada de 10^8 células/mL.

Para o desenvolvimento do teste de ELISA, placas de poliestireno foram revestidas com solução 0,1% de poli-L-lisina e incubadas à 37 °C por uma hora. Posteriormente, as cavidades foram sensibilizadas com aproximadamente 10^8 células de *Leptospira*. Algumas cavidades foram sensibilizadas com as células inteiras, já outras sensibilizadas com as células lisadas (por sonicação) para expor as proteínas e outras com a proteína recombinante rErpY-like. As cavidades foram bloqueadas com solução de soro fetal bovino (FBS) 1% por uma hora e, na sequência, pAbs anti-rErpY-like foram adicionados em uma diluição de 1:100 em PBS 1x. Anticorpos monoclonais (mAbs) anti-LipL32 (FERNANDES et al., 2007) e soro fetal bovino, foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados à enzima peroxidase foram adicionados e a presença do complexo antígeno-anticorpo foi verificada através da adição de uma solução contendo peróxido de hidrogênio 0,03% e dihidrocloreto de o-fenildiamina (OPD). Entre todas as etapas, as cavidades foram lavadas com solução PBS-T. Os resultados da reação foram visualizados em leitor de ELISA VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA) com comprimento de onda de 450 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ELISA indireto, os pAbs anti-rErpY-like foram capazes de reagir com a proteína rErpY-like, alcançando o título de 1:12.800. Observou-se, também, que houve reação dos pAbs tanto com células inteiras de *Leptospira* quanto com células lisadas. Na Figura 1 é possível visualizar os resultados de absorbância gerados pela reação dos pAbs com a proteína recombinante e nativa, bem como os resultados das reações correspondentes aos controles negativo e positivo.

Esses resultados evidenciam a capacidade de exposição da proteína ErpY-like na membrana externa da bactéria, além de demonstrar a existência dos mesmos epítopos tanto na expressão heteróloga quanto na bactéria nativa. Desta forma, a aplicação da proteína recombinante ErpY-like em testes diagnósticos torna-se um importante alvo para avaliar a resposta imunitária gerada durante a infecção do hospedeiro (SILVA et al., 2016).

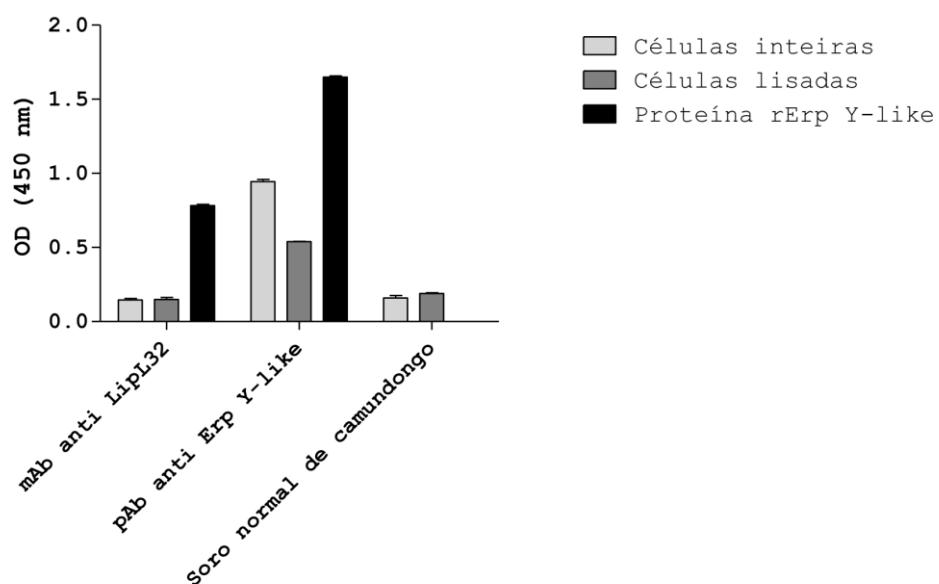


Figura 1: Representação dos resultados de absorbância da reação da proteína ErpY-like nativa presente em células de *L. interrogans* inteiras (barras cinza-claro) e lisadas (barras cinza-escuro), e da proteína recombinante ErpY-like (barras pretas) com pAbs anti-rErpY-like. Como controles positivos e negativos foram utilizados anticorpos monoclonais (mAbs) anti-rLipL32 e soro normal de camundongo, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de ensaios mais precisos e sensíveis utilizando抗ígenos recombinantes, como o teste de ELISA, são ferramentas alternativas para o controle da leptospirose. Além de sua eficácia, estes métodos apresentam maior facilidade de manipulação, segurança e rapidez, facilitando, assim, a obtenção de resultados.

Desta forma, a lipoproteína ErpY-like apresenta-se como um importante alvo a ser considerado no âmbito do controle da leptospirose. Contudo, mais estudos são necessários para maior compreensão desta proteína, bem como sua utilização como diagnóstico nas rotinas de laboratoriais.

5. REFERÊNCIAS

- ADLER, B. & DE LA PENA, M.A. *Leptospira and leptospirosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- BOMFIM, M.R.; KO, A.; KOURY, M.C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 89-94, 2005.

- ESHGHI, A.; CULLEN, P.A.; COWEN, L.; ZUERNER, R.L.; CAMERON, C.E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4564-4578, 2009.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. 1999. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne, Austrália: MedSci, 1999.
- FERNANDES, C. P.; SEIXAS, F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; MCBRIDE, A. J.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. **Hybridoma (Larchmt)**, v.1, p.35-41, 2007.
- HARLOW, E., & LANE, D. Antibodies: a laboratory manual. New York: coldspring Harbor Laboratory Press, 1988. 2ed.
- 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. **Current Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 106-109, 2013.
- HARTWIG, D.D.; SEIXAS, F.K.; CERQUEIRA, G.M.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1337-1341, 2011.
- HARTWIG, D.D.; FORSTER, K.M.; OLIVEIRA, T.L.; AMARAL, M.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 5, p. 747-752, 2013.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- MARIYA, R.; CHAUDHARY, P.; KUMAR, A.A.; THANGAPANDIAN, E.; AMUTHA, R.; SRIVASTAVA, S.K. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 269-277, 2006
- MCBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.
- MUSSO, D.; LA, S.B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245-52, 2013.
- OIE. **Leptospirosis**. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Paris, 2014. Acessado em 28 jul 2016. Online. Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>
- RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; HANDUNNETTI, S.M.; FERNANDO, S.D. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 2, p. 2-8, 2015.
- REIS, R.B.; RIBEIRO, G.S.; FELZEMBURGH, R.D.; SANTANA, F.S.; MOHR, S.; MENDELEZ, A.X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; RAVINES, R.R.; TASSINARI, W.S.; CARVALHO, M.S.; REIS, M.G.; KO, A.I. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n.4, p. 228, 2008.
- SILVA, L.P.; FERNANDES, L.G.V.; VIEIRA, M.L.; DE SOUZA, G.O.; HEINEMANN, M.B.; VASCONCELLOS, S.A.; ROMERO, E.C.; NASCIMENTO, A.L.T. Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction to human host componentes. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 5, 2016.