

DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIROSE CANINA UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

JÉSSICA DA CUNHA RAMOS¹; CAROLINE AMURIM DA SILVA GONÇALVES²;
MATHEUS ACEVEDO MONTANO²; SAMUEL RODRIGUES FELIX²; ALAN JOHN
ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel –
jessicaramos_15@hotmail.com

²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel –
carolamurim@gmail.com; matheusmontano64@hotmail.com; samuelrf@gmail.com

⁴Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel –
alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, com distribuição mundial, causada por espiroquetas patogênicas da família *Leptospiraceae* e do gênero *Leptospira* (ESTEVES et al., 2014). A contaminação em humanos pode ocorrer durante a exposição direta com animais reservatórios ou através do contato indireto com ambientes contaminados pela urina de animais com leptospirose. (CRODA et al., 2007). Dentre esses animais estão os caninos, que são uma das principais fontes de infecção para os humanos. A leptospirose em cães pode se manifestar com uma ampla gama de sintomas, como febre, insuficiência hepática e renal, icterícia e sangramento (THOMÉ et al., 2014). Isto resulta em uma estimativa de ocorrência de aproximadamente 1,03 milhões de casos de leptospirose por ano no mundo, com 59.000 fatalidades (COSTA et al., 2015). No Brasil, no ano de 2015 estimou-se a ocorrência de 4.288 casos resultando a letalidade em 321 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Existem dois métodos principais para a detecção da doença, sendo elas o teste de diagnóstico recomendado pela OMS, o Teste de Microaglutinação (MAT) e o isolamento da bactéria (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Ambas técnicas possuem limitações, no caso do MAT, é um teste com menor sensibilidade na fase inicial da doença, necessita de um trabalho intensivo e precisa manter cepas vivas de *Leptospira* (CRODA et al., 2007). No caso de isolamento, é um processo laborioso demandando meses para obter o resultado, além de possuir baixa sensibilidade (BHARTI et al., 2003). O MAT é o mais usado devido a vantagem de ser sorovar específico, porém não consegue distinguir entre anticorpos devido a infecção ou a vacinação. (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho é desenvolver um teste diagnóstico para leptospirose canina baseado em um Teste Imunoenzimático (ELISA) utilizando as proteínas recombinantes rLigB e Quimera como os抗ígenos.

2. METODOLOGIA

2.1 Banco de Soros

Os soros caninos usados nesse ELISA, tiveram origem de um projeto de vigilância epidemiológica realizada no bairro Laranjal na cidade de Pelotas/RS. Todos os soros foram previamente submetidos a técnica-padrão de diagnóstico, o MAT. Foram avaliados 25 soros, sendo 9 deles caracterizados como negativo (título < 1:25) e 16 como positivo (título >1:200).

2.2 Padronização do ELISA Indireto

A placa foi sensibilizada por 16 horas a 4°C, com quatro diferentes quantidades de proteína 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng/poço dos antígenos rLigB e Quimera, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH=9,6. Os soros foram testados em duplicatas utilizando a quantidade de 50 µL dos soros, em cada cavidade, logo após a placa foi incubada à 37°C por 1 hora. As diluições de soros utilizadas foram de 1:50-1:800. O próximo passo foi adicionar 50 µL por poço do anticorpo anti-IgG canino conjugado com peroxidase, diluído em 1:1000-1:10000 em PBS-T. Posteriormente, 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 (0,05% de Tween 20).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes para a padronização do ELISA indireto com as proteínas rLigB e com a proteína Quimera, para estabelecer os seguintes critérios: quantidade ideal de proteína, diluições de soro canino e de anticorpo anti-IgG canino conjugado com peroxidase. O anticorpo IgG começa a aparecer em alta quantidade no sangue de animais com leptospirose, entre 3 a 4 semanas após a infecção, estando relacionado com a fase convalescente da doença. (CHALAYON et al., 2011).

Na padronização com rLigB, foram escolhidas as diluições de soro 1:100 e 1:2000 do anti-IgG canino conjugado com peroxidase, obtendo valores de sensibilidade de 88,0% e especificidade de 100%. Com a Quimera, os resultados obtidos na padronização foram de 1:100 da diluição do soro e 1:4000 da diluição do anticorpo secundário, com valores de sensibilidade e especificidade de 60,0% e 100%, respectivamente.

Na análise com a curva ROC, obteve-se para a rLigB sensibilidade de 94,0% e especificidade de 100% e para a proteína Quimera os resultados obtidos de sensibilidade e especificidade foram de 80,0 % e 90,0 % respectivamente. Para a padronização destes testes, levou-se em consideração que os parâmetros ideais para um teste de diagnóstico, devem possuir valores de sensibilidade e especificidade maiores que 90,0% na fase aguda.

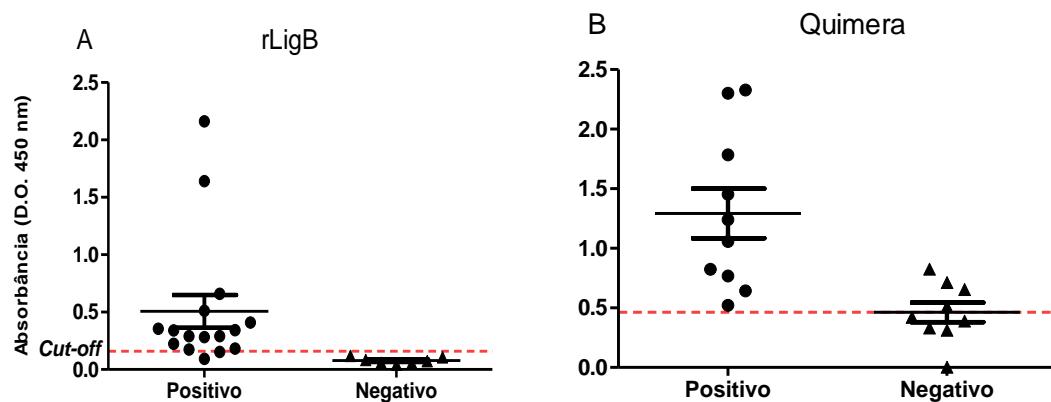


Figura: ELISA Indireto com proteínas recombinantes. A: Avaliação de soros individuais utilizando a quantidade de 50 ng de rLigB, diluição de soro 1:100 e diluição do anticorpo anti-IgG canino conjugado com peroxidase de 1:2000. B: Avaliação dos soros individuais utilizando a quantidade de 50ng de Quimera, diluição de soro 1:100 e diluição do anticorpo anti-IgG canino conjugado com peroxidase de 1:4000. A linha pontilhada vermelha se refere ao valor do *Cut-off* do teste que é a média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta resultados promissores visto que ambos os testes estão dentro dos parâmetros ideias para um teste de diagnóstico para leptospirose canina. Porém, se faz necessário aumentar o número de soros para confirmar os resultados obtidos até o momento, o que já está sendo feito por nosso grupo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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, 2007.

BUDIHAL, S. V., & PERWEZ, K. Leptospirosis diagnosis: Competency of various laboratory tests. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 8(1), 199–202. 2014.

ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p. 287-96. 2010.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; VINETZ, J. M. REVIEWS. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Journal of Clinical Microbiology**. p.757-771, 2003.

COSTA.F, HAGAN.J.E, CALCAGN.J, KANE.M, TORGERSON.P, MARTINEZ-SILVEIRA. M.S, STEIN.C, ABELA-RIDDER.B, KO.A.I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PloS One**, 2015

Ministério da saúde. **Informe epidemiológico Leptospirose**. Portal da saúde. 2016. Online. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php\situacaoepidemiologica-dados>

THOMÉ, S., LESSA-AQUINO, C., KO, A. I., LILENBAUM, W., MEDEIROS, M. A. Identification of immunodominant antigens in canine leptospirosis by Multi-Antigen Print ImmunoAssay (MAPIA). **BMC Veterinary Research**. 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.