

## PROTEÍNAS RECOMBINANTES ErpY-like, LipL32 E SUA ASSOCIAÇÃO EM ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM SUÍNOS

HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO<sup>1</sup>; STELLA BUCHHORN DE FREITAS<sup>1</sup>; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA<sup>2</sup>; BÁRBARA COUTO ROLOFF PADILHA<sup>2</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – henrique15@gmail.com

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPEL, Pelotas/RS

<sup>3</sup>Departamento 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* spp., transmitida principalmente através da urina de animais infectados (FAINE et al. 1999; MUSSO E LA, 2013). Diversos mamíferos podem albergar leptospirosas patogênicas, no entanto, os roedores são os reservatórios mais frequentes. Esses animais alojam os micro-organismos nos rins e o eliminam através da urina, contaminando o solo e a água (JORGE et al. 2015). Uma variedade de animais domésticos, de companhia e de interesse econômico, incluindo cães, bovinos e suínos, podem ser acometidos pela enfermidade e, dentre as leptospirosas patogênicas, as espécies *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii* são agentes etiológicos mais frequentes em casos de leptospirose humana e animal (ADLER; DE LA PENA, 2010).

Atualmente para o diagnóstico da leptospirose, além da sintomatologia clínica, são utilizados métodos de detecção e isolamento de *Leptospira* em amostras biológicas e também testes sorológicos, dentre outras análises (FAINE et al., 1999). Dentre os métodos sorológicos, a soroaglutinação microscópica (MAT), que utiliza cepas de leptospirosas vivas para a reação com soros de humanos e animais, é considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da doença (OIE, 2008; WHO, 2003). No entanto, a MAT apresenta baixa sensibilidade na fase aguda da doença, devido aos níveis de anticorpos não detectáveis nesse período (MCBRIDE et al., 2005; MUSSO E LA, 2013), e um alto grau de reações cruzadas com outros sorovares (ADLER; DE LA PENA, 2010).

Devido às dificuldades encontradas para o controle da leptospirose, a busca por métodos alternativos de diagnóstico tornou-se necessária, e nos últimos anos tem havido um grande esforço no desenvolvimento de testes de diagnóstico mais sensíveis, seja através da detecção de anticorpos ou identificação de antígenos (McBride et al., 2005; Pinne, Matsunaga, Haake, 2012; Subathra, senthilkumar, Ramadass, 2013). Muitos destes ensaios são baseados na técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando antígenos recombinantes de *Leptospira* (BOMFIM et al. 2005; HARTLEBEN et al. 2013).

O estudo de proteínas presentes exclusivamente em leptospirosas patogênicas e expressas por cepas virulentas da bactéria (ADLER et al., 2011), tem implicado na identificação de novos alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas (NASCIMENTO et al., 2004; PINNE, MATSUNAGA, HAAKE, 2012; VIERA et al., 2009). Dentre elas, tem sido avaliado o potencial da lipoproteína ErpY-like, alvo deste estudo, a qual foi descrita como sendo uma proteína de *L. interrogans* que possui sequência muito similar a fatores de virulência

encontrados em outros patógenos, como a lipoproteína de membrana externa ErpY de *Borrelia burgdorferi*. Além disso, sua expressão foi observada durante a infecção *in vivo* (ESHGHI et al., 2009), demonstrando, assim, sua importância no processo de infecção e potencial para ser utilizada como antígeno vacinal ou em testes de diagnóstico.

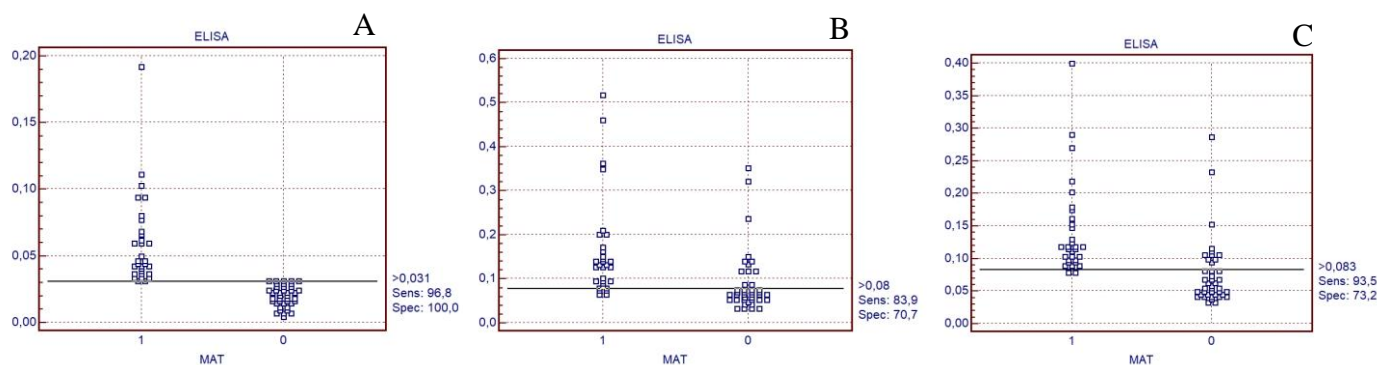
Com isso, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de um ELISA indireto utilizando a proteína recombinante ErpY-like de forma individual ou associada à proteína recombinante LipL32 para o diagnóstico para leptospirose em suínos.

## 2. METODOLOGIA

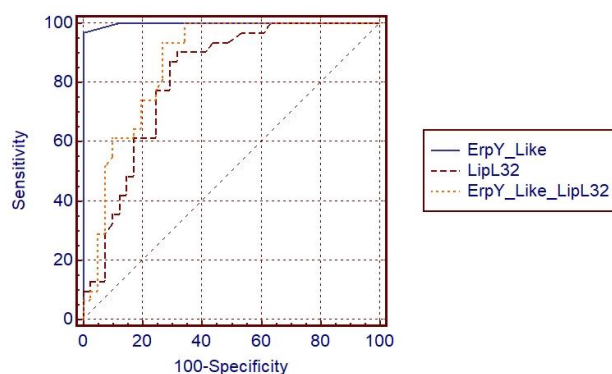
O gene sintético da proteína tipo ErpY-like ( $\approx$  390 pb) foi sintetizado (GenOne, Rio de Janeiro, Brasil) através da sequência genômica de *L. interrogans* serovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) disponível no Genbank (GeneBank: AE016823). O gene de *erpY-like* foi obtido clonado no vetor pAE, fundido com uma cauda N-terminal de 6  $\times$  His. O plasmídeo tipo pAE/*erpY* foi usado para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star para produção de proteína recombinante (rErpY-like). Já a proteína rLipL32 foi expressa de acordo com (HARTWIG, D.D et. al. 2011). Para o ELISA, foi realizado um teste *checkboxboard* para determinar a concentração dos insumos utilizados. Depois da padronização, microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com 50 ng/cavidade das proteínas recombinantes ErpY-like e LipL32, individualmente ou associadas, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após, foi realizado bloqueio com solução de PBS-T acrescido de 0,5% de caseína, seguido da adição de soros de suínos positivos e negativos para a leptospirose (previamente determinados na MAT), na diluição de 1:50. Para detecção do complexo antígeno-anticorpo formado, foi utilizado anticorpo anti-IgG suíno conjugado à peroxidase, na diluição de 1:6000. Os soros suínos, bem como o anticorpo secundário, foram diluídos em solução de PBS-T acrescido de 0,5% de caseína. Em todas as etapas as placas foram incubadas a 37°C por 1 h e, posteriormente, lavadas três vezes com solução PBS-T acrescido de 0,5% caseína. As reações foram reveladas com solução substrato/cromógeno contendo o-phenylenediamine (0,2 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min. As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 450 nm usando VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA). Como controles foram utilizados soros suínos verdadeiramente positivos e negativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de ELISA desenvolvido utilizando a proteína rErpY-like, apresentou *cut-off* (ponto de corte)  $> 0,031$ , sensibilidade de 96,8%, especificidade de 100% e acurácia de 99% (Figura 1A). Com a proteína rLipL32 o *cut-off* foi  $> 0,08$ , a sensibilidade foi de 83,9%, a especificidade de 70,7% e a acurácia de 81,5% (Figura 1B). Já para a associação das duas proteínas, o *cut-off* foi  $> 0,083$ , a sensibilidade foi de 93,5%, a especificidade de 73,2% e a acurácia de 86,6% (Figura 1C).



**Fig. 1: Agrupamento dos soros utilizados no ELISA indireto para o diagnóstico da leptospirose em suínos.** Relação com o teste padrão – MAT. *Cut-off*, sensibilidade e especificidade do teste, onde 1 são os soros positivos na MAT e 0 os negativos. Gráfico A: Proteína rErpY-like; Gráfico B: Proteína rLipL32; Gráfico C: Proteínas rErpY-like e rLipL32 associadas.



**Fig. 2: Comparação das Curvas ROC.** ELISA indireto com a proteína rErpY-like, rLipL32 e sua associação para o diagnóstico da leptospirose em suínos.

O teste de ELISA com a proteína rErpY-like quando comparado com o teste com a proteína rLipL32, obteve diferença significativa ( $p=0,00$ ), assim como quando comparado com a associação das proteínas rErpY-like e rLipL32 ( $p=0,003$ ). Já quando comparado o teste de utilizando a rLipL32 com a associação das duas proteínas, não houve diferença significativa ( $p=0,400$ ) (Figura 2).

O ELISA é um teste rápido e de fácil reprodução, sendo possível a análise de um grande número de amostras em menos tempo, quando comparado a MAT. Para as proteínas testadas, rErpY-like apresentou melhores resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia, mostrando o potencial desta para o uso no diagnóstico e controle da leptospirose suína, mesmo em comparação com a proteína LipL32 (Hartleben et al., 2013).

#### 4. CONCLUSÕES

O ELISA indireto desenvolvido onde empregaram-se as proteínas rErpY-like e rLipL-32, bem como sua associação demonstrou ser um teste sensível, específico e eficiente para a detecção de anticorpos anti-leptospira no soro de suínos naturalmente infectados. Este teste pode ser usado como diagnóstico, bem como, para triagem antes da confirmação por MAT.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, v.153, n.1-2, p.73-81, 2011.
- ADLER, B. & DE LA PENA, M.A. 2010. *Leptospira and leptospirosis*. *Vet.Microbiol.*, 140, (3-4) 287-296.
- BOMFIM, M.R., KO, A., & KOURY, M.C. 2005. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Vet Microbiol.**, 1, (2) 89-94.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. MedSci, Melbourne, 2<sup>nd</sup> ed, p.272, 1999.
- FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.9, p.3303-3310, 2001.
- HARTLEBEN, C.P., LEAL, F.M., MONTE, L.G., HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., VASCONCELLOS, S.A., BRIHUEGA, B., & DELLAGOSTIN, O.A. 2013. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. **Curr. Microbiol.**, 2, 106-109.
- JORGE, S., MONTE, L.G., DE OLIVEIRA, N.R., COLLARES, T.F., ROLOFF, B.C., GOMES, C.K., HARTWIG, D.D., DELLAGOSTIN, O.A., & HARTLEBEN, C.P. 2015. Phenotypic and Molecular Characterization of *Leptospira interrogans* Isolated from *Canis familiaris* in Southern Brazil. *Curr.Microbiol.*, 4, 496-500.
- MCBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., & KO, A.I. 2005. Leptospirosis, **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 18, 376-386.
- MUSSO, D. & LA, S.B. 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, 46, (4) 245-52.
- NASCIMENTO, A.L., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., VAN SLUYS, M.A., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., CAMARGO, L.E., DIGIAMPIETRI, L.A., HARSTKEERL, R.A., HO, P.L., MARQUES, M.V., OLIVEIRA, M.C., SETUBAL, J.C., HAAKE, D.A., & MARTINS, E.A. 2004a. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37, 459-477.
- OIE. Leptospirosis, 2014. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization for Animal Health, Paris.
- PINNE, M., MATSUNAGA, J., & HAAKE, D. A. 2012. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. **J. Bacteriol.**, 194, (22) 6074-6087.
- SUBATHRA, M., SENTHILKUMAR, T.M., & RAMADASS, P. 2013. Recombinant OmpL1 protein as a diagnostic antigen for the detection of canine leptospirosis. **Appl Biochem. Biotech**, 169, (2) 431-437.
- Vieira et al., 2009.
- VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, n.5, p.527-538, 2001.
- WANG Z, JIN L, WEGRZYN A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, v.6, n.39, 2007.
- WHO Human leptospirosis: **Guidance for diagnosis, surveillance and control**. 2003.