

USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ErpY-like EM ELISA IgG INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM HUMANOS

HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO¹; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA²; BÁRBARA COUTO
ROLOFF PADILHA²; ILANA TERUSZKIN BALASSIANO³; DAIANE DRAWANZ
HARTWIG^{2,4}

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

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

³Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Centro de Referência Nacional para Leptospirose, Coleção de *Leptospira*, IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas/RS - daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose disseminada e potencialmente fatal, 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). Embora muitos animais silvestres e domésticos possam servir como hospedeiros reservatórios, o rato marrom (*Rattus norvegicus*) é a fonte mais importante em infecções humanas (HAAKE; LEVETT, 2015). Assim, indivíduos que vivem em ambientes urbanos como as favelas, caracterizadas por saneamento e habitações precárias, apresentam alto risco de exposição a ratos e, conseqüentemente, a leptospirose (HAAKE; LEVETT, 2015). A espécie *Leptospira interrogans* é o agente etiológico mais frequente em casos de leptospirose humana (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 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, continua sendo a investigação sorológica definitiva tanto em humanos quanto em animais (OIE, 2008; WHO, 2003; HAAKE; LEVETT, 2015). No entanto, essa técnica 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.

Assim, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de um ELISA IgG utilizando a proteína recombinante ErpY-like para o diagnóstico para leptospirose em humanos.

2. METODOLOGIA

O gene sintético que codifica para a proteína ErpY-like ($\cong 390$ pb) foi sintetizado (GenOne, Rio de Janeiro, Brasil) com base na sequência genômica de *L. interrogans* serovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) disponível no Genbank (GeneBank: AE016823). O gene *erpY-like* foi obtido clonado no vetor pAE, fundido com uma cauda N-terminal de 6 x His. O plasmídeo *pAE/erpY-like* foi usado para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star para produção da proteína recombinante (rErpY-like). Para o ELISA, foi realizado um teste *checkboard* para determinar a concentração dos insumos utilizados. Depois da padronização, microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com 312,5 ng/cavidade da rErpY-like, diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após, foi realizado bloqueio com solução de PBS-T [tampão fosfato-salino 1X + 0,05% (v/v) de Tween 20] acrescido de 0,5% de caseína, seguido da adição de soros humanos positivos e negativos para a leptospirose, $n=72$ (previamente determinados na MAT), na diluição de 1:50. Para detecção do complexo antígeno-anticorpo formado, foi utilizado anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase, na diluição de 1:10.000. Os soros humanos, bem como o anticorpo secundário, foram diluídos em PBS 1X. Em todas as etapas as placas foram incubadas a 37°C por 1 h e, posteriormente, lavadas três vezes com solução PBS-T. As reações foram reveladas com solução substrato/cromógena contendo o-phenylenediamine (0,2 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 4,0) e 0,03% de H₂O₂ durante 15 min, após, a reação foi parada com a solução de 2N de ácido sulfúrico H₂SO₄. As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 492 nm usando VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA). Como controles foram utilizados soros humanos verdadeiramente positivos e negativos. Para análise dos resultados foi utilizado o software MedCalc® version 8.0.0.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de ELISA desenvolvido utilizando a proteína rErpY-like apresentou *cut-off* (ponto de corte) > 0,08, sensibilidade de 96,4%, especificidade de 100% e acurácia de 99,4% (Figura 1 e 2).

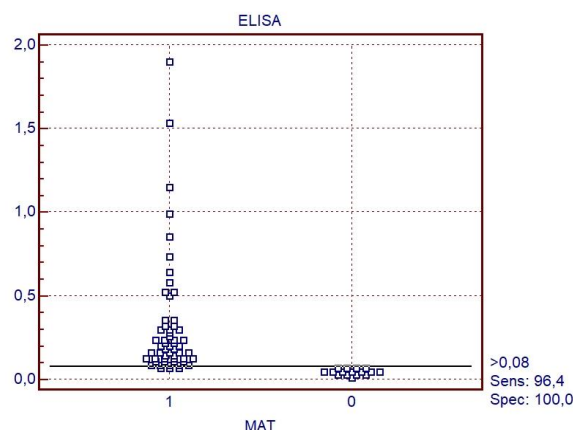


Fig. 1: Agrupamento dos soros utilizados no ELISA IgG para o diagnóstico da leptospirose em humanos. Relação com o teste padrão – MAT. *Cut-off*, sensibilidade e especificidade do teste, onde 1 são os soros positivos na MAT e 0 os negativos.

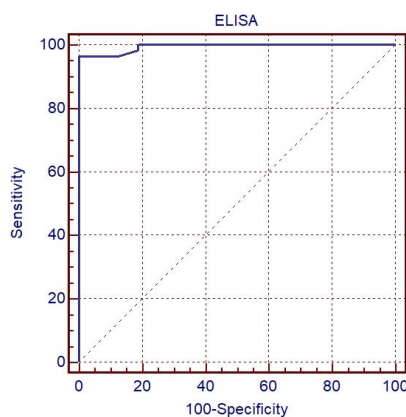


Fig. 2: Curva ROC. Curva ROC do ELISA IgG para o diagnóstico de leptospirose em humanos.

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. O uso da proteína rErpY-like em um ELISA IgG demonstrou ser eficaz para diferenciar soros positivos e negativos de humanos. Muitos autores descrevem resultados similares com a utilização de proteínas recombinantes, no entanto, apresentam sensibilidade e especificidade menores em relação as encontradas neste estudo. Desta forma, o teste aqui proposto mostrou-se promissor.

3. CONCLUSÕES

O ELISA IgG indireto desenvolvido com a proteína rErpY-like demonstrou ser um teste sensível, específico e eficiente para a detecção de anticorpos anti-leptospira no soro de humanos 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, 2nd 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.
- Haake, David A., and Paul N. Levett. "Leptospirosis in Humans." **Current topics in microbiology and immunology** 387 (2015): 65–97. PMC. Web. 28 Aug. 2018.
- 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.