

USO DE QUIMERA RECOMBINANTE CONTENDO EPÍTOPOS DE *Leptospira interrogans* PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA.

THAYNÁ LANER CARDOSO¹; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK²; ISABEL LADEIRA PEREIRA³;AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO⁴; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁵

¹Universidade Federal de Pelotas- nanalancer@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – isabelladeirapereira@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - amiltonseixas@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose de distribuição mundial, sendo relatados mais de 1 milhão de casos ao ano (COSTA et al., 2015). A infecção é decorrente principalmente do contato direto ou indireto com a urina de roedores, os quais são importantes disseminadores de leptospires patogênicas (BANDARA et al., 2016; MUSSO; LA SCOLA, 2013). *Leptospira interrogans* é a principal responsável pelo desenvolvimento da doença, tanto em animais quanto em humanos. Trata-se de uma espiroqueta gram-negativa, aeróbica estrita, de formato achatado e helicoidal, possuindo alta motilidade devido aos endoflagelos polarizados na sua extremidade(ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

No Brasil, é relatada uma alta incidência de leptospirose humana, com aproximadamente 5 mil casos ao ano e uma letalidade média de 10,8%(OLIVEIRA; SANTOS; CAMPOS, 2022) . Apesar de ser uma doença de notificação compulsória obrigatória, potencialmente letal e ser classificada internacionalmente como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), seu impacto na saúde da população brasileira ainda é subestimado, ocorrendo casos subdiagnosticados, principalmente devido à falta de investimentos e a semelhança dos sintomas com outras doenças endêmicas(MARTINS; SPINK, 2020; OLIVEIRA et al., 2022).

Os sintomas da leptospirose humana variam de uma simples doença febril, com sintomas leves e autolimitantes, a infecções severas, as quais mesmo com estratégias de intervenções agressivas, as taxas de mortalidade permanecem altas.(ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010) Em quadros clínicos mais graves, a infecção pode acometer o fígado (icterícia), rins (nefrite), pulmões (hemorragia pulmonar) e cérebro (meningite) (GOUVEIA et al., 2008; SEGURA et al., 2008).

O diagnóstico da leptospirose em humanos passa pelo exame clínico e pela coleta de amostras de soro, que são enviadas aos Laboratórios Centrais (LACEN). Nestes se faz um ensaio sorológico do tipo ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para o diagnóstico da enfermidade, no entanto, estes ensaios são importados e de alto custo, e a confirmação do resultado sempre deve ser feita pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) (PADILHA; SILVEIRA; HARTWIG, 2022). Este teste é o padrão ouro recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico de leptospirose, e consiste em confrontar diferentes sorovares de leptospires patogênicas vivas, com o soro de pacientes suspeitos da infecção. É um teste altamente laborioso, que apresenta riscos à saúde dos técnicos e principalmente, pode levar a resultados errôneos decorrente das diferentes interpretações (YAAKOB; RODRIGUES; JOHN, 2015)

Desta forma, é evidente a necessidade de alternativas nacionais, que possibilitem um diagnóstico de baixo custo, eficiente e precoce, sendo esses fatores cruciais para um tratamento eficaz (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Assim, o presente

estudo buscou desenvolver um teste sorológico nacional para diagnóstico da leptospirose em humanos. Para isso, utilizou-se uma quimera recombinante chamada rErpY-LemA contendo epítópos preditos como estimuladores de anticorpos nestas duas proteínas, para uso como antígeno em um ensaio sorológico do tipo ELISA indireto.

2. METODOLOGIA

Produção da quimera recombinante rErpY-LemA: realizada conforme descrito na solicitação de depósito de patente (BR1020230106161).

Soros humanos: soros humanos verdadeiramente positivos e negativos foram cedidos pelo Laboratório Referência Nacional de Diagnóstico de Leptospirose da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ, Brasil). Ao total, foram utilizadas 80 amostras de soros humanos, de diferentes regiões do Brasil e titulações, todos previamente caracterizados por MAT quanto a fase de infecção. Desses, 20 soros eram negativos, 40 positivos (20 de fase aguda e 20 de fase convalescente) e o restante, todos de fase desconhecida.

ELISA indireto IgG: microplacas de poliestireno (Nunc, Polysorp – *Thermo Scientific*, Waltham, MA) foram sensibilizadas com 100 ng da quimera rErpY-LemA, diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e armazenada *overnight* à 4°C. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com solução de PBS 1x e leite em pó 5%, por 90 minutos. A seguir foram adicionados os soros (diluídos 1:100 em solução PBS 1x, leite em pó 2%, pH 7,4) e a placa mantida *overnight*, a 4°C. Para detecção do complexo antígeno-anticorpo formado, foi adicionado o anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) e a placa incubada por 1h a 37°C. Em todas as etapas, as placas foram lavadas três vezes com solução PBS 1x. As reações foram reveladas com solução substrato/cromógena contendo o-phenylenediamine (0,4 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 4,0) e 0,03% de H₂O₂ durante 20 min, posteriormente, a reação foi parada com a solução de 2N de ácido sulfúrico (H₂SO₄). As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 492 nm usando VICTORTM X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA). Para análise dos resultados foi utilizado o software MedCalc® versão 8.0.0.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio ELISA indireto IgG com a utilização de 80 soros previamente caracterizados pela MAT apresentou resultados positivos, tanto para os soros de fase aguda, quanto os de fase convalescente, obtendo um *cut-off* de 0,136, uma sensibilidade de 98,3% e especificidade de 95% (Fig.1A). Enquanto a curva de ROC (*Receiver Operating Characteristic*) apresentou AUC de 0,954 (Fig.1B).

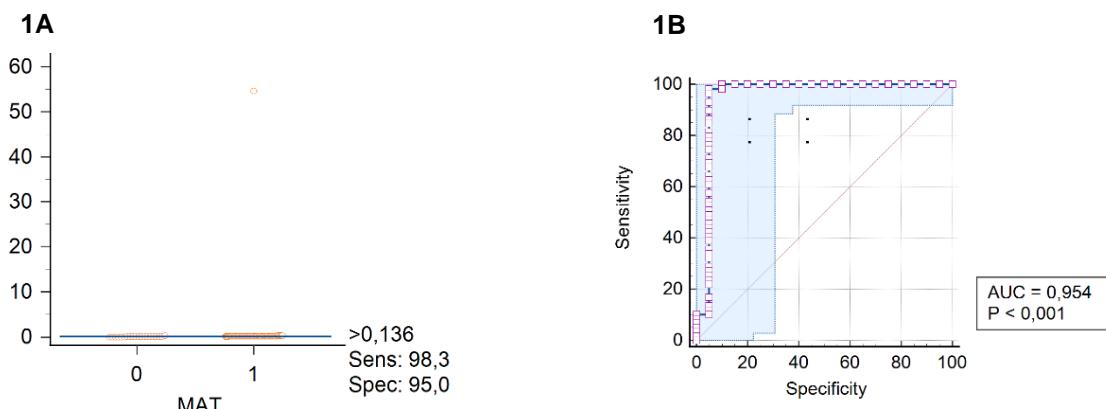


Figura 1: A- Agrupamento dos soros utilizados para o diagnóstico da leptospirose em humanos, relacionados com o teste padrão MAT. *Cut-off*, sensibilidade e especificidade do teste, onde 1 são os soros positivos na MAT e 0 os negativos. **B-** Curva ROC do ELISA indireto utilizando soros humanos.

Soros de fase aguda apresentam um elevado número de anticorpos IgM, enquanto que, anticorpos IgG são comuns em soros de fase tardia/convalescente (PICARDEAU, 2013; YAAKOB; RODRIGUES; JOHN, 2015). Apesar de confrontarmos todos os soros positivos humanos apenas com anticorpo IgG, obtivemos uma elevada sensibilidade e especificidade, demonstrando a eficiencia da quimera como antígeno e estimulando o prosseguimento desse estudo, a fim de avaliar também a resposta com o anticorpos IgM.

O controle da leptospirose permanece um grande desafio, de modo que diversos estudos buscam desenvolver testes de diagnóstico mais sensíveis e específicos. Atualmente, a maioria dos testes em desenvolvimento para o diagnóstico de leptospirose se baseiam em ensaios sorológicos do tipo ELISA (CHALAYON et al., 2011; DENEKE et al., 2014; ALIZADEH et al., 2014; ANITA et al., 2016). Testes sorológicos detectam anticorpos que são produzidos a partir da estimulação da resposta imune humoral contra *Lepostospira* spp. no hospedeiro (BANDARA et al., 2016).

PADILHA et al. (2019) obteve resultados significativos utilizando a proteína rErpY-Like para o diagnóstico da leptospirose suína, obtendo uma sensibilidade e especificidade de 96,8% e 100%, respectivamente. Desse modo, o uso da quimera recombinante ErpY-LemA para o diagnóstico se justifica, pois, a quimera recombinante multi-epítopo utilizada nesse trabalho é baseada nas proteínas LemA e ErpY-like, demonstrando assim, um grande potencial para o diagnóstico da leptospirose.

4. CONCLUSÕES

A proteína recombinante rErpY-LemA demonstrou-se promissora como antígeno no teste sorológico do tipo ELISA indireto. O ensaio apresentou uma elevada sensibilidade e especificidade, independentemente da fase clínica da doença, indicando que a proteína foi reconhecida por soros de fase aguda e convalescente da doença. Assim, a quimera recombinante se destaca como potencial alvo para o diagnóstico sorológico da leptospirose em humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- ALIZADEH, S. et al. Evaluation of New ELISA based on rLsa63 - rLipL32 antigens for serodiagnosis of Human Leptospirosis. **Iranian journal of microbiology**, v. 6, p. 184–9, 2014.
- ANITA, K. et al. Evaluation of combined B cell specific N-terminal immunogenic domains of LipL21 for diagnosis of leptospirosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 465–470, 2016.
- BANDARA, K. et al. Utility of modified Faine's criteria in diagnosis of leptospirosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.
- CHALAYON, P. et al. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 5, p. 289–297, 2011.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.
- DENEKE, Y. et al. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 4, p. 141–146, 2014.
- GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.
- MARTINS, M. H. DA M.; SPINK, M. J. P. Human leptospirosis as a doubly neglected disease in Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 919–928, 2020.
- MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245–252, 2013.
- OLIVEIRA, E. H. DE et al. Leptospirose no Brasil: uma abordagem em saúde coletiva. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e19411627111, 2022.
- OLIVEIRA, V.; SANTOS, A. F. DOS; CAMPOS, H. Leptospirose: um estudo epidemiológico dos casos notificados no Brasil entre os anos de 2015 e 2019 / Leptospirosis: an epidemiological study of notified cases in Brazil between the years 2015 and 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 5964–5979, 2022.
- PADILHA, B. C. R. et al. The use of ErpY-like recombinant protein from *Leptospira interrogans* in the development of an immunodiagnostic test for swine leptospirosis. **Acta Tropica**, v. 193, n. December 2018, p. 31–34, 2019.
- PADILHA, B. C. R.; SILVEIRA, M. M.; HARTWIG, D. D. Molecular and serological diagnostic of leptospirosis: a review (2014–2020). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e19511225471, 2022.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013.
- SEGURA, E. R. et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, w. v. 40, n. 3, p. 343–351, 2008.
- YAAKOB, Y.; RODRIGUES, K. F.; JOHN, D. V. Leptospirosis: Recent incidents and available diagnostics– A review. **Medical Journal of Malaysia**, v. 70, n. 6, p. 351–355, 2015.