

PADRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA

CAROLINE AMURIM DA SILVA GONÇALVES¹; ANA SOFIA LIMA ESTEVÃO DE OLIVEIRA²; MAURÍCIO TAMBORINDEGUY²; NEIDA CONRAD²; KARLA SEQUEIRA MENDONÇA²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – carolamurim@gmail.com

²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – anasofialima2@hotmail.com; mauriciotamborindeguy@gmail.com; neidaconrad@yahoo.com.br; karlasmend@yahoo.com.br

³Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é considerada uma zoonose de importância mundial, por resultar em altas taxas de mortalidade na sua forma grave, sendo causada por espiroquetas patogênicas que pertencem ao gênero *Leptospira* (LIN, et al., 2008). A infecção em seres humanos ocorre principalmente quando os indivíduos entram em contato, direta ou indiretamente, com urina de roedores contendo células viáveis da bactéria, ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados (DESIYUN, et al., 2011). Nos humanos, os sinais referentes à infecção pela bactéria podem sofrer variações, pois dependem da virulência da *Leptospira*, podendo resultar em sintomas mais brandos que podem ser confundidos com outras doenças, como a gripe, ou até mesmo em sintomas mais graves, como o dano hepático (MCBRIDE, et al., 2005). O diagnóstico clínico é difícil, especialmente nos países tropicais, onde outras doenças febris como a malária, dengue e influenza podem ser semelhantes a leptospirose e tratadas com os mesmos antibióticos (LEVETT, 2011 e LIN, et al, 2008).

Atualmente, sabe-se que *Leptospira*, como outras espiroquetas, possui grande quantidade de lipoproteínas, que podem estar envolvidas nas interações com as células hospedeiras (MATSUNAGA et al., 2003). Portanto, as proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*), como a LigB e o polipeptídeo LigBrep, por estarem localizadas na membrana externa da bactéria e por serem fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes diagnosticados com a doença, vem auxiliando no desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido para a leptospirose (CRODA et al., 2007).

Dessa forma, por ser uma das doenças que acarreta maior impacto econômico, o correto diagnóstico e a vigilância epidemiológica são fundamentais para que se possa estabelecer um controle efetivo da disseminação do agente etiológico da doença. Assim, este trabalho teve como objetivo padronizar o teste de ELISA indireto, utilizando a proteína recombinante LigBrep e a cepa patogênica *L. interrogans* sorovar Copenhageni inativada como antígenos, para o diagnóstico da leptospirose humana.

2. METODOLOGIA

Soros: As amostras de soro humano utilizadas nesse trabalho tiveram origem de pacientes suspeitos de estarem com a doença, na cidade de Salvador – Bahia e foram gentilmente cedidas pela FIOCRUZ. Dessa forma, os soros positivos

usados como controles nos diferentes testes de ELISA, também foram obtidos desses pacientes, tendo sido previamente submetidas à técnica-padrão de diagnóstico da doença, o MAT (teste de microaglutinação). Os soros negativos foram obtidos de pacientes sadios, sem antecedentes clínicos e epidemiológicos para a leptospirose.

Preparo do antígeno recombinante LigBrep: A proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) foi clonada e expressada segundo o protocolo descrito por Conrad et al (2013).

Preparo do antígeno bruto: O antígeno bruto foi preparado de acordo com o protocolo estabelecido por Ko et al (1999), utilizando-se o cultivo de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130.

Padronização do ELISA: Para avaliar a melhor concentração do antígeno na sensibilização da placa de ELISA, placas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas por 1h a 37°C, com 50ng e 100ng/poço da rLigBrep e com 50µL/poço da bactéria inativada, ambas diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (pH=9,6). Ensaios foram realizados para determinar as diferentes diluições dos soros para o anticorpo testado. Assim, os soros foram diluídos a 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 para a proteína LigBrep, e 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 para o antígeno bruto, e incubados durante 1h a 37°C. Em seguida, foram adicionadas as diferentes concentrações do anticorpo conjugado com peroxidase, o anti-humano IgG (1:500, 1:1000, 1:2000 para a LigBrep), e (1:500, 1:1000, 1:2000 para o antígeno bruto), seguido de incubação a 37°C durante 1h. As reações foram reveladas com o substrato o-fenilenodiamina (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

Tanto em humanos quanto em animais, ainda existe a necessidade da obtenção de maiores informações, em relação ao tipo de resposta imune gerada através da infecção por *Leptospira*, apesar de estudos apontarem a resposta imune humoral como a principal (KO et al., 2009). Os anticorpos produzidos pela infecção da bactéria, tornam-se detectáveis entre o sexto e décimo dia da doença, e começam a atingir altas quantidades dentro de 3 a 4 semanas. Assim, para detectar essa infecção, é preciso avaliar a presença do anticorpo IgG, pois este está relacionado a infecção crônica, onde os níveis no soro estão mais elevados (CHALAYON et al., 2011).

A fim de que se pudesse padronizar e avaliar o teste de ELISA para o diagnóstico sorológico da leptospirose humana, diferentes concentrações de antígeno, anticorpo primário e secundário foram testados. As melhores absorbâncias para o anticorpo anti-humano IgG, foram observadas quando utilizadas as quantidades de 50ng e 100ng da proteína LigBrep sensibilizada na placa (Figura 1). Os valores de absorbâncias (DO_{450}) obtidos com quantidade de 50ng de LigBrep variaram entre 1,36-1,38. Já para a quantidade de 100ng de antígeno recombinante, as absorbâncias variaram entre 1,64 e 1,58.

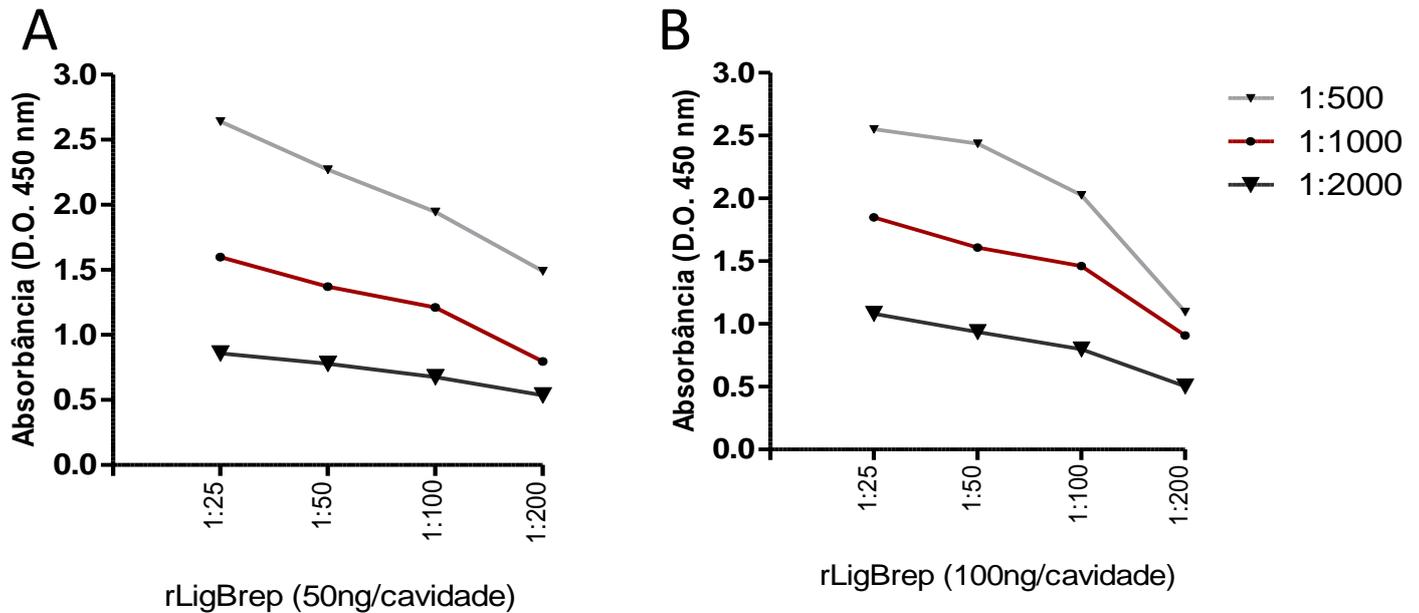


Figura 1: Avaliação do anticorpo anti-humano IgG nas quantidades de 50ng e 100ng do antígeno recombinante LigBrep. Utilizando as diluições de conjugado 1:500, 1:1000 e 1:2000 e diluições do soro

Com base nos diferentes testes de ELISA realizados utilizando-se o antígeno bruto, foi observado que os valores de absorvâncias (DO_{450}) obtidos para o anticorpo anti-humano IgG, variavam entre 1,26 e 1,22 (Figura 2).

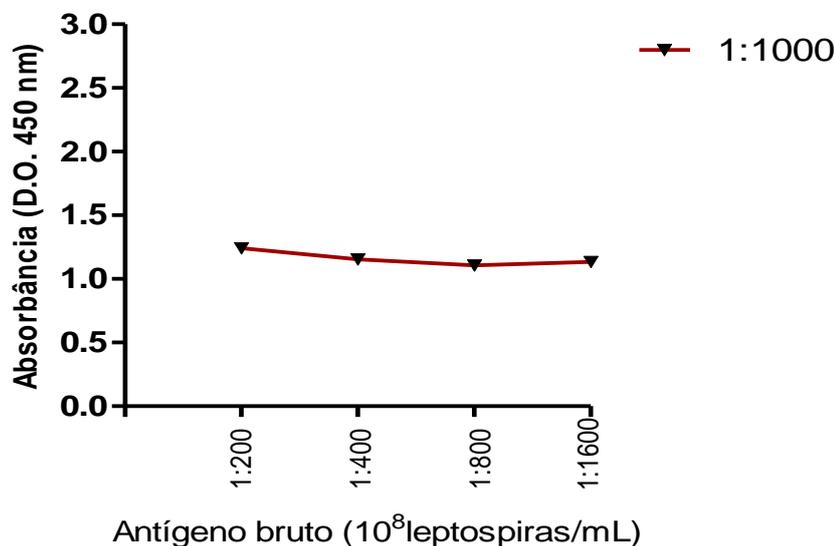


Figura 2: Avaliação da resposta do anticorpo anti-humano IgG por ELISA indireto utilizando o antígeno bruto. As amostras de soro na diluição 1:200 e diluição do conjugado 1:1000.

4. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados do teste de ELISA IgG com soro humano, utilizando a proteína recombinante LigBrep e o antígeno bruto, obtidos no

presente estudo, verifica-se que existe a necessidade da realização de futuras investigações, a fim de estabelecer um protocolo mais preciso e, desta forma, melhorar os ensaios imunoenzimáticos para a detecção da leptospirose humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CONRAD, N; TAMBORINDEGUY, M; GONÇALVES, C; PEREIRA, W; FABRES, M; MCBRIDE, A. J. A. Expressão da proteína rLigBrep na forma solúvel e caracterização com soro humano. **ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO DA UFPEL, XV**. Pelotas, 2013. Anais: Expressão da proteína rLigBrep na forma solúvel e caracterização com soro humano. Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PRPPG). 2013.

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. 1528-1534, 2007.

DESIYUN, A. A.; BABOOLAL, S; SUEPAUL, S; DOOKERAN, S; STEWART-JOHNSON, A. Human leptospirosis in the Caribbean, 1997–2005: characteristics and serotyping of clinical samples from 14 countries. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v.29, n.5, 2011.

KO, A. I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen, **Nature Reviews in Microbiology**, v.7, p. 736-747, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p. 296-326, 2001.

LIN, X; CHEN, Y; YAN, J. Recombinant Multiepitope Protein for Diagnosis of Leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15, n.11, p. 1711-1714, 2008.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; KO, A.I. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**. 2003.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, n. 5, p. 376-86. 2005.