

## AVALIAÇÃO DE LIPL32 E LIGB NO DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE CANINA ATRAVÉS DE ELISA

**COLONETTI, Karina<sup>1,3</sup>; FELIX, Samuel Rodrigues<sup>2,4</sup>; SANTOS, Carolina Ximendes<sup>1,2</sup>; SILVA, Everton Fagonde<sup>3</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antonio<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Curso de Graduação em Biotecnologia;. kcolonetti@gmail.com

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Veterinária

<sup>3</sup> Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária

<sup>4</sup>Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – CDTec – UFPEl

### 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de distribuição mundial, causadora de prejuízos na produção animal e na saúde humana (Adler; Moctezuma, 2010). É uma das zoonoses de maior impacto, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com clima tropical e subtropical (Ko et al., 2009). O agente etiológico da leptospirose, *Leptospira* spp., é uma bactéria similar às Gram negativas, possui 20 espécies classificadas em 24 sorogrupos e mais de 250 sorovares (Cerqueira; Picardeau, 2009). O patógeno é mantido no ambiente por hospedeiros reservatórios suscetíveis, espécies que albergam determinados sorovares, sem que estes causem doença grave, tornando-se portadores renais crônicos e disseminadores da bactéria no ambiente (Ko et al., 2009).

Cães são considerados hospedeiros naturais do sorogrupo Canicola; entretanto, podem sofrer infecção por outros sorovares. A manifestação clínica da leptospirose em cães é semelhante à de humanos. Pode ocorrer de forma aguda, envolvendo vários órgãos, como rins e fígado, causando icterícia e hemorragias nos casos mais severos (Bharti et al., 2003; Gouveia et al., 2008) ou de forma crônica, onde os animais carregam as leptospirosas de forma assintomática ou com sintomatologia branda, disseminando o patógeno no ambiente por vários meses (André-Fontaine, 2006). Estudos revelam que cães constituem um significativo fator de risco para a leptospirose humana (Douglin et al., 1997, Avila et al., 1998)

A resposta imune à leptospirose é mediada por anticorpos (Adler et al., 1977, Ko et al., 2009). Os anticorpos contra *Leptospira* são detectáveis a partir de cinco dias após a infecção e, através da detecção destes, a doença pode ser diagnosticada. O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o teste padrão ouro para o diagnóstico de leptospirose, recomendado pela organização mundial da saúde (OMS) (Adler e Moctezuma, 2010; Faine, 1999). Os anticorpos produzidos pelo sistema imune são majoritariamente contra lipopolisacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das leptospirosas. Entretanto, os anticorpos anti-LPS são limitados a sorovares homólogos. Desta forma, testes de diagnóstico e vacinas usando antígenos protéicos conservados entre sorogrupos têm sido buscados (Ko et al., 2009). Proeminente entre as proteínas da membrana externa, está a LipL32, mais abundante proteína encontrada em leptospirosas patogênicas e reconhecida durante a infecção em humanos. Ensaios para o diagnóstico da leptospirose canina usando essa proteína já foram propostos (Dey et al., 2004); entretanto, a incapacidade de reproduzir os resultados destes autores levou à busca de novos antígenos proteicos para serem utilizados como ferramenta de diagnóstico e, futuramente, como alvo vacinal.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar que cães positivos para leptospirose, podem não apresentar anticorpos anti-LipL32, propondo LigB como antígeno alternativo para testes de diagnóstico para cães.

## 2 METODOLOGIA

Os antígenos recombinantes rLigB e rLipL32 foram produzidos por clonagem das respectivas sequências codificadoras no plasmídeo pAE e transformação em *E. coli*. As proteínas foram expressas, a purificação foi feita por cromatografia de afinidade e a quantificação pelo kit BCA<sup>®</sup> Protein Assay (PIERCE).

Neste estudo foram utilizados soros caninos sabidamente negativos (n=4) e positivos (n=8) para leptospirose (sorogrupos Icterohemorrhagie e/ou Canicola). Os soros de cães, da cidade de Pelotas e região, foram escolhidos aleatoriamente dentre o banco disponível, sendo que os positivos apresentavam títulos de 400 ou mais no MAT. Um soro de humano convalescente foi utilizado como controle positivo das reações.

As proteínas rLigB e rLipL32, bem como células inteiras de *L. interrogans*, inativadas por calor, foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese executou-se a transferência das proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas a 4°C com solução de leite em pó desnatado 5% em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), e lavadas três vezes com PBS+Tween. As membranas foram então incubadas com os soros caninos ou humano diluídos 1:50 e 1:100 em PBS, respectivamente, à temperatura ambiente, sob agitação. Após nova lavagem, as membranas foram incubadas com anti-IgG canino ou anti-IgG humano conjugado com peroxidase (SIGMA), em uma diluição de 1:6000. Procederam-se novas lavagens e posterior revelação.

Para o ELISA, procedeu-se conforme Dey e colaboradores (2004). Brevemente, os poços das placas foram sensibilizados com rLipL32 ou rLigB à uma concentração de 50 ng/poço e os soros utilizados em uma diluição de 1:500. Todos os procedimentos foram conduzidos conforme descrito. Para este ensaio utilizou-se os mesmos soros positivos usados no *Western blot*, com a inclusão de quatro soros negativos para aferir se há discriminação entre positivos e negativos. Foram considerados positivos soros cujas leituras de densidade óptica (DO) foram maiores que o valor médio obtido para os soros negativos mais duas vezes o desvio padrão.

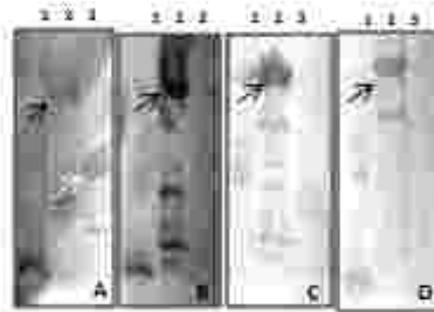
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção das proteínas recombinantes foi realizada com sucesso. As reações de *Western blot* demonstram que todos os cães convalescentes testados apresentavam anticorpos contra a proteína rLigB, a exceção de um. Apenas o animal que não teve reação contra rLigB apresentou anticorpos para rLipL32. O resultado representativo pode ser observado na Fig. 1.

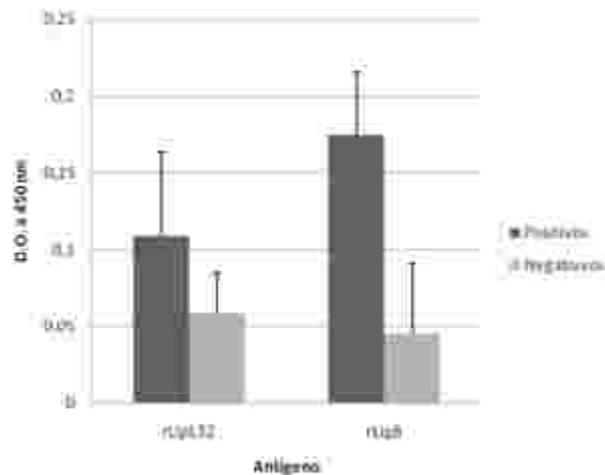
Os resultados gerais do ELISA podem ser observados na Fig. 2. Todos os soros que haviam reagido contra rLigB no *Western blot* foram positivos no ELISA com esse antígeno. O soro reagente contra rLipL32 no *Western blot* foi negativo no ELISA com rLigB, sendo o único positivo no ELISA contra rLipL32.

A proteína LipL32 é um dos antígenos mais promissores no desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos para leptospirose humana, pois é conservada entre os diferentes sorovares (Ko et al., 2009). Entretanto, nossos resultados demonstram que nem todos os animais apresentam anticorpos contra este antígeno. Dey e colaboradores (2004) propuseram um ELISA para o diagnóstico da leptospirose canina usando LipL32 como único antígeno; entretanto seus resultados não foram repetidos em nosso laboratório. Soro de animais positivos pelo MAT falharam em reagir no ELISA utilizando LipL32, o que nos estimulou a buscar antígenos mais eficientes. A proteína LigB, assim como a LipL32, é

conservada entre as espécies patogênicas de *Leptospira*, além de ser expressa e reconhecida durante a infecção em humanos (Cerqueira; Picardeau, 2009; Adler e Moctezuma, 2010) o que a torna uma atraente alternativa à LipL32.



**Figura 1.** *Western blot* utilizando soro positivo para leptospirose e antígenos recombinantes (4 de 9 ensaios). Colunas 1, *Leptospira interrogans*; 2, rLigB; 3, rLipL32. Membrana A, controle positivo (soro humano convalescente); B, C e D, Soros caninos positivos. Seta preta indica reação com rLigB e seta branca indica reação com rLipL32.



**Figura 2.** ELISA utilizando rLipL32 ou rLigB. Valores médios das densidades ópticas obtidas para soros caninos positivos e negativos.

Os valores de densidade óptica apresentados no ELISA, apesar de significativos, foram baixos. Este ensaio deve ser otimizado através de ajustes na concentração dos antígenos, diluições e tempos de incubação, antes que possa ser validado para uso diagnóstico. Aparentemente, um maior número de animais apresenta anticorpos contra rLigB do que contra rLipL32. A constatação de que alguns animais apresentam anticorpos apenas contra um ou outro antígeno, sugere que a combinação dos dois antígenos pode resultar em um teste mais sensível.

#### 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho encontramos maior reatividade de soros caninos contra rLigB do que contra rLipL32 tanto em ensaios de *Western blot* quanto em ELISA. O pequeno número de soros avaliados em nosso estudo não valida o ELISA como teste diagnóstico a ser usado na rotina. A otimização deste ensaio está em andamento, o que possibilitará a validação do mesmo para diagnóstico sorológico de leptospirose canina.

## 5 REFERÊNCIAS

- ADLER, B; FAINE, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral Infections. **Infection and immunity**, Estados Unidos, v. 17, n. 1, p. 67-72, 1977.
- ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis—do we have a problem?. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 19–24, 2006.
- AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S. ; BROD, C. S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.107-110, 1998.
- BHARTI A.; NALLY J.; RICARDI, J.; MATTHIAS M.; DIAZ M.; LOVETT M.; LEVETT P.; GILMAN R.; WILLIG M.; GOTUZZO E.; VINETZ J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance, **Lancet Infectious Diseases**, Amsterdam, v.3, p. 757–771, 2003.
- CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.9, p.760-768, 2009.
- DEY, S.; MOHAN, C. M.; KUMAR, T. M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A. M.; NACHIMUTHU, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v.103, n.1-2, p.99-106, 2004.
- DOUGLIN, C. P.; JORDAN, C.; ROCK, R.; HURLEY, A.; LEVETT, P. N. Risk factors for severe leptospirosis in the Parish of St. Andrew, Barbados. **Emerging Infectious Disease**, Estados Unidos, v.3, n.1, 1997.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, Austrália: MediSci, v. 2 p. 272, 1999.
- GOUVEIA, E.L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A.L.; AIRES, T.S.; VILLASBOAS-BISNETO, J.C.; QUEIRROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO, K.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Estados Unidos, v.14, p. 505–508, 2008.
- KO, A. I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 7, p. 736-747, 2009.
- LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 14, n.2, p. 296–326, 2001.