

## **AValiação de Proteínas de Membrana Externa de Leptospiras Patogênicas para o Diagnóstico da Leptospirose Suína**

**LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos<sup>1</sup>; XAVIER, Marina Amaral<sup>1</sup>; HARTWIG, Daiane<sup>2</sup>; SEIXAS, Fabiana<sup>3</sup>; HARTLEBEN, Cláudia Pinho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunodiagnóstico; de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. <sup>2</sup>Laboratório de Vacinologia; de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. <sup>3</sup>Laboratório de Genômica Funcional; de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. fehleal@yahoo.com.br

### **1 INTRODUÇÃO**

Espiroquetas são agentes etiológicos de doenças de importância humana e animal. Dentre elas, a leptospirose é caracterizada como uma infecção de caráter emergente e reemergente. A leptospirose suína é uma importante causa de prejuízos à suinocultura, ocorrendo em todas as partes do mundo. Aborto, morte ou nascimento de leitões fracos ou doentes, que aparecem dias após a infecção, são freqüentemente os primeiros sinais dessa doença (FAINE et al., 1999). O principal dano econômico desta zoonose está relacionado, principalmente, às criações industriais no Brasil, Nova Zelândia, Argentina e no hemisfério Norte (MAILLOUX et al., 2001; CLARK et al., 1996).

O diagnóstico padrão da leptospirose, a soroaglutinação microscópica (MAT), apesar de possuir alta especificidade, é um teste pouco sensível que necessita de profissionais treinados. Além disso, é laborioso devido à exigência do cultivo permanente de leptospiras e a manutenção da virulência das cepas. (ADLER e FAINE, 2010; FAINE et al., 1999).

Na última década várias proteínas de superfície foram identificadas e caracterizadas visando o desenvolvimento de testes diagnósticos sensíveis, específicos e de fácil realização (ADLER e FAINE, 2010). Entre estas, a proteína membrana externa (PME) LipL32 é um alvo promissor pois está presente em todos os sorovares patogênicos e ausente nas saprófitas (CULLEN et al. 2002). LipL32 é uma proteína altamente conservada e a mais abundante PME de leptospiras patogênicas, tendo sido reconhecida por 95% dos soros obtidos de pacientes com leptospirose, sugerindo um papel importante durante a infecção (CHAEMCHUEN et al., 2011; GUERREIRO et al., 2001). Além disto, já foi descrita em ensaios ELISA para o diagnóstico da leptospirose humana (FLANERY et al., 2001), canina (DEY et al., 2004) e bovina (BOMFIM et al., 2005). LigA e LigB são proteínas da superfamília das imunoglobulinas, presentes apenas em sorovares patogênicos, envolvidas na adesão celular (LUCAS et al., 2011; MONTE et al., 2011) tendo sido avaliada no diagnóstico de leptospirose humana (CRODA et al., 2007; SRIMANOTE et al., 2007) e bovina (SANKAR et al., 2010). Contudo, a utilização das proteínas rLipL32, rLigAni e rLigrep ainda não foram avaliadas para o diagnóstico da leptospirose suína.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi utilizar as proteínas LipL32, LigAni e LigB, em suas formas recombinantes, em ensaios imunoenzimáticos visando o diagnóstico da leptospirose suína.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), microplacas de 96 cavidades (Polysorp, Nunc) foram sensibilizadas com diferentes concentrações de rLipL32, rLigAni e rLipBrep produzidas em *E. coli* e rLipL32 produzida em *P. pastoris* diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,8 por 16h a 4°C e bloqueadas com PBS contendo 10% de leite em pó. Após, foram adicionados os soros positivos e negativos, diluídos 1:100 em tampão PBS 0,5% Tween 20 (PBS-T), previamente testados através da MAT, totalizando 86 amostras. Após, foi adicionado conjugado anti-Ig suíno e peroxidase (Sigma), seguido de solução substrato cromógena contendo peróxido de hidrogênio (0,1%) e ortophenylendiamine (Sigma-Aldrich, USA) em 0,2 M tampão citrato-fosfato pH 4,0 por 15 min. a temperatura ambiente. Os períodos de incubação de soros e conjugados foram de 1h a 37 °C e as lavagens das placas com PBS-T. A leitura foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro (VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, USA). Os pontos de corte para cada proteína testada foram obtidos pela absorbância (ABS) encontrada ao adicionar-se um pool de soros suínos negativos na MAT, diluídos 1:100 a totalidade de placas contendo as proteínas imobilizadas. Estes experimentos foram realizados 3 vezes para cada proteína testada. A sensibilidade e a especificidade dos ensaios ELISA rLipL32 *P.pastoris* e *E.coli*, rLigAni e rLipBrep estes foram comparados a MAT através de uma tabela de contingência 2x2 sendo a Sensibilidade (S), a Especificidade (E) e a Acurácia (A) obtidas por  $S = a/a+c \times 100$ ,  $E = d/b+d \times 100$  e  $A = a+d/a+b+c+d \times 100$ , respectivamente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as concentrações das proteínas testadas foi escolhida a de 100 ng de proteína por poço. O ponto de corte em ABS foi determinado como sendo de 0,222 (rLipL32 *E.coli*), 0,193 (rLipL32 *P.pastoris*), 0,150 (rLigBrep) e 0,250 (rLigANI), obtido pela média das absorbâncias do pool de soros negativos acrescido de 2 desvios padrões.

A sensibilidade e especificidade dos ensaios utilizando a proteína rLipL32 *E.coli* foi de 100% e 85,10% (Tabela 1) e 100% e 91,48% (Tabela 2) para rLipL32 *P.pastoris*; quando comparadas a MAT.

**Tabela 1.** Anticorpos anti-Leptospira detectados em soro de suínos por ELISA rLipL32 *E.coli* comparado a MAT.

<i>rLipL32/ELISA</i>	<b>MAT</b>		<b>Total</b>
	Positivo	Negativo	
<i>E.coli</i>			
Positivo	39	7	46
Negativo	0	40	40
<b>Total</b>	39	47	86

Sensibilidade = 100 %; Especificidade = 85,10 %; Acurácia = 91,86 %

A sensibilidade encontrada utilizando-se o antígeno rLipL32 *E.coli* é igual a descrita para a espécie bovina (BOMFIM et. al., 2005) e maior do que a relatada ao serem testados soros de caninos (DEY et. al., 2005). Para as proteínas rLigBrep e rLigAni obteve-se 60% e 85,9%; e 82% e 55,5% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. A acurácia dos ELISA rLigBrep e ELISA rLigA obtidas neste estudo foram inferiores aquelas descritas para soros da espécie bovina com a rLigBrep (SANKAR et al. 2010) e espécie humana para as duas proteínas (CRODA et al., 2007; SRIMANOTE et al. 2008).

**Tabela 2.** Anticorpos anti-Leptospira detectados em soro de suínos por ELISA rLipL32 *P.pastoris* comparado a MAT.

<i>rLipL32/ELISA</i> <i>P.pastoris</i>	MAT		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	39	4	43
Negativo	0	43	43
<b>Total</b>	39	47	86

Sensibilidade = 100 %; Especificidade = 91,48%; Acurácia = 95,34%

Dentre as proteínas de membrana externa avaliadas, a proteína que apresentou a melhor acurácia quando comparada a MAT foi rLipL32 *P.pastoris* (95,5%) e apesar de sua idêntica sensibilidade a rLipL32 *E.coli*, esta última apresentou menor especificidade comparada a MAT resultando na acurácia de 91,86%. A utilização do sistema eucarioto *P.pastoris* para expressão de proteínas heterólogas foi citado como promissor, uma vez que estes organismos podem realizar mudanças pós traducionais às proteínas produzidas, o que resulta em produtos proteicos com maior similaridade as proteínas nativas do que aqueles obtidos de sistemas procariotos (HARTWIG et al., 2010).

#### 4 CONCLUSÃO

A proteína rLipL32 produzida no sistema de expressão *P. pastoris* pode ser utilizada em ensaio ELISA para triagem de soros no diagnóstico de leptospirose suína.

#### 5 REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PENA, FAINE, S. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p.287- 296, 2010.
- BHARADWAJ, R. Leptospirosis – a reemerging disease? **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, n. 3, p. 136-138, 2004.
- CHAEMCHUEN, S., RUNGPRAGAYPHAN, S., POOVORAWAN, Y., PATARAKUL, K. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer

membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. **Vet Microbiol**, v. 21, p. 178-185, 2011.

CLARK, L.K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.447- 454, 1996.

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. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

CULLEN, P. A., CORDWELL, S. J., BULACH, D. M., HAAKE, D. A., ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infect Immun**, v. 70, n. 5, p. 2311-2318, 2002.

DEANNA, S., DEVESON, L., CULLEN, P. A., LO, M., SRIKRAM A., SERMSWAN R. W., ADLER, B. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, p. 3413-3418, 2011.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. A., PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne, Australia, 1999

HARTWIG, DAIANE D ; OLIVEIRA, THAÍS L ; SEIXAS, FABIANA K ; FORSTER, KARINE M ; RIZZI, CAROLINE ; HARTLEBEN, CLÁUDIA P ; MCBRIDE, ALAN JA ; DELLAGOSTIN, ODIR A. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 98, 2010.

GUERREIRO, H., CRODA, J., FLANNERY, B., MAZEL, M., MATSUNAGA, REIS, M. G., *et al.* Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans **Infect Immun**, v. 69, p. 4958-4968, 2001.

MAILLOUX, M. Leptospiroses=Zoonoses. **International Journal of Zoonosis**, v.78, p.1158 -1159, 2001.

MONTE, L. G., CONCEIÇÃO F. R., COUTINHO, M. L., SEIXAS, F. K., SILVA É. F., VASCONCELLOS, F. A., CASTRO, L. A. S. de, HARTLEBEN, C. P., DELLAGOTIN, O. A., ALEIXO, J. A. G. Monoclonal antibodies against the leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B conserved regions. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, p. 441-446, 2011.

SANKAR, S., HARSHAN, H. M., SOMARAJAN, S.R., SRIVASTAVA, S.K. Evaluation of a recombinant LigB protein of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 375-378, 2010.

SRIMANOTE, P., WONGDEETHAI, N., JIEANAMPUNKUL, P., SAMONKIERT, S., LEEPIYASAKULCHAI, C., KALAMBAHETI, T., PRACHAYASITTIKUL, V. Recombinant ligA for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. **J Microbiol Methods.**, v. 72, n. 1, p. 73-81, 2008.