

## PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CONJUGADO PARA UTILIZAÇÃO EM POLARIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA (FPA) PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE

**LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos<sup>1</sup>; SINNOTT, Francine Alves; SEIXAS, Fabiana Kömmling<sup>2</sup>; DELLAGOSTIN, Odir<sup>2</sup>; HARTLEBEN, Cláudia Pinho<sup>1,3</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunohistoquímica – <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Centro de Biotecnologia – UFPel

<sup>3</sup>Faculdade de Veterinária – Departamento de Veterinária Preventiva – UFPel  
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.  
Universidade Federal de Pelotas  
fehleal@yahoo.com.br

### 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma infecção/doença causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. As leptospirosas patogênicas são identificadas e distribuídas em 8 diferentes espécies e mais de 200 sorovares de leptospirosas patogênicas foram identificadas até o presente (FAINE, 1999). A leptospirose é uma zoonose importante em saúde pública e possui grande importância na criação de bovinos, pois compromete os níveis de produtividade dos rebanhos afetados, devido a abortos, retenção de placenta, nascimentos prematuros, morte, infertilidade, decréscimo na produção de leite e mastite (LANGENEGGER, 1990; ELLIS, 1984).

Os anticorpos contra *Leptospira* são detectáveis a partir de cinco dias após a infecção e, através desses anticorpos, a doença pode ser indiretamente diagnosticada, através de técnicas de imunodiagnóstico, como os ensaios enzimáticos (ELISA), imunofluorescência indireta, e aglutinação microscópica (MAT) (WHO, 2003).

O MAT é o teste padrão para o diagnóstico de leptospirose, seja humana ou animal, e detecta anticorpos circulantes no soro através da reação com diferentes sorovares de leptospirosas. O MAT possui alta especificidade, porém baixa sensibilidade devido à impossibilidade do uso de todos os sorovares até o momento identificados. Além disso, é uma técnica laboriosa, necessitando o cultivo permanente no laboratório e a manutenção da virulência de cepas, através da inoculação periódica em modelos biológicos e requerer profissionais treinados para realização da leitura comparativa com sorovares controles (ADLER e FAINE, 2010; FAINE, 1999).

Por estes motivos, novas metodologias de diagnóstico têm sido propostas utilizando métodos mais sensíveis e alvos de diagnóstico específicos, entre estes proteínas de membrana da bactéria, conservadas em espécies patogênicas e ausentes em cepas saprófitas (HAAKE *et al.*, 2000). Entre os alvos de diagnóstico para detecção de anticorpos no soro de animais infectados, uma proteína de membrana denominada LipL32 mostrou-se promissora por ser abundante na superfície da bactéria, e por sua característica imunogênica e antigênica (DEY *et al.*, 2007; BOMFIM; KO; KOURY, 2005; McBRIDE *et al.*, 2005; DEY *et al.*, 2004;).

Entre as novas metodologias de diagnóstico, a polarização da fluorescência (FPA) foi utilizada para o diagnóstico de brucelose (NIELSEN *et al.*, 2000), outra zoonose importante que acomete a população de bovinos, sendo esta recomendada pela organização internacional de epizootias (OIE, 2008). A metodologia FPA vem

de encontro ao teste padrão MAT, por ser um teste rápido, baseado no uso de um antígeno marcado com fluoróforo e possibilidade de utilização de uma máquina leitora de precisão.

Devido ao exposto, o objetivo deste trabalho foi produzir um insumo imunobiológico, composto da proteína LipL32 em sua forma recombinante (rLipL32) conjugada ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e avaliar sua utilização como insumo diagnóstico na metodologia de FPA para diagnóstico da leptospirose bovina.

## 2 METODOLOGIA

O gene *LipL32* foi amplificado por PCR, ligado ao vetor de expressão pAE (Invitrogen) e clonado em *E.coli*. O DNA plasmidial de possíveis clones recombinantes foram identificados em uma triagem rápida, e sua confirmação se deu pela extração e digestão do mesmo com enzimas de restrição. A proteína foi purificada em um sistema de cromatografia de afinidade utilizando Ni<sup>2+</sup>-Sephrose, através do sistema de cromatografia líquida de baixa pressão AKTAPrime (Amersham Biosciences). As eluições coletadas foram submetidas a um SDS-PAGE 12 % para avaliar a purificação da proteína recombinante e a possível presença de proteínas inespecíficas. Os lotes de proteína recombinante foram quantificados pelo método de Bradford e estocados para utilização em DotBlot e conjugação com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC).

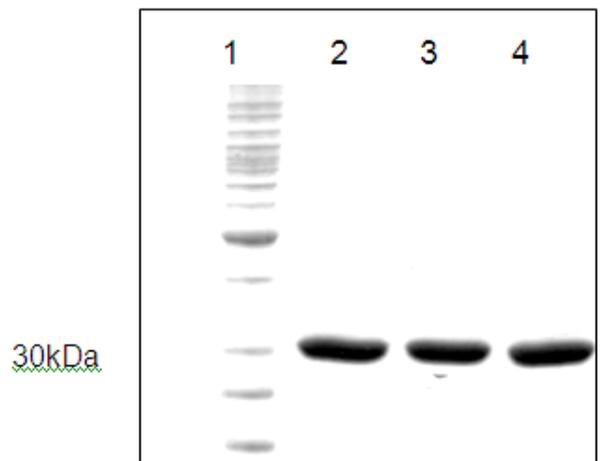
Os soros bovinos reagentes e não reagentes no teste de aglutinação microscópica (MAT), realizada conforme Faine 1999, foram submetidos à reação com a proteína rLipL32 em membranas de nitrocelulose para identificação de soros reagentes e não reagentes (DotBlot) com a proteína LipL32. Após o DotBlot, uma alíquota de cada soro positivo foi utilizada para formar um pool de soros positivos. O mesmo procedimento foi realizado com soros negativos.

Uma alíquota de proteína rLipL32 foi utilizada para conjugação com FITC, conforme descrito por NASREEN *et al.*, 1999. A purificação da proteína marcada foi realizada em coluna de Sephadex G-25 (Pharmacia) e as frações eluídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e visualizadas sob luz UV em transiluminador.

Um lote de rLipL32 marcada com FITC (FITC/rLipL32) foi utilizado como marcador para padronização da polarização da fluorescência utilizando pool de soros bovinos positivos e negativos em diferentes diluições.

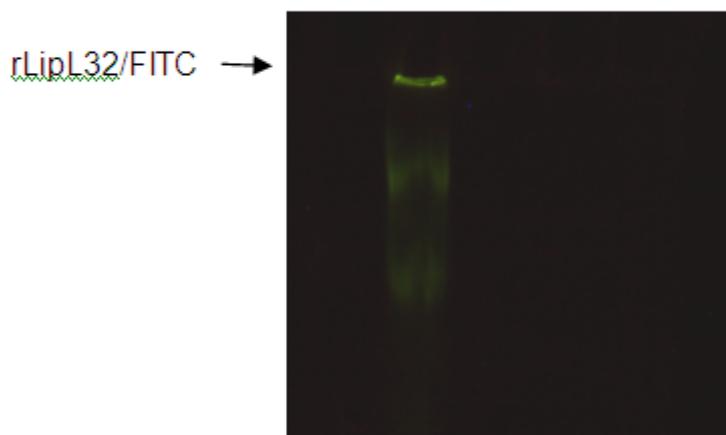
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A clonagem do gene *LipL32* foi eficiente e a transformação em *E. coli* TOP10 *f* com os produtos da ligação resultaram em vários transformantes. O clone recombinante selecionado recebeu o nome de pAE/*lipL32*. Na Figura 1 pode-se visualizar um gel de poliacrilamida 12 % com amostras dos lotes da proteína recombinante, purificada por cromatografia de afinidade.



**Figura 1.** Gel de poliacrilamida a 12% corado com azul de Coomassie mostrando os lotes de purificações da proteína rLipL32. Coluna 1- BENCHMARK™ Protein Ladder Coluna 2, 3 e 4- Frações eluídas de rLip32 .

A produção de lotes do conjugado rLipL32/FITC foi possível e confirmada pela visualização da proteína fluorescente, sob luz UV em transiluminador, conforme demonstrado na figura 2. Desse modo, pode-se observar que a conjugação da proteína recombinante com o fluoróforo FITC foi possível.



**Figura 2.** Eletroforese em Gel de poliacrilamida a 12% do conjugado rLipL32/FITC visualizado sob luz Ultravioleta em transiluminador.

Ao avaliar a reatividade do conjugado rLipL32/FITC com soros bovinos positivos e negativos, detectou-se uma leitura média de 112 mP em reação com pool de soros negativos e 196 mP em reação com pool de soros positivos, utilizando a diluição 1:100. Quando o conjugado foi submetido individualmente a polarização, apresentou uma leitura média de 98 unidades de milipolarização (mP).

#### 4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a preparação do conjugado foi eficiente, visto que apenas uma banda referente à rLipL32/FITC foi visualizada, correspondendo ao peso molecular da proteína LipL32. Sua aplicação como insumo diagnóstico é

promissora, uma vez foi possível identificar diferença na polarização fluorescente entre pool de soros positivos e negativos na MAT e DotBlot.

Este conjugado será utilizado na metodologia de FPA para reação com banco de soros positivos e negativos na MAT e então avaliada sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico de leptospirose bovina.

## 5 REFERÊNCIAS

- ADLER B, DE LA PENA MA. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140, p.287-296, 2010.
- BOMFIM, M. R.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.1-2, p.89-94, 2005.
- DEY, S.; MADHAN, M. C.; RAMADASS, P.; NACHIMUTHU, K. Recombinant antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of leptospirosis. **Veterinary research communications**, v.31, n.1, p.9-15, 2007.
- 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**, v.103, n.1-2, p.99-106, 2004.
- ELLIS, W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.411- 422, 1984.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A. & PEROLAT, P. (1999) *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia.
- HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.
- LANGENEGGER, J. Aborto causado por leptospirosas-diagnóstico e medidas de controle da leptospirose em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, n.1/2, p.4-5, 1990.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, n.5, p.376-386, 2005.
- NIELSEN, K.; LIN, M.; GALL, D.; JOLLEY, M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. **Methods** v. 22, p. 71–76, 2000.
- World Health Organization (WHO) **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**, 2003.
- World Organization for Animal Health (OIE). **Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2008. <http://www.oie.org>