

COMPARAÇÃO DA PROTEÍNA rLipL32 PRODUZIDA EM DOIS SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE SUÍNA

LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos¹; HARTWIG, Daiane²; SÁ, Gizele Lima¹; SEIXAS, Fabiana³; HARTLEBEN, Cláudia Pinho¹

¹Laboratório de Imunodiagnóstico, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas; ²Laboratório de Biologia Molecular Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas; ³Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas
claudia.hartleben@pq.cnpq.br

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma importante causa de prejuízos a 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, à criações industriais no Brasil, Nova Zelândia, Argentina e no hemisfério Norte (MAILLOUX et al., 2001; CLARK et al., 1996).

A soroaglutinação microscópica (MAT), diagnóstico padrão da leptospirose, 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).

Diante dos problemas que se apresentam no diagnostico laboratorial dessa doença, há um relevante esforço de pesquisa relacionada a utilização de proteínas recombinantes para o desenvolvimento testes diagnósticos mais sensíveis.

Na última década, várias proteínas de superfície foram identificadas e caracterizadas, incluindo as lipoproteínas da membrana (OMP) LipL36, LipL41, LipL32. A LipL32 é o antígeno mais abundante encontrado no perfil protéico total de leptospiras, além de ser altamente conservada entre espécies de *Leptospira* patogênica, e não possuir ortólogos nas saprófitas *Leptospira biflexa* (ADLER et al., 2011; HAAKE et al., 2010; HAAKE et al., 2000). Sua forma recombinante tem sido utilizada em diversos testes diagnósticos para leptospirose como para humanos, bovinos e caninos (DEY et al., 2008; BONFIM et al., 2005; DEY et al., 2004).

A bactéria *Escherichia coli* tem sido muito utilizada para a expressão de proteínas heterólogas. Porém, algumas limitações como a falta de dobramento, modificações pós-traducionais da proteína recombinante e a baixa produção acarretam em um aumento significativo de custos. A cepa da levedura *Pichia pastoris* vem sendo utilizada como um sistema de expressão simples e barato para a produção de proteínas recombinantes heterólogas, tendo como características a capacidade de promover modificações pós-traducionais, secretar proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, além de alto rendimento. (HARTWIG et al., 2010).

Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência da rLipL32 produzida em dois sistemas de expressão, *E. coli* e *P. pastoris* para diagnóstico da leptospirose suína através de ELISA indireto.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), microplacas de 96 cavidades (Polysorp, Nunc) foram sensibilizadas com diferentes concentrações de rLipL32 produzida em *E. coli* e em *P. pastoris* em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,8 por 16h a 4° e bloqueadas com PBS contendo 10% de leite em pó. Para identificação do ponto de corte dos ensaios um pool de soros suínos livre de patógenos foi adicionado às placas e incubado por 1h a 37°C. Após, foi adicionado o conjugado anti-Ig suíno e peroxidase (Sigma), incubado a 37°C por 1h e após a lavagem, foi adicionada solução substrato/cromógena contendo ortophenylendiamine (Sigma-Aldrich, USA) e peróxido de hidrogênio (0,1%) em 0,2 M tampão citrato-fosfato pH 4,0 por 15 min. a temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm (VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, USA). Para avaliar a sensibilidade e especificidade do teste com as diferentes proteínas, 103 soros suínos já caracterizados no MAT foram utilizados em um título de 100.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as concentrações de proteína rLipL32 *E.coli* e rLipL32 *P.pastoris* para sensibilização das placas, foi escolhida a de 100 ng de proteína por poço, pois não houve diferença de absorbância (ABS) entre as concentrações testadas. O ponto de corte, determinado com o *pool* de soros suínos livre de patógenos (D.O. \pm desvio padrão) foi de 0,193.

A sensibilidade do teste foi de 82% para as duas proteínas testadas, porém, a especificidade foi de 91% para o rELISA com a rLipL32 produzida em *P. pastoris* e de 72,13% para a rLipL32 produzida em *E.coli*. Esta diferença provavelmente é possível devido a glicosilação dessa lipoproteína quando expressa pela *P. pastoris* (HARTWIG et al., 2010). A *P. pastoris* é um microorganismo unicelular capaz de muitas das modificações pós-traducionais realizadas por células eucarióticas superiores, como o processamento proteolítico, dobramento, formação da ligação dissulfeto, e glicosilação. Assim, muitas proteínas que acabam resultando em corpos de inclusão inativas em sistemas bacterianos são produzidos como moléculas biologicamente ativas. O sistema *P. pastoris* também é geralmente considerado como sendo mais rápido, mais fácil e menos dispendioso do que outros sistemas de expressão derivados de eucariotos superiores (CREGG et al., 2000).

Os resultados obtidos indicam que o ELISA/rLipL32 *P. pastoris* pode ser usado como um teste de triagem no diagnóstico da leptospirose suína pois possui alta sensibilidade em relação ao MAT e especificidade superior ao ser comparada com o sistema *E.coli*.

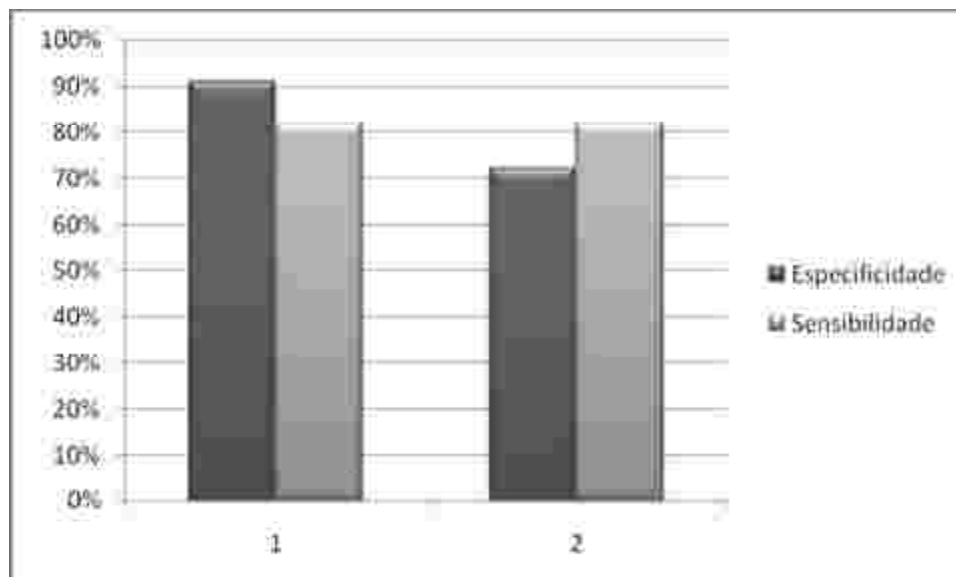


Figura 1. Gráfico representativo da especificidade e sensibilidade da proteína rLipL32 nos sistemas de expressão heterólogos *E.coli* e *P.pastoris* avaliados em ELISA indireto para diagnóstico de leptospirose suína. 1- ELISA/rLipL32 *P. pastoris*; 2- ELISA/rLipL32 *E.coli*.

4 CONCLUSÃO

A proteína rLipL32 produzida no sistema de expressão *P. pastoris* mostrou maior especificidade no ELISA para o diagnóstico de leptospirose suína ao ser comparada com o sistema *E.coli*, podendo ser utilizada em testes de triagem para o diagnóstico da leptospirose suína.

5 REFERÊNCIAS

ADLER, B., LO, M., SEEMANN, T., MURRAY, G. L., Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, In press, 2011.

ADLER, B.; DE LA PENA, M. A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p.287- 296, 2010.

BOMFIM, M. R. Q., 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, p. 89 – 94, 2005.

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

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 23 – 52, 2000.

DEY, S., MOHAN, C. M., RAMADASS, P., NACHIMUTHU, K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 172 – 177, 2008.

DEY, S., MOHAN, C. M., KUMAR, S. T. M. A., RAMADASS, P., NAINAR, M. A., NACHIMUTHUB, K. 2004. Recombinant LipL32 antigenbased single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 103, p. 99 - 106, 2004.

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

HAAKE, D., MATSUNAGA, J., *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **MicroReview Molecular Microbiology**, v. 77, p. 805 – 814, 2010.

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, p. 2276 – 2285, 2000.

HARTWIG, D. D., OLIVEIRA, T. L., SEIXAS, F. K., FORSTER, K. M., RIZZI, C., HARTLEBEN, C. P., MCBRIDE, A. JA., DELLAGOSTIN, O. A. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v.9, p. 98 - 104, 2010.

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