

APLICAÇÃO DA PROTEÍNA *ErpY-like* EM IgG-ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM HUMANOS

THAYNÁ LANER CARDOSO¹; STELLA BUCHHORN DE FREITAS²; HENRIQUE
QUEIROZ SIMÃO³; ILANA TERUSZKIN BALASSIANO⁴; MARTA GONÇALVES
AMARAL⁵; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – stellafreitas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - henrique15@gmail.com

⁴Fundação Oswaldo Cruz - ilana@ioc.fiocruz.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - martagamaral@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antroponose difundida mundialmente, muito comum em regiões tropicais e em países em desenvolvimento, acometendo animais domésticos, silvestres e também humanos (BHARTI *et al.*, 2003). Em humanos, a infecção é decorrente do contato direto ou indireto com a urina de roedores, os quais são os principais disseminadores de leptospirosas patogênicas (MUSSO & LA SCOLA, 2013).

A doença é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, que são bactérias Gram-negativas, aeróbias estritas e móveis, devido a presença de um par de flagelos em sua extremidade (LEVETT, 2001). Esse gênero possui cerca de 30 espécies, com mais de 300 sorovares, sendo 270 patogênicos (PICARDEAU, 2017; THIBEAUX, 2018). A principal espécie que acomete humanos é *L. interrogans* (OLIVEIRA, ARSKY & DE CALDAS, 2013).

Atualmente, o padrão ouro para diagnóstico da leptospirose é o teste de aglutinação microscópica (MAT), método este reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BLANCO, CASSIOLATO & ROMERO, 2015). A técnica consiste em confrontar diferentes sorovares de *Leptospira* patogênicas vivas com o soro dos pacientes com suspeita de leptospirose, possibilitando assim, também identificar o sorovar causador da infecção (PELISSARI *et al.*, 2011). Contudo, esse método é laborioso e demorado, precisando da manutenção de culturas de leptospirosas vivas no laboratório e de técnicos treinados para a execução e interpretação. Além disso, pode levar a resultados errôneos em consequência de diferentes interpretações, devido à presença ou ausência das aglutininas que são detectadas pelo método (ROMERO, CALY & YASUDA, 1998).

ErpY-like é descrita como uma proteína de *L. interrogans*, possuindo semelhanças com a lipoproteína da membrana externa *ErpY* de *Borrelia burgdorferi*. Essa proteína é expressa durante a infecção *in vivo*, demonstrando seu potencial como alvo para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico. Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que *ErpY-like* protege hamsters contra infecção letal (OLIVEIRA *et al.*, 2018) e é capaz de diagnosticar a infecção em suínos, quando empregada em um teste sorológico do tipo ELISA (PADILHA *et al.*, 2019). Estes resultados encorajam o prosseguimento das pesquisas, objetivando o desenvolvimento de novos insumos para o controle da enfermidade, que sejam fáceis de utilizar pelos serviços de saúde, mais sensíveis e específicos, e que empreguem tecnologia nacional, diminuindo custos.

Diante disso, o presente estudo buscou avaliar o potencial da proteína recombinante *ErpY-like* de *L. interrogans*, no desenvolvimento de um teste do tipo

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para detecção de anticorpos IgG no soro de humanos naturalmente infectados.

2. METODOLOGIA

Produção da proteína recombinante ErpY-like: a proteína ErpY-like foi produzida conforme descrito por PADILHA et al. (2019).

Soros humanos: soros positivos e negativos utilizados nesse trabalho foram cedidos pelo Laboratório Referência Nacional de Diagnóstico de Leptospirose da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil. Essas amostras foram obtidas de pacientes dos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, Pernambuco, Distrito Federal e Rio Grande do Sul, suspeitos de estarem com leptospirose e diagnosticados por MAT. Um total 40 soros foram utilizados, 20 positivos e 20 negativos. Os soros positivos foram caracterizados de acordo com a fase da doença (convalescente) e o título de anticorpos (entre 200 e 6400).

ELISA IgG: para o ensaio de ELISA, placas de fundo chato foram sensibilizadas com a proteína ErpY-like diluída em tampão carbonato-bicarbonato (50 µl, pH 9,6). Foram utilizadas 312,5 ng de proteína por cavidade da placa. Após incubação por 1h à 37°C, as cavidades foram bloqueadas com solução de *Bovine Serum Albumin* (BSA) por 1h e 30 min à 37 °C. Posteriormente, os soros humanos foram diluídos em PBS 1X (pH 7,4) na proporção 1:50 e mantidos em contato com a proteína por 1h à 37°C. PBS 1X foi utilizado como controle negativo para o teste. Anticorpos anti-IgG humanos conjugados a peroxidase foram adicionados em uma diluição 1:10.000. As placas de poliestireno foram mantidas à 37°C por 1h. Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas quatro vezes com solução PBS-T (PBS + 0,05% *Tween* 20). A visualização do teste foi feita através da adição de tampão fosfato-citrato (pH 5,3) acrescido de 0,2 mg/mL de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) e 0,03% de H₂O₂. Uma solução 2M H₂SO₄ foi utilizada para parar a reação. A quantificação da reação foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492nm. Para análise dos resultados foi utilizado o software MedCalc® versão 8.0.0.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Os soros foram avaliados em duplicata nas placas e o experimento foi repetido três vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste ELISA desenvolvido utilizando a proteína ErpY-like exibiu um *cut-off* (ponto de corte) > 0,25, especificidade de 95,0% e sensibilidade de 100%, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2. Estes resultados foram similares aos observados por PADILHA et al., (2019), que utilizou esta mesma proteína no diagnóstico da leptospirose suína, com sensibilidade e especificidade de 96,8% e 100%, respectivamente.

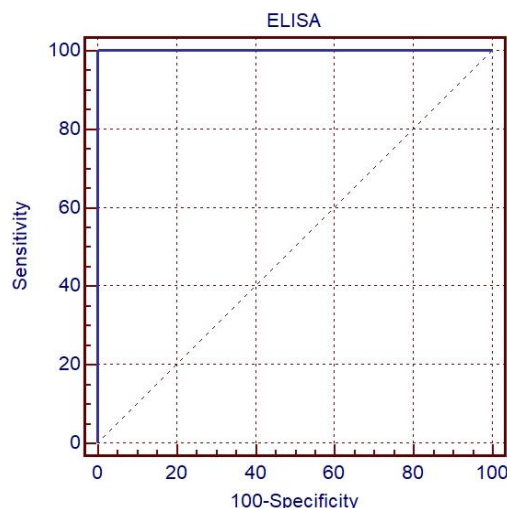


Figura 1: Curva ROC (*Receiver operating characteristics*) do ELISA IgG utilizando soros humanos.

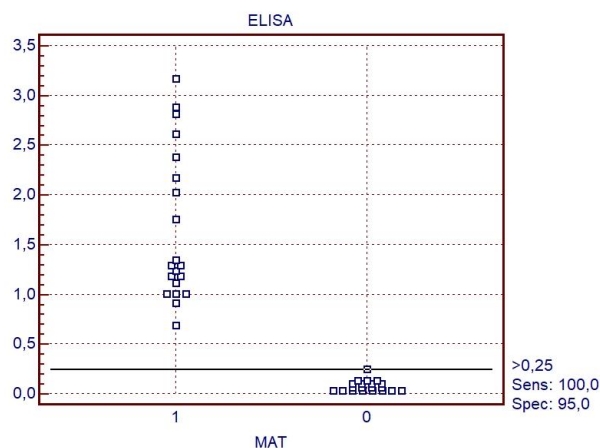


Figura 2: Agrupamento dos soros utilizados no ELISA IgG para o diagnóstico de leptospirose em humanos. Comparação dos soros testados avaliados pelo padrão-ouro (MAT), *cut-off*, sensibilidade e especificidade. Número 1 representa os soros positivos na MAT e 0 os soros negativos.

4. CONCLUSÕES

O ELISA utilizando a proteína recombinante *ErpY-like* demonstrou ser um teste promissor, pois apresentou sensibilidade e especificidade próximas de 100%. Isso indica que esta proteína foi reconhecida por anticorpos IgG dos pacientes com diagnóstico de leptospirose pela MAT, os quais apresentam soros com diferentes titulações e são originários de regiões geográficas distintas, estando, possivelmente, infectados por diferentes sorovares. Assim, a proteína *ErpY-like* destaca-se como potencial alvo para diagnóstico sorológico da leptospirose humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARTI A.R.; NALLY J.E.; RICARDI J.N.; MATTHIAS M.A.; DIAZ M.M.; LOVETT M.A.; LEVETT P.N.; GILMAN R.H.; WILLIG M.R.; VINETZ J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet, Infect. Dis**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.
- BLANCO, R.M; CASSIOLATO, A.P; ROMERO, E.C. Avaliação do teste de aglutinação microscópica utilizando-se como antígeno leptospirosas saprófitas para o diagnóstico da leptospirose humana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2, p. 90-6, 2015.
- ESHGHI, A; CULLEN, P.A; COWEN, L; ZUERNER, R.L; CAMERON, C.E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 10, p. 4564-4578, 2009.
- LEVETT PN. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- MUSSO, D; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245-252, 2013.
- OLIVEIRA, S.V; ARSKY, M.L.N.S; DE CALDAS, E.P. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. **Saúde (Santa Maria)**, v. 39, n. 1, p. 9-20, 2013.
- OLIVEIRA, T.L; SCHUCH, R.A; INDA, G.R; ROLOFF, B.C; NETO, A.C.P.S., AMARAL, M; DELLAGOSTIN, O.A; HARTWIG, D.D. LeA and ErpY-like recombinant proteins from *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge using AddaVaxTM as adjuvant. **Vaccine**, 2018.
- PADILHA, B.C.R; SIMÃO, HQ; OLIVEIRA T.L; HARTWIG, D.D. The use of ErpY-like recombinant protein from *Leptospira interrogans* in the development of an immunodiagnostic test for swine leptospirosis. **Acta tropica**, v. 193, p. 31-34, 2019.
- PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, 297-307, 2017.
- PELISSARI, D.M; MAIA-ELKHOURY, A.N.S; ARSKY, M.L.N.S; NUNES, M.L. Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 565-574, 2011.
- ROMERO, E.C; CALY, C.R; YASUDA, P.H. The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo v. 40, n. 3, p. 183-184, 1998.
- THIBEAUX R; IRAOLA G; FERRÉS I; BIERQUE E; GIRAULT D; SOUPÉ-GILBERT ME; PICARDEAU M; GOARANT C. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. **Microbial Genomics**, v. 4, 2018.
- YUSZNIAHYATI, Y; KENNETH, F.R; DAISY V.J. Leptospirosis: recent incidents and available diagnostics – a review. **Medicine Journal Malaysia**. v. 70, n. 6, p. 351-355, 2015.