

Producción, purificación y caracterización de un anticuerpo anti IgG canino como sonda en el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina

Luisana J. Fernandes¹, Marlin T. Matani¹, Olinda Delgado², Melcenia Moreno³ & Martín A. Sánchez^{3*}

La Leishmaniasis Visceral (LV) es una enfermedad parasitaria producida por protozoarios del género *Leishmania*, es endémica en muchos países a nivel mundial y representa un problema de salud pública pudiendo ser fatal si no se diagnostica y trata a tiempo. El perro doméstico es el principal reservorio de leishmanias viscerotropas en el Nuevo Mundo y juega un papel muy importante en la transmisión a humanos. Debido a esto es imperante el diagnóstico temprano de los reservorios, mediante la demostración de anticuerpos específicos en el suero con pruebas sensibles, rápidas y costo - efectivas como la ELISA, Dot-ELISA, MABA e IFI que requieren para su realización de un anticuerpo secundario. En el presente trabajo se produjo un anticuerpo anti-IgG canino conjugado con proteínas reporteras para ser evaluado en las técnicas antes mencionadas. Se demostró una mayor sensibilidad de este anticuerpo conjugado con peroxidasa en las pruebas de MABA y ELISA así como el conjugado con fluoresceína en IFI al comparar con el anticuerpo comercial. El uso de estos conjugados en el diagnóstico de la LV canina mostró ser de gran utilidad y costo efectivos si se considera que los volúmenes a preparar se pueden ajustar a los requerimientos de las diversas técnicas diagnósticas siendo altamente sensibles y económicos en comparación con los comerciales.

Palabras clave: leishmaniasis visceral, Diagnóstico, Serología.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) representa un grave problema de salud pública, es considerada la tercera enfermedad más importante que ocasiona muerte y años perdidos por discapacidad en la población mundial, precedida por malaria y tuberculosis según datos de la Organización mundial de la salud (Desjeux, 2004).

En Venezuela, desde el año 1997 hasta el 2006 se notificaron 456 casos de leishmaniasis visceral humana (LVH) en 24 estados, de los cuales, 131 (28.7%) correspondían a casos reportados en el estado

Nueva Esparta, con una tasa de incidencia de 32,70 por 100.000 habitantes (Instituto de Biomedicina. Dpto. Informática, 2006). La mortalidad en pacientes con leishmaniasis visceral (LV) fue de 7,85% durante el periodo 1995-2000 (Ortiz *et al.*, 2003).

La leishmaniasis visceral es una zoonosis producida por parásitos del género *Leishmania*, en la cual el perro doméstico constituye el principal reservorio de las especies viscerotropas (*L. infantum/chagasi*) en las Américas (Pinelli *et al.*, 1994). Erróneamente se ha considerado que solo los perros sintomáticos son infectantes para los flebotómicos (vectores del parásito), sin embargo, se ha demostrado que los perros asintomáticos también juegan un papel importante en la transmisión (Moreno & Alvar, 2002), ya que los animales infectados pueden responder ante el parásito con diferentes patrones de reacción, es decir, desarrollar una enfermedad progresiva con desenlace fatal, o ser asintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994) con la ausencia de signos clínicos aparentes

¹ Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela,

² Sección de Inmunoparasitología, Instituto de Medicina Tropical,

³ Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas 1010.

*Autor de correspondencia: martinsanchez1@gmail.com

pero potencialmente infectantes en áreas endémicas donde existe la presencia del vector. Existen suficientes evidencias que indican que siendo el principal reservorio del parásito, los perros domésticos infectados probablemente representen la mayor fuente de infección en Venezuela (Torrealba & Torrealba, 1964; Zerpa *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2004).

Zerpa *et al.* (2000), en un estudio realizado en varias comunidades en zonas endémicas del estado Nueva Esparta demostraron que el rango de infección en perros domésticos varía entre 21 y 33% de positividad. Por otra parte, estudios epidemiológicos sugieren que la mayoría de los casos de leishmaniasis canina diagnosticados en zonas no endémicas corresponden usualmente a animales que han migrado de las zonas endémicas, constituyendo un alto riesgo de propagación de la enfermedad hacia zonas no endémicas.

En este sentido se hace imperioso el diagnóstico temprano de leishmaniasis visceral en perros tanto en zonas endémicas como en puntos de entrada a zonas no endémicas.

Este diagnóstico se hace mediante la demostración de anticuerpos específicos a antígenos del parásito en el suero con pruebas sensibles como el inmunoensayo ELISA frente a antígeno rK39 específico para las especies de *Leishmania* spp. que causan leishmaniasis visceral (*L. infantum*, *L. chagasi* y *L. donovani*). Una de las limitantes en esta metodología es el costo de los reactivos para la detección de anticuerpos caninos y el requerimiento de la infraestructura de un laboratorio de diagnóstico. Otras pruebas alternativas incluyen la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de multidiagnóstico (MABA), por lo que en el presente trabajo se produjo y caracterizó un anticuerpo anti IgG canino conjugado con distintas proteínas reporteras para evaluar su utilidad en las técnicas de detección antes mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunógeno

Fracción de IgG de suero obtenido de canino adulto procedente de zona no endémica para leishmaniasis visceral, purificada mediante cromatografía de afinidad en columna de sefarosa CL-

4B acoplada a proteína A de *Staphylococcus aureus* (Sigma- Aldrich, USA).

Producción y purificación de anticuerpo policlonal

El anticuerpo policlonal anti canino fue producido en conejos (*Oryctolagus cuniculus*). El esquema de inmunización consistió en tres (3) inoculaciones con 15 días de intervalo por vía subcutánea e intramuscular a tres (3) conejos hembras de 3 Kg cada uno. Esta inmunización fue realizada con 2 mL de IgG canina purificada (3 mg/mL) en 2mL de adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera inoculación y los dos retos posteriores se hicieron con adyuvante incompleto de Freund (AIF), a la misma proporción. Se realizaron sangrados a cada conejo por la vena marginal de la oreja, antes de la primera inoculación del antígeno, para obtener el suero preinmune y luego cada 15 días posterior al segundo reto para obtener el suero inmune; éste fue monitoreado por el método de contra-inmuno electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la producción y reactividad del suero de los conejos frente a IgG canina. Se determinó la concentración de proteínas totales en el suero mediante el método colorimétrico Micro-Bradford según instrucciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratorios, Inc. USA) y de acuerdo a las modificaciones del método original de Bradford introducidas por Simonian & Smith (2006) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón; las lecturas se realizaron en un lector de microplacas modelo 550 de BIORAD con filtro de 595 nm y la concentración de las proteínas se determinó a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas mediante el Software BIORAD "Microplate reader". Las inmunoglobulinas contenidas en el suero diluido en buffer fosfato salino (PBS) a razón de 85 mg/mL fueron purificadas a través de cromatografía de afinidad. Se determinó nuevamente la concentración de proteínas de la fracción IgG purificada y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

Conjugación con proteínas reporteras

Para la detección de IgG canina bajo las distintas metodologías se procedió a la elaboración de sondas de diagnóstico mediante la conjugación de la fracción IgG de conejo anti IgG canina con biotina (Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester) (Sigma-Aldrich, USA), Peroxidasa de rábano (HRP, Sigma-Aldrich, USA) e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich, USA).

La biotilación fue realizada según el método de conjugación directa (Hay & Westwood, 2002) mezclando 2 mg/mL de IgG con 2 mg/mL de biotina a 4°C por 18 hrs. Posteriormente se eliminó la biotina libre utilizando membrana de diálisis (6 - 8 kD) contra PBS.

La conjugación a peroxidasa se realizó mediante el método de un solo paso con glutaraldehído (Coligan *et al.*, 1994) de IgG mezclado con 2.5 mg de peroxidasa y glutaraldehído al 0,02% en PBS en agitación constante a temperatura ambiente por 1 hr. La fracción conjugada es separada de la peroxidasa libre a través de cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-200.

Para conjugar el anticuerpo con fluoresceína, se ajustó el pH de la IgG con buffer carbonato pH 8.5 y se procedió a mezclar 1 mg de IgG por cada 100 µg de FITC disuelto en Dimetil-sulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 1 mg/mL por 18 hrs a 4°C en agitación constante. El exceso de FITC fue eliminado mediante diálisis contra PBS por 24 hrs.

Caracterización de la sonda

Dot-ELISA:

Se acopló 10 µL de IgG canino purificado a una concentración de 1,6 mg/mL a una membrana de nitrocelulosa de 1 x 2 cm, se bloquearon las membranas con PBS-BSA 0,3% por 30 min, se incubó con 5 mL de la sonda marcada con biotina o peroxidasa en diluciones crecientes en un rango de 1:10 hasta 1:4000, por 30 min a temperatura ambiente. Las membranas sometidas a la sonda biotilada se incubaron con streptoavidina-peroxidasa (Vector labs, USA) por 15 min a temperatura ambiente. El revelado en ambos casos se realizó con H₂O₂ en presencia del cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB, MERCK, USA). La positividad se evidenció mediante la formación de un precipitado rojizo en la membrana.

ELISA:

Se determinó la reactividad del anticuerpo anti IgG canino conjugado a peroxidasa mediante un ELISA directo. Se sensibilizó una placa de 96 pozos con 10⁵ parásitos/pozo, empleando promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi* fijados a 4°C por 10 min en formalina.

Los lavados entre cada paso se hicieron con PBS-Tween 20 y todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se bloquearon las placas con PBS-BSA 0,3% por 1 hr, se incubó con 50 µL de suero canino diluido 1:100 por 1 hr, se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en diluciones crecientes desde 1:500 a 1:4000 por 1 hr. Se reveló con H₂O₂ en presencia del cromógeno ortofenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich, USA) en buffer citrato-fosfato pH 5,3, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2,5 N y se analizó en lector de ELISA modelo 550 (BIORAD) a 490nm.

IFI:

Láminas previamente sensibilizadas con promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi* (10⁴ p/lámina.) fijados en formalina, fueron incubadas con 30 µL de sueros caninos por 30 min, lavados con solución salina e incubados en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente con 30 µL del anticuerpo secundario conjugado con FITC en diferentes diluciones. Luego de tres lavados, las láminas se montaron en glicerol al 10% en PBS y se observaron al microscopio de epi-fluorescencia (Leitz Diaplan).

MABA:

El método de detección de múltiples antígenos se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Noya & Alarcón de Noya en 1998, usando como antígenos acoplados a las membranas de nitrocelulosa el rK39 de *L. infantum* y el LB300 de *L. braziliensis* en diferentes diluciones. Se enfrentaron a sueros caninos positivos y negativos para leishmaniasis visceral y posteriormente se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en diluciones crecientes desde 1:500 a 1:20000. Se reveló con una solución de Luminol® (Amersham ECL Detection System, UK) y H₂O₂ mediante auto-radiografía en placa fotográfica ECL-Hyperfilm (Amersham ECL Detection System, UK), en oscuridad por 10-30 seg (Noya & Alarcon de Noya, 1998).

RESULTADOS

Se obtuvo un total de 90,2 mL de suero de conejo a una concentración de proteínas totales de 84,9 mg/mL. Luego de la purificación de la IgG de este suero por cromatografía de afinidad se obtuvo un volumen de 48 mL a una concentración de 2,08 mg/mL de IgG purificada.

Caracterización de los conjugados IgG anti canino en las técnicas de inmunodiagnóstico

Al evaluar los distintos conjugados en la ELISA en papel o Dot-ELISA se demostró que el conjugado con biotina permite su resolución óptica a una dilución de 1:1000 mientras que el conjugado con biotina y posterior revelado con peroxidasa permite detectar el antígeno a una dilución 1:4000 (Fig.1).

En la determinación de la eficiencia de ambos conjugados mediante la técnica de ELISA convencional se observó una diferencia significativa en las densidades ópticas entre sueros positivos y negativos con la dilución 1:1000 del conjugado con peroxidasa. En contraste, estas diferencias entre positivos y negativos no se observaron al utilizar el conjugado anti IgG canina marcado con biotina (Tabla I).

Por otra parte, la sonda de diagnóstico IgG anti canina conjugada con fluoresceína mediante la técnica de IFI obtuvo una notable resolución con fluorescencia positiva en diluciones del conjugado que van desde 1:25 hasta 1:100 utilizando un suero canino positivo altamente diluido (1:128) (Fig. 2).

La Fig. 3 muestra los resultados de la técnica de MABA, obtenidos al emplear el conjugado IgG anti canino marcado con peroxidasa y diluido 1:1000 frente a los antígenos rK39 de *L. infantum/chagasi* y Lb300 de *L. braziliensis* en diferentes diluciones. Se observó una fuerte reacción positiva a todas las diluciones del antígeno rK39 al emplear sueros de perros positivos para este antígeno, mientras que con el antígeno Lb300 no hubo reconocimiento en estos sueros. Los sueros de perros negativos para rK39 no reaccionaron ante ningún antígeno.

Con la finalidad de conocer la máxima dilución del conjugado a ser utilizada en este ensayo

para el diagnóstico de LVC, se realizó un MABA empleando sueros caninos positivos y negativos con diferentes diluciones del conjugado y del antígeno rK39. En la Fig. 4 se evidencia reacción positiva con todas las diluciones del conjugado al emplear sueros caninos positivos; incluso con una dilución 1:20000 del conjugado hubo reconocimiento utilizando el antígeno diluido 1:100.

DISCUSIÓN

La técnica de Dot-ELISA resultó ser mas sensible utilizando la IgG anti canina conjugada con biotina al permitir la detección del antígeno a una mayor dilución de en comparación con el conjugado a peroxidasa directamente. La conjugación con biotina puede ser ventajosa ya que tiene la capacidad de amplificar la reacción, permitiendo diagnosticar la enfermedad aún con una baja respuesta inmune humoral mediante técnicas que pueden utilizarse en el campo como el Dot- ELISA. Por otra parte en la metodología convencional de ELISA en microplacas, la utilización directa del conjugado a peroxidasa demostró ser más efectiva en comparación con el empleo de un paso extra de amplificación con biotina.

Esta falta de discriminación entre negativos y positivos puede deberse a uniones inespecíficas entre la biotina y componentes de la placa, o a la gran amplificación proveída por el sistema streptoavidina-biotina-peroxidasa que no permite discernir una diferencia en la reacción colorimétrica con el sustrato. Esta amplificación si bien es ventajosa en una prueba de campo como el Dot –ELISA, donde se requiere evidenciar la reacción a simple vista, resulta innecesaria en una técnica más sensible como el ELISA en la cual altas diluciones del conjugado con peroxidasa permiten el desarrollo de color, pudiendo así discernir entre positivos y negativos al analizarse espectrofotométricamente.

Tabla I. Absorbancias obtenidas en el ensayo ELISA empleando anti IgG canino-HRP y anti IgG canino-biotina diluido 1:1000

Dilución de suero canino	Sueros Caninos Negativos				Sueros Caninos Positivos				Blanco
	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:50	1:100	1:500	1:1000	
Absorbancias Elisa con HRP*	0,419	0,342	0,431	0,379	1,048	0,960	1,140	0,951	0,092
Absorbancias Elisa con Biotina	0,416	0,308	0,405	0,327	1,021	0,873	1,138	0,911	0,100
Absorbancias Elisa con Biotina	0,928	0,851	0,885	0,833	0,932	0,848	0,880	0,804	0,345
	0,922	0,836	0,887	0,824	0,912	0,839	0,891	0,833	0,328

*P≤0.05 entre positivos y negativos para cada dilución, punto de corte: DO: 0,59. Calculado como 6 D.O Blanco + 2SD

Fig. 1. Dot – ELISA en papel de nitrocelulosa sensibilizado con IgG canina. A: ensayo empleando anti IgG canina conjugada con HRP, B: ensayo empleando anti IgG canina conjugada con biotina.

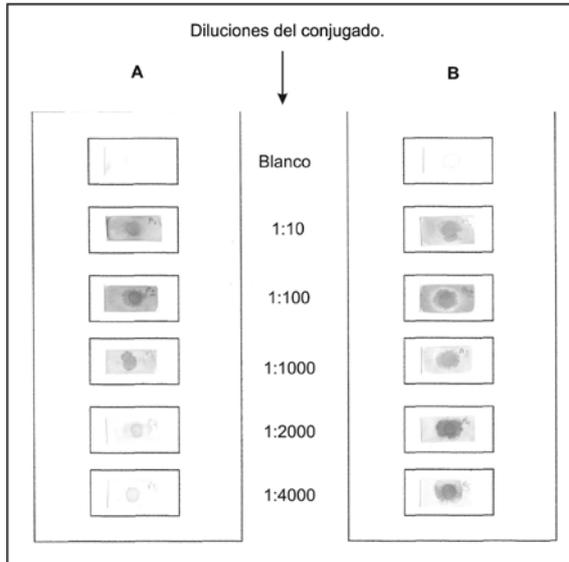


Fig.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) empleando anti IgG canina marcada con fluoresceína diluida 1:100 enfrentada a suero canino positivo (A) y negativo (B) diluidos 1:128. Antígeno: Promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi*.

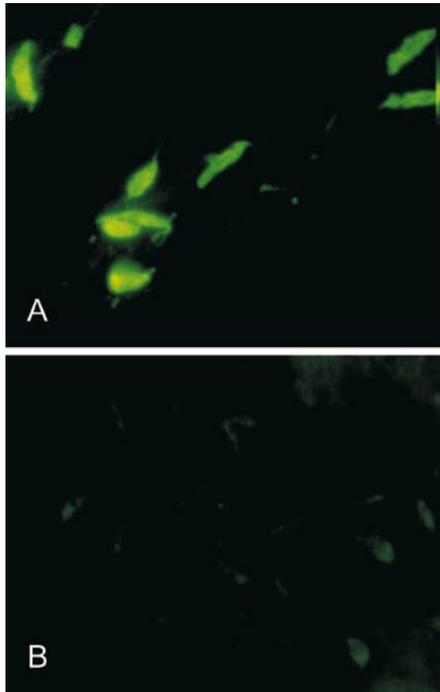


Fig. 3. Inmunoensayo enzimático de múltiples antígenos (MABA). Patrón de reconocimiento de IgG canina empleando el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido 1:1000 y diferentes diluciones del antígeno rk39 y Lb300. Cada tira representa un suero canino (2-6). Control de conjugado (1), Sueros positivos (2-4), sueros negativos (5,6) por ELISA.

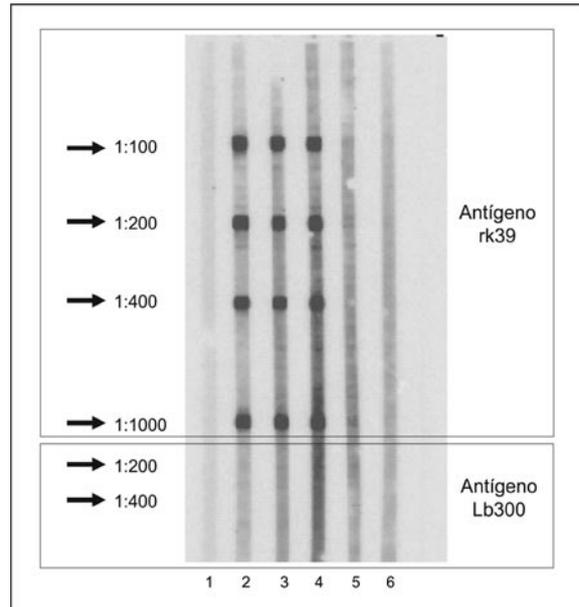
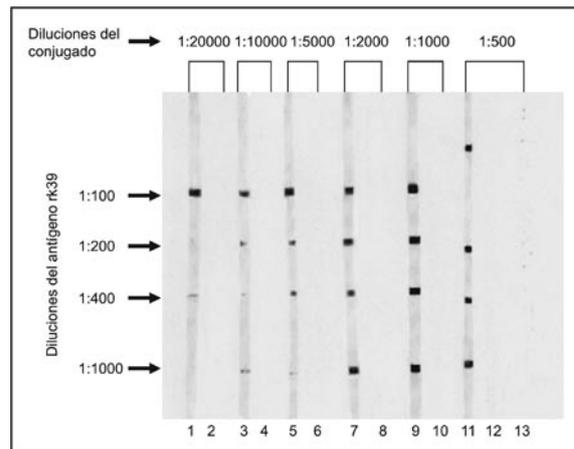


Fig. 4. Sensibilidad del Ac.secundario anti-IgG canina conjugado a HRP (MABA). Patrón de reconocimiento de IgG canina empleando antígeno rk39. Cada tira representa un suero canino (números impares: sueros positivos, números pares: sueros negativos). 13. Control del conjugado.



El anticuerpo anti IgG canino conjugado con FITC demostró ser eficiente en la detección de IgG canina específica para promastigotes de leishmania mediante IFI, demostrando su alta sensibilidad y confirmando su utilidad en el diagnóstico de LVC.

La especificidad del anticuerpo de conejo conjugado por la IgG de suero canino así como su gran avidéz fue corroborada con la técnica de MABA al no presentar reacción inespecífica o fondo en las reacciones de los sueros con antígenos de *L. braziliensis* Lb300, y al reaccionar con el antígeno K39 diluido empleando el conjugado a elevadas diluciones como 1:10000 y 1:20000. Estas diluciones del conjugado son superiores a las reportadas por Wide *et al.* (2006) en trabajos similares, utilizando la técnica de MABA para la detección de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Anopheles albimanus* con sueros de conejos donde se empleó un anti IgG de conejo comercial conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, USA) a una dilución de 1:4000 (Wide *et al.*, 2006).

El conjugado con peroxidasa producido en este trabajo presenta grandes ventajas para el diagnóstico de LVC, entre ellas: Alta sensibilidad, en vista de que es posible evidenciar una reacción positiva con la máxima dilución de suero canino empleada (1:100); es versátil, por lo que puede ser empleado en diferentes inmunoensayos como MABA, ELISA y dot-ELISA; resulta ser costo-efectivo, debido a que este conjugado puede ser empleado con altas diluciones del mismo (1:1000) en técnicas que no requieren equipos costosos obteniéndose resultados confiables y además, es fácil de almacenar y manipular, lo que permite su uso en estudios de campo dado que la reacción puede ser revelada macroscópicamente por cambios de coloración.

El anticuerpo aquí generado está siendo utilizado en la actualidad como sonda de detección en caninos infectados con *L. infantum/chagasi* del estado Nueva Esparta, para la determinación de la inmunidad o reactividad frente a antígenos de otras zoonosis que pudiesen estar relacionadas o no con la susceptibilidad a leishmaniasis visceral para la determinación de posibles factores de riesgo zoonóticos.

AGRADECIMIENTOS:

Al personal del Bioterio y el Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Biomedicina así

como la Sección de Inmunoparasitología del Instituto de Medicina Tropical UCV por su asistencia técnica y al Dr. Oscar Noya por su asistencia en las fotografías de IFI. Este trabajo fue financiado por el FONACIT a través del Proyecto grupal G-2005000375 (MS).

Production and characterization of anti dog IgG antibody as a diagnostic probe in canine visceral leishmaniasis

SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus. Endemic in many countries worldwide, VL represents a serious public health issue and might be fatal if untreated. Infected domestic dogs are the main reservoir of viscerotropic species of *Leishmania* in the New World and plays an important role as source of infection to humans. Early diagnosis of dog reservoirs are therefore required by demonstrating specific serum antibodies against the parasite with rapid, sensitive and cost-effective test like ELISA, Dot – ELISA, IFI and Multiple Antigen Binding Assay (MABA). Here we produce an anti canine IgG antibody and tested it in those assays by conjugating with reporter proteins. Results demonstrated a higher sensitivity of this antibody conjugated with HRP in MABA and ELISA test, as well as conjugated with FITC on the IFI test, when compare to the commercial peroxidase-conjugated antibody. The use of this conjugate on canine VL diagnosis proved to be useful, highly sensitive and cost effective.

Keywords: visceral leishmaniasis, diagnostics, serology.

REFERENCIAS

- Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M. & Strober W. (1994). *Current protocols in immunology*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 305-18.
- Hay F. C. & Westwood O. M. (2002). *Practical immunology*. Blackwell Publishing.

- Instituto de Biomedicina. Dpto. Informática (2006). *Reporte Anual*. MSDS.
- Moreno J. & Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* **18**: 399-405.
- Noya O. & Alarcon de Noya B. (1998). The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Letters.* **63**: 53-56.
- Ortiz R. M., Muñoz S., Lechuga D., del Campo M. & Torres E. (2003). Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis visceral humana y canina en Venezuela. *Pan. Amer. J. Pub. Health.* **13**: 1 - 2.
- Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del Real G. & Ruitenbergh J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* **62**: 229-35.
- Sánchez M. A., Díaz N. L., Zerpa O., Negrón E., Convit J. & Tapia F. J. (2004). Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 618-24.
- Simonian M. H. & Smith J. A. (2006). Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 10: Unit 10 1A.
- Torrealba J. W. & Torrealba J. F. (1964). [Experimental Infection of *Cercopithecus thomasi* (common fox) with *Leishmania donovani*. Preliminary Note]. *Gac. Med. Caracas.* **72**: 117-8.
- Wide A., Capaldo J., Zerpa N., Pabon R., Noda A., Noya B., Gonzalez J. & Noya O. (2006). Sharing of antigens between *Plasmodium falciparum* and *Anopheles albimanus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **48**: 327-32.
- Zerpa O., Ulrich M., Negrón E., Rodríguez N., Centeno M., Rodríguez V., Barrios R. M., Belizario D., Reed S. & Convit J. (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**: 484-7.

Recibido el 09/04/2008
Aceptado el 24/05/2008