

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana utilizando a proteína rLigBrep

Caroline Amurim da Silva Gonçalves

Pelotas, 2014

CAROLINE A. S. GONÇALVES

Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana utilizando a proteína rLigBrep

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora de Estágio: Dr. Karla Siqueira Mendonça

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

G635f Gonçalves, Caroline Amurim da Silva

Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana utilizando a proteína rLigBrep / Caroline Amurim da Silva Gonçalves. – 39f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Alan John Alexander McBride.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose humana. 3.Diagnóstico.
4.rLigBrep. 5.ELISA. I.McBride, Alan John Alexander.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Dr. Sérgio Jorge

MSc. Neida Lucia Conrad

“Eu não quero acreditar.

Eu quero saber.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Delmar e Cláudia, e ao meu irmão Vinícius, pelo amor, apoio, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos à mim. Agradeço também pela paciência e aos incentivos principalmente nesses últimos meses;

Ao Diego, por todo o amor, paciência e incentivo. E que além de um namorado, sempre apoiou minhas decisões e acreditou em mim;

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Alan John Alexander McBride, pela confiança, incentivo e pelos conhecimentos passados à mim nesses dois anos de estágio;

A minha orientadora de estágio, Dr^a. Karla Siqueira Mendonça, pela dedicação, paciência e disponibilidade em sempre me ajudar;

A todos os meus colegas do LPDI, pelas inúmeras contribuições nas atividades do laboratório, além da amizade e pelo convívio agradável;

Aos colegas de estágio, Maurício, Júlia, Ana Sofia, Liana e Jéssica pelos ótimos momentos e pelo apoio principalmente nesse último semestre;

A minhas amigas e amigos, principalmente a Ândria e Daniela, pela amizade verdadeira, pela confiança, pelos conselhos e por sempre me ajudarem quando preciso;

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de graduação com alta qualidade e com professores comprometidos com os seus ofícios;

A todos os funcionários do Núcleo de Biotecnologia, pela amizade e pelo aprendizado;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Resumo

GONÇALVES, Caroline Amurim da Silva. **Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana utilizando a proteína rLigBrep.** 2014. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leptospirose é uma zoonose causada pela infecção de espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Possui como portadores da bactéria, os animais selvagens e domésticos, sendo que os humanos são considerados hospedeiros acidentais, os quais contraem a leptospirose a partir de uma fonte de infecção animal. São reportados anualmente mais de 873.000 casos severos de leptospirose no mundo, resultando na letalidade de 49.000. Existem diferentes formas de diagnóstico, onde o Teste de Microaglutinação (MAT) é considerado o teste padrão-ouro de diagnóstico da leptospirose. Apesar disso, esse teste apresenta dificuldades de execução, pois necessita do cultivo de cepas vivas, de um laboratório estruturado que comporte esse cultivo além de que é um teste que demanda tempo para a realização. Com isso, existe uma necessidade de desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, os quais sejam mais rápidos e eficazes. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo a padronização e o desenvolvimento de um Teste Imunoenzimático (ELISA) baseado na detecção de anticorpos IgG e IgM nos soros humanos, utilizando como antígeno a proteína rLigBrep para o diagnóstico de leptospirose humana. Na análise dos soros humanos individuais com o uso do anticorpo IgG, o valor de sensibilidade do teste foi de 66,7% e a especificidade corresponde a 95,8%. Todavia, a análise utilizando o anticorpo IgM, houve uma melhora no valor da sensibilidade, a qual aumentou para 75% e a especificidade permaneceu a mesma que na análise anterior com o anticorpo IgG, com 95,8%.

Palavras-chaves: Diagnóstico. Leptospirose humana. rLigBrep. ELISA.

Abstract

GONÇALVES, Caroline Amurim da Silva. **Early stage of the development of a diagnostic test for leptospirosis using rLigBrep protein.** 2014. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by infection of pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. Has as carriers of the bacteria, wild and domestic animals, and humans are considered accidental hosts, which contract leptospirosis from a source of animal infection. Annually are reported more than 873,000 cases of severe leptospirosis in the world, resulting in lethality 49,000. There are different forms of diagnosis, where the microagglutination test (MAT) is considered the gold standard for the diagnosis of leptospirosis. Nevertheless, this test presents implementation difficulties, it requires the cultivation of live strains of a structured laboratory incorporating this crop plus it is a test that requires time to perform. Thus, a need exists for the development of new diagnostic tests, which are faster and more efficient. Thus, this study aims to standardization and the development of an enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of IgG and IgM antibodies in human sera, using as antigen the rLigBrep protein for the diagnosis of human leptospirosis. In the analysis of individual human sera using the IgG antibody, the sensitivity of the assay value was 66.7% and specificity corresponds to 95.8%. However, analysis using IgM antibody, an improvement in the sensitivity value which increased to 75% and the specificity remained the same as in the previous analysis with IgG antibody with 95.8%.

Keywords: Diagnosis. Human leptospirosis. rLigBrep. ELISA.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Checkerboard</i> com pool de soros positivos e anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase | 26 |
| Figura 2. <i>Checkerboard</i> com pool de soros positivos e anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase | 27 |
| Figura 3. Teste de ELISA para confirmação da padronização do anticorpo IgM conjugado com peroxidase | 28 |
| Figura 4. Avaliação de soros individuais utilizando a diluição 1:100 e anticorpo IgG 1:1000 | 29 |
| Figura 5. Curva ROC utilizando o anticorpo IgG | 30 |
| Figura 6. Avaliação dos soros individuais nas diluições de soro 1:100 e de anticorpo IgM 1:1000 | 31 |
| Figura 7. Curva ROC utilizando o anticorpo IgM | 32 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Variação do valor do <i>Cut-off</i> e conseqüentemente, mudança nos valores de sensibilidade e especificidade | 30 |
| Tabela 2. Diferentes valores de <i>Cut-off</i> com interferência nas porcentagens de sensibilidade e especificidade | 32 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs – Absorbância

E. coli - Escherichia coli

EIE – IgM – ELISA baseado em célula inteira de *Leptospira*

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

MAT – Teste de Microaglutinação

OPD - substrato o-fenilenodiamnina

pAE – Vetor de Expressão Bacteriano

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PBS-T - Tampão Fosfato-salino adicionado com 0,05% de Tween 20

rLigBrep – Fragmento recombinante de LigB

ROC – Característica de Operação do Receptor

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

μL – Microlitro

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 Etiologia e Epidemiologia | 14 |
| 2.2 Taxonomia | 15 |
| 2.3 Microbiologia | 16 |
| 2.4 Ciclo de Transmissão..... | 16 |
| 2.5 Patogênese..... | 17 |
| 2.6 Manifestações Clínicas..... | 18 |
| 2.7 Controle | 18 |
| 2.8 Tratamento..... | 19 |
| 2.9 Diagnóstico Laboratorial | 20 |
| 2.9.1 Cultura da Bactéria | 20 |
| 2.9.2 Reação em Cadeia da Polimerase..... | 20 |
| 2.9.3 Teste de Microaglutinação (MAT) | 21 |
| 2.9.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) | 22 |
| 3. OBJETIVOS..... | 23 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 23 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 4. RELATÓRIO DE ESTÁGIO | 23 |
| 4.1 Metodologia | 23 |
| 4.1.1 Banco de soros e cepas..... | 23 |
| 4.1.2 Preparação da proteína rLigBrep | 24 |
| 4.1.3 Protocolo padrão para execução dos ELISAs | 24 |
| 5. RESULTADOS | 25 |
| 5.1 Seleção da quantidade de antígeno, de soro e de anticorpo IgG..... | 25 |
| 5.2 Seleção da quantidade de soro e de anticorpo IgM..... | 27 |
| 5.3.Desenvolvimento do ELISA avaliando soros humanos utilizando o anticorpo IgG..... | 28 |
| 5.4.Desenvolvimento do ELISA avaliando soros humanos utilizando o anticorpo IgM..... | 31 |
| 6. DISCUSSÃO | 33 |
| 7. CONCLUSÕES | 34 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |

1.INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada e com distribuição mundial, causada por espiroquetas patogênicas da família *Leptospiraceae* e do gênero *Leptospira*, capaz de acometer homens e animais (ESTEVES et al., 2014). Existem fatores que aumentam a incidência da leptospirose, como climas tropicais, águas estagnadas, baixos níveis de saneamento e a alta proximidade de animais reservatórios para a população humana (GUERRA, 2013). A infecção em humanos pode ocorrer durante a exposição direta com animais infectados ou indiretamente em contato com ambientes contaminados pela urina de animais acometidos pela doença (CRODA et al., 2007). Em relação à infecção em seres humanos, a doença pode variar em gravidade de acordo com o sorotipo infectante da leptospira, e com a idade, saúde e competência imunológica do hospedeiro. Podendo variar de uma doença semelhante à gripe com manifestações leves a uma infecção grave causando uma insuficiência renal, hepática e pulmonar, ou podendo resultar também na morte do hospedeiro (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A maior incidência da doença ocorre em populações mais carentes, principalmente em países em desenvolvimento e regiões tropicais, pois são nesses locais onde existem deficiências em saneamento básico, e essa situação agrava em períodos de chuvas constantes, beneficiando a transmissão da doença para humanos (MCBRIDE et al., 2005). Por outro lado, a leptospirose, em países desenvolvidos, é considerada uma doença ocupacional e de baixa incidência (KO et al., 2009). Assim, estima-se a ocorrência de cerca de 873.000 casos de leptospirose por ano em todo o mundo (PICARDEAU et al., 2014), gerando índices de letalidade superiores a 5% (PAPPAS & CASCIO, 2006; WHO, 2011). Esse número é elevado principalmente pela falta de um método efetivo de proteção para a leptospirose. Existem vacinas disponíveis as quais podem ser utilizadas como prevenção, porém são usadas em especial para o uso veterinário, onde oferecem uma proteção sorovar-específica e de curta duração (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A principal barreira para que ocorra a implementação de medidas as quais auxiliem na diminuição dos casos de leptospirose humana e animal, é a carência de um diagnóstico laboratorial rápido, barato e eficaz, fazendo com que em muitos casos essa doença seja diagnosticada erroneamente (MCBRIDE et al., 2005). Existem dois métodos principais e mais utilizados para a detecção da doença, sendo elas o teste de diagnóstico padrão-ouro para leptospirose, o Teste de Microaglutinação (MAT) e a

cultura da bactéria (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Ambas técnicas possuem limitações, no caso do MAT, é um teste com menor sensibilidade na fase inicial da doença, necessita de um trabalho intensivo e precisa manter uma bactéria viva de leptospira (CRODA et al., 2007). No caso da cultura da bactéria, é um processo laborioso demandando semanas para obter o resultado, além de possuir baixa sensibilidade (BHARTI et al., 2003). Devido a esse fato, existe a necessidade de desenvolvimento de novos testes de diagnósticos que sejam mais rápidos, capazes de detectar a doença na fase precoce e que possam ser executados em áreas que possuem capacidade laboratorial limitada, para o rápido início do tratamento do paciente (ESTEVES et al., 2014).

Os testes diagnósticos disponíveis para humanos, são na maioria baseados em ensaios sorológicos utilizando antígeno bruto, porém apresentam baixa sensibilidade na detecção durante a fase aguda da doença (BAJANI et al., 2003). Testes esses, que demonstram uma variação de sensibilidade de 28-71% quando utilizados soros em fase aguda, e expressam um aumento significativo na detecção durante a fase convalescente, onde a sensibilidade dos testes oscilam entre 75-94% (MCBRIDE et al., 2007). Novos ensaios buscando testes aprimorados, utilizam um fragmento de proteína chamado rLigBrep como utilidade diagnóstica, a qual é uma região idêntica compartilhada entre as proteínas LigA e LigB. Além disso, esse fragmento está presente em todas as cepas patogênicas de leptospira e dessa forma, o ensaio desenvolvido pode ser utilizado em diferentes localidades que apresentam sorovares distintos (CRODA et al., 2007).

Com isso, o presente trabalho apresenta a padronização e a fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana, baseado em um Teste Imunoenzimático (ELISA) utilizando a proteína rLigBrep. Além disso, são avaliados nesse teste diagnóstico os anticorpos IgM e IgG, os quais estão relacionados principalmente com a fase inicial da doença e com a fase tardia, respectivamente, auxiliando no rápido tratamento do indivíduo infectado.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Etiologia e Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose de importância global, causada pela infecção de espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (BROWNLOW et al., 2014). Animais selvagens ou domésticos, são considerados portadores da bactéria, em especial roedores, suínos, caninos, bovinos. Humanos são considerados hospedeiros acidentais, os quais podem ser infectados através do contato direto com animais acometidos pela doença ou indiretamente com ambientes contaminados pela urina de animais infectados cronicamente (ADESIYUN et al., 2011; BROWNLOW et al., 2014).

Sendo assim, a leptospirose era tradicionalmente considerada uma doença esporádica de base rural, no entanto, as mudanças na demografia humana durante os últimos 50 anos aumentou o surgimento da leptospirose como um problema de saúde urbana (FELZEMBURGH et al., 2014). Condições ambientais são influências importantes na incidência da leptospirose, a doença é rara em desertos e comum em locais quentes, úmidos, e áreas com chuvas sazonais ou severas são associados com o aumento da prevalência da doença (BUDIHAL & PERWEZ, 2014).

Existem um bilhão de pessoas residindo em favelas urbanas distribuídas no mundo, onde a falta de saneamento básico e a ocorrência de períodos de chuvas fortes e inundações, produzem condições para a transmissão da doença (FELZEMBURGH et al., 2014; MCBRIDE et al., 2005). São reportados, mundialmente, mais que 873.000 casos severos por ano, resultando na letalidade de 49.000 casos (PICARDEAU et al., 2014). No Brasil, 10 mil casos de leptospirose são relatados anualmente, ocorrendo principalmente em comunidades urbanas pobres (favelas) durante o período de chuvas fortes (MCBRIDE et al., 2005).

2.2) Taxonomia

Leptospiras são bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales e filo Espiroqueta (Spirochaetes). O gênero compreende 21 espécies genômicas, sendo 9 patogênicas, 5 intermediárias e 6 saprófitas (PICARDEAU et al., 2014). *Leptospiras biflexa*, são consideradas aquelas que reúnem as estirpes saprófitas e *Leptospira interrogans sensu lato* compreendem os sorovares patogênicos. Com isso, as espécies saprófitas, diferentemente das espécies patogênicas, não infectam hospedeiros animais, tendo como característica a capacidade de isolamento no ambiente, as quais são encontradas em água e solo (KO et al., 1999).

Sorologicamente, são divididas em inúmeros sorovares, definidos pela aglutinação com o antígeno homólogo. Sendo assim, existem mais de 60 sorovares de *L. biflexa* registrados e mais de 250 sorovares reconhecidos dentro da espécie patogênica (LEVETT, 2001).

2.3) Microbiologia

Leptospiras são geralmente visualizadas por microscopia de campo escuro, e não através de métodos habituais de coloração de bactérias. Visto microscopicamente pela iluminação de campo escuro em meio fluido, leptospiras são bactérias finas, com curvatura em forma de gancho, aeróbicas obrigatórias, móveis devido a presença de dois flagelos em cada extremidade, medindo cerca de 6-25 µm de comprimento e aproximadamente 0,2 µm de diâmetro. Possuem crescimento ótimo na temperatura de 28 a 30°C, sendo sensíveis aos antibióticos beta-lactâmicos e tetraciclina. A estrutura de dupla membrana agrega características de bactérias Gram-negativas, porém apresenta um aspecto típico de bactérias Gram-positivas, as quais possuem uma camada de peptidoglicano ancorada à membrana interna (EVANGELISTA; COBURN, 2010; VIJAYACHARI, et al., 2008).

Os meios de cultivo para leptospiras, são enriquecidos com vitaminas, sais de amônio e ácidos graxos de cadeia longa, os quais são utilizados como importantes fatores de crescimento e fonte de carbono. Embora vários outros meios vem sendo descritos, o mais utilizado para o crescimento de leptospiras, é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), o qual se baseia em ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato 80, geralmente suplementado com soro de coelho ou suplementos comerciais (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001).

2.4) Ciclo de Transmissão

Para que ocorra a transmissão da leptospirose, é necessário um ciclo formado por um animal reservatório do patógeno, um ambiente de infecção e um hospedeiro suscetível a doença. A maioria dos mamíferos são considerados portadores crônicos, porém os roedores são os principais portadores assintomáticos e carreadores da espiroqueta. Todavia, o humano não tem importância na transmissão da bactéria (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Os ratos são considerados hospedeiros de manutenção do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, onde as leptospiros patogênicas são albergadas nos túbulos proximais renais desses animais, embora outros tecidos e órgãos também possam servir como fonte de infecção. A partir dos rins, as bactérias são excretadas na urina e podem então, contaminar o solo, água de superfícies, córregos e rios (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI et al., 2003).

A infecção em seres humanos ocorre principalmente quando os indivíduos entram em contato, direta ou indiretamente, com urina de roedores contendo células viáveis da bactéria, ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados (ADESIYUN, et al., 2011). O contato direto com animais infectados é responsável por grande parte das infecções em agricultores, veterinários e outras ocupações que requerem contato com animais. Todavia, o contato indireto com hospedeiros de manutenção faz com que trabalhadores que frequentam locais possivelmente contaminados, como esgotos, sejam acometidos pela doença (LEVETT, 2001).

2.5) Patogênese:

As leptospiros penetram a pele através de pequenos cortes ou abrasões e pelas membranas mucosas. Sendo assim, após a entrada das bactérias no hospedeiro, inicia-se a fase inicial da doença, onde ocorre a multiplicação rápida de leptospiros no sangue (leptospiremia) e posteriormente, essas bactérias migram para diferentes tecidos com o objetivo de atingir órgãos-alvos, como rins, fígado e pulmões. (FAINE et al., 1999, BAROCCHI et al., 2002). Mesmo não sendo considerados microrganismos intracelulares, as bactérias possuem a capacidade de residir no interior das células dos hospedeiros, característica importante como forma de escape do sistema imune, provocando assim uma colonização mais rápida dos órgãos do hospedeiro (KO et al., 2009).

As leptospiros possuem um mecanismo típico durante a fase inicial da infecção, permitindo a evasão do sistema imune inato. Isso ocorre pela resistência ao sistema complemento, através do recrutamento do Fator H para a superfície bacteriana, mediado por proteínas LenA e LenB ou através de C4BP, mediado por LcA. (KO et al., 2009; STEVENSON et al., 2007; BARBOSA et al., 2010). Por outro lado, em relação à capacidade das leptospiros de sobreviver e colonizar os rins dos

hospedeiros, diversos mecanismos estão envolvidos, como a redução da expressão de proteínas antigênicas (MONHAHAN et al., 2008)

2.6) Manifestações clínicas:

A leptospirose em humanos pode variar de acordo com a virulência do sorovar infectante de leptospira, carga bacteriana, idade e competência imunológica do indivíduo. Com isso, os sintomas causados pela infecção da bactéria variam desde uma infecção branda à uma manifestação grave da doença (ADLER, 2010; ZENG et al., 2014).

A grande maioria das infecções causadas por leptospirosas resultam em manifestações leves ou não-ictérica, onde o indivíduo pode apresentar sintomas como febre, calafrios, cefaleia, mialgia e dor abdominal. Sendo assim, o diagnóstico é muitas vezes confundido com outras doenças que causam os mesmos sintomas, como dengue, influenza e malária (LEVETT, 2001).

Por outro lado, manifestações graves ou ictéricas da doença ocorrem em 5-15% das infecções pela bactéria. Dentre as formas de leptospirose grave, estão insuficiência renal, a meningite e a Doença de Weil, a qual é caracterizado pela associação de febre, icterícia e insuficiência renal. A leptospirose severa é um grande problema de saúde pública, com mais de 500,00 casos em humanos por ano, resultando em uma taxa de letalidade de até 40% (RICALDI e VINETZ, 2006; KO, 1999; LOURDAULT, et al., 2013)

2.7) Controle:

Existem três formas de intervenções com a finalidade de controlar a doença, podendo ser na fonte de infecção (hospedeiro-reservatório), na rota de transmissão e à nível do hospedeiro humano. Contudo, a maioria das formas de controle dessa doença estão direcionadas à fonte de infecção, com o intuito de não haver a transmissão aos humanos. Todavia, a erradicação da leptospirose em animais selvagens não é possível, devido à variedade de animais portadores, altas taxas de reprodução e a transmissão da doença para a sua prole. Mas medidas de controle podem ser altamente eficazes em pequenas populações, como em cães e rebanhos bovinos. Um fator agravante para o controle da leptospirose são as favelas urbanas,

onde existem deficiências de infraestruturas, como esgotos abertos e lixo entulhados, que contribuem com a transmissão da leptospirose durante epidemias. Devido a isso, são necessárias medidas preventivas incluindo o saneamento básico adequado nessas localidades, com o intuito de diminuir a transmissão da doença para os humanos (WHO, 2003; MCBRIDE, et al., 2005).

Outra forma de prevenção da doença, é através do uso de vacinas compostas por bacterinas, as quais podem ser utilizadas para o uso veterinário e em certos países, em humanos. Todavia, nas vacinas para animais, como aquelas que são administradas em cães, não há a inclusão de todos os sorovares importantes, de modo que sorovares de outros animais possam infectar os cães que estavam supostamente protegidos, colocando os humanos em risco de infecção, quando entram em contato com esses animais infectados (RICALDI e VINETZ, 2006). Além disso, as vacinas existentes atualmente, são disponíveis para o uso em humanos apenas nos países como a China, França, Rússia, Cuba e Japão (DELLAGOSTIN et al., 2011). Essa limitação de uso, se deve ao fato de várias restrições da vacina, como ser composta por sorovares locais, os quais induzem uma proteção sorovar-específico e de curta duração, bem como a necessidade de reforço de imunizações em intervalos regulares para manter os títulos de anticorpos protetores, além de ocasionar efeitos colaterais (HARTSKEERL et al., 2011).

2.8) Tratamento:

O tratamento da leptospirose é baseado principalmente na administração de antibióticos no momento do diagnóstico, e em casos severos na doença, é preciso a realização de outras medidas terapêuticas direcionadas aos órgãos acometidos pela doença (PAPPAS & CASCIO, 2006). O tratamento precoce em humanos, mostrou o potencial de reduzir a duração e a gravidade da doença (GUERRA, 2013). Na fase aguda, os mais indicados são através do uso de antibióticos como, a doxiciclina e os β -lactâmicos, que incluem a amoxicilina e a penicilina. Todavia, na fase crônica da doença, é recomendado o uso de penicilina intravenosa, apesar de existir grande dificuldade na avaliação da eficácia dos resultados do tratamento com antibióticos nesse estágio da doença, pois as bactérias já se localizam nos tecidos dos hospedeiros. Sendo assim, o tratamento com antibióticos na fase crônica, pode não

desempenhar sua função completa, sendo a melhor abordagem, o uso de imunomoduladores (LEVETT, 2001; PAPPAS & CASCIO, 2006).

2.9) Diagnósticos laboratoriais

Para a implementação de testes de diagnóstico para a leptospirose ou outras zoonoses, são avaliados uma série de fatores, como a precisão diagnóstica, a viabilidade financeira (baixo custo), facilidade de execução, alta sensibilidade e especificidade (PICARDEAU et al., 2014). No entanto, os diferentes tipos de diagnósticos para essa doença que existem atualmente, como a cultura da bactéria, testes sorológicos como o Teste de Microaglutinação (MAT) e diferentes Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) e os testes moleculares (PCR), possuem limitações e não suprem todas as necessidades citadas anteriormente (GORIS et al., 2013). As técnicas irão ser descritas detalhadamente abaixo.

2.9.1) Cultura da bactéria

Esse teste de diagnóstico se refere ao isolamento de leptospiras através de amostras como os tecidos, sangue ou urina. Todavia, essas amostras devem ser coletadas até o décimo dia da doença e preferencialmente, antes do início do tratamento com antibiótico (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). É necessário realizar a cultura da amostra escolhida em meio EMJH, e se a mesma estiver com algum resquício de contaminação, suplementar com 5-fluorouracilo e 1% de soro de coelho. Logo após esse passo, o cultivo deve ser incubado por no mínimo 4 semanas a 30°C, sendo submetida semanalmente a verificações de crescimento por meio de microscopia de campo escuro (GORIS et al., 2013). Devido a esse fato, esse tipo de teste se torna pouco prático para o diagnóstico imediato, pois requer várias semanas de incubação e possui baixa sensibilidade (BHARTI et al., 2003).

2.9.2) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um substituto para a demonstração direta de leptospiras em amostras humanas é o diagnóstico baseado em PCR. As amostras clínicas usadas por esse teste diagnóstico pode ser o sangue, a urina, o líquido cefalorraquidiano e amostras de tecidos (ante ou post mortem) (WHO, 2002). A reação detecta o DNA das bactérias

leptospiras na amostra, permitindo a detecção nos estágios iniciais da infecção, resultando em uma maior assistência ao paciente, devido ao diagnóstico precoce da doença. (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Além disso, o PCR é um teste sensível, podendo diferenciar entre bactérias patogênicas e não-patogênicas. E este método pode ser utilizado, mesmo em pacientes que iniciaram o uso de antibióticos (BHARTI et al., 2003).

Existem vários protocolos de PCR para a detecção de DNA de leptospira, todavia, dois deles vem sendo avaliados em estudos clínicos. Um deles é o protocolo descrito por Gravekamp et al. (1993) e posteriormente avaliado por Brown et al. (1995), onde requer dois conjuntos de primers com a finalidade de detectar todas as espécies patogênicas de leptospiras. O segundo protocolo, descrito por Merien et al. (1995), é um ensaio gênero-específico, onde amplifica o DNA de sorovares patogênicos e não-patogênicos (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

2.9.3) Teste de microaglutinação (MAT)

O teste de microaglutinação (MAT) é considerado o padrão-ouro no diagnóstico de leptospirose humana e animal. É um teste que não oferece muitas reações cruzadas e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso de 19 diferentes antígenos vivos para a realização do MAT (BROWNLOW et al., 2014). Nesse caso, as amostras utilizadas são os soros dos pacientes, as quais são misturadas com suspensões de leptospiras vivas de diferentes sorovares. Esse teste tem como objetivo a detecção de anticorpos, tanto o IgG quanto o IgM, presentes nos soros dos pacientes (WHO, 2003). Sendo assim, o MAT não possui grande utilidade nas fases iniciais da doença, pois os anticorpos não estão presentes ou estão em níveis muito baixos (ADESIYUN et al., 2011).

É preciso, para a interpretação dos dados sorológicos, uma análise de amostras biológicas em sequência, ou seja, duas amostras são coletadas dentro de um período de 8-10 dias após o início dos sintomas e uma terceira amostra pode ser necessária para confirmar o diagnóstico clínico e o sorogrupo infectante (WHO, 2003). Os resultados obtidos são vistos como uma aglutinação entre os anticorpos presentes nos soros e a bateria de antígenos dispostos no teste. São interpretados como resultados positivos, aqueles que apresentam um aumento de 4 vezes o título entre os soros agudos e convalescentes (BUDIHAL & PERWEZ, 2014).

Todavia, esse teste diagnóstico possui algumas desvantagens, como por exemplo, em regiões onde a leptospirose é comum, pode haver uma proporção significativa da população com títulos elevados de anticorpos, dificultando a interpretação do MAT. O desempenho desse teste é restrito aos laboratórios certificados capazes de manter as cepas de antígenos vivos, é demorado quando comparado a outros testes e possui baixa sensibilidade na fase inicial da doença (BUDIHAL e PERWEZ, 2014).

2.9.4) Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA):

Este é um teste baseado em grande maioria no uso do extrato de antígeno de célula inteira obtido a partir de um isolado clínico, com a finalidade de detectar anticorpos IgM e/ou IgG (MCBRIDE et al., 2007). Os anticorpos IgM se tornam detectáveis durante a primeira semana da doença, permitindo o diagnóstico. Todavia, com o decorrer da doença, os níveis de IgG se tornam maiores, demonstrando a fase convalescente da leptospirose. (BUDIHAL e PERWEZ, 2014).

Esses testes sorológicos possuem um formato rápido e estão disponíveis comercialmente, mas há uma grande variação em relação as sensibilidades e especificidades dos diferentes Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA). A sensibilidade varia de 28-71% para detectar a doença na fase aguda, e alteram entre 75-94% na detecção na fase convalescente (MCBRIDE et al., 2007). Entre esses testes disponíveis para uso comercial, existe o ELISA PanBio, onde estudos mostraram ser mais sensível do que o teste de microaglutinação (MAT), quando o objetivo é a detecção de anticorpos no início da doença (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Outro estudo utilizando as proteínas recombinantes rLipL32, rLipL41 e rLigA, mostraram ser testes importantes na detecção de anticorpos IgM e IgG, com sensibilidade variando entre 62-65% e especificidade maior que 90%, para todas as proteínas (CHEN et al., 2013). Além deste, outro teste desenvolvido para o diagnóstico de leptospirose, o EIE – IgM, obteve baixa sensibilidade nos ensaios durante a primeira semana da doença, obtendo cerca de 62,1%. Porém, houve um aumento da sensibilidade para 97,1% quando analisou-se os soros de pacientes na segunda semana da doença (MCBRIDE et al., 2007).

Sendo assim, o desempenho geral dos Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA) sugerem a aplicabilidade como um teste rápido de diagnóstico de leptospirose,

principalmente em hospitais com recursos limitados e laboratórios onde o MAT não é disponível (BUDIHAL & PERWEZ, 2014).

3) OBJETIVOS:

3.1) Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de leptospirose humana.

3.2) Objetivos específicos:

- Padronizar um teste de ELISA indireto utilizando a proteína rLigBrep como antígeno
- Avaliar diferentes soros humanos previamente caracterizados, no teste de diagnóstico desenvolvido.

4) RELATÓRIO DE ESTÁGIO

4.1 Metodologia

4.1.1) Banco de soros

Soros positivos utilizados nesse trabalho, foram cedidos gentilmente pela FIOCRUZ de Salvador, através da parceria entre o LPDI e a Fundação Oswaldo Cruz. Essas amostras foram obtidas de pacientes suspeitos de estarem com leptospirose e posteriormente submetidas ao MAT para confirmação da suspeita da doença. Para isso, foi realizada uma mistura de amostras (pool) com dez soros humanos acometidos pela doença, para ser utilizado como controle positivo da reação. O controle negativo é composto pelo soro de um indivíduo que não contraiu a doença.

As amostras negativas avaliadas no teste de diagnóstico desenvolvido, foram oriundas de indivíduos que residem em áreas endêmicas para leptospirose na cidade

de Pelotas. O bairro selecionado pelo projeto de vigilância sanitária foi o Py Crespo, pois por ser carente em saneamento básico, aumenta as chances dos moradores contraírem a doença. Todas essas amostras do bairro Py Crespo foram submetidas ao MAT, onde utilizou-se 14 cepas de leptospira, separadas em duas baterias, compostas por sorovares Canicola, Panama, Ponomo, Copenhageni, Cynopteri, Autumnalis, Patoc, Wolgii, Betaviae, Celledoni, Guaricura, Bratislava, Mozdok 3759 (isolado local) e Tarassovi.

4.1.2) Preparação da proteína rLigBrep

Os fragmentos Lig recombinantes foram amplificados por PCR e clonados no plasmídeo de expressão, pAE, o qual possui uma cauda de histidina da região amino terminal. Após, os plasmídeos foram transformados em E.coli BLR(DE3) (Novagen). As proteínas de histidina serão purificadas através da cromatografia de afinidade, separando-as dos lisados bacterianos. Dessa forma, foram preparadas quantidades suficientes de proteína rLigBrep para a execução do projeto.

4.1.3) Protocolo padrão para realização dos ELISAs indireto

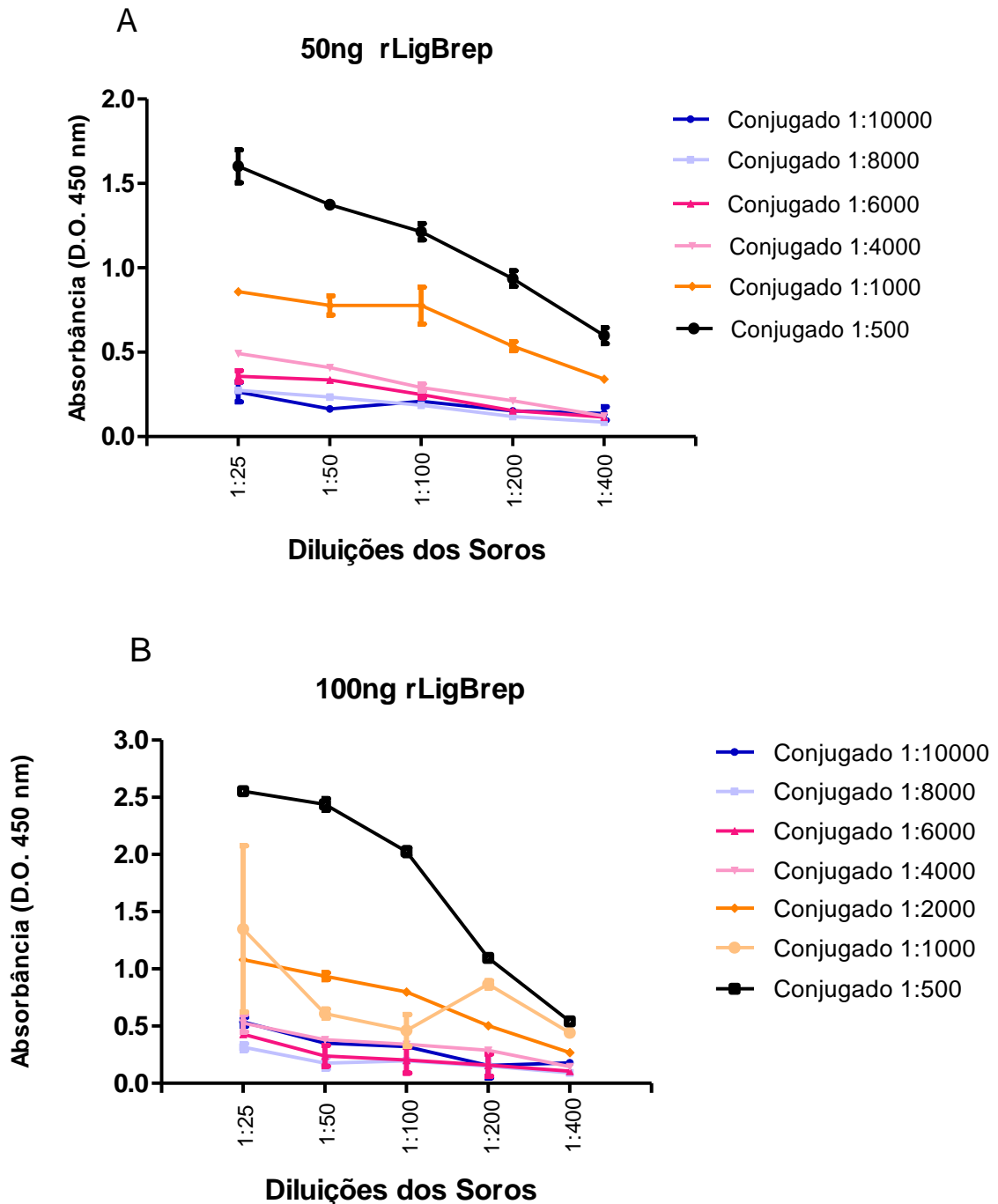
Placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato NUNC Polysorp (Thermo Scientific) foram sensibilizadas por 16 horas a 4°C, com a quantidade de 50 ng por poço do antígeno rLigBrep, diluído em tampão carbonato-bicarbonato com pH=9,6. Os soros foram testados em duplicatas utilizando a quantidade de 50 µL dos soros, em cada cavidade, logo após a placa foi incubada à 37°C por 1 hora. As diluições de soros utilizadas foram de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, sendo que para a padronização dos testes quando utilizou-se o anticorpo IgG, as diluições foram de 1:25 até 1:400. O próximo passo foi adicionar 50 µL por poço do anticorpo anti-gG e anti-IgM humanos, conjugados com peroxidase, diluídos em PBS-T em 1:100000, 1:8000, 1:6000, 1:4000, 1:2000, 1:1000 e 1:500. Posteriormente, as reações foram reveladas com o substrato o-fenilenodiamina (OPD), adicionado de peróxido de hidrogênio, e a placa armazenada no escuro por 15 minutos. A absorbância foi avaliada a 450nm usando um leitor de placas de ELISA. Entre as diferentes etapas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (0,05% de Tween 20).

Inicialmente, foram selecionadas as quantidades de 50ng e 100ng da proteína rLigBrep. Após, esses antígenos foram avaliados através de análises tipo *checkerboard* no formato ELISA, objetivando o estabelecimento da concentração ótima de antígeno e a diluição ideal de soros e do anticorpo anti-humano IgG. Para a realização dessa avaliação, utilizou-se um pool com dez soros de humanos positivos para leptospirose, os quais foram previamente submetidos ao MAT e caracterizados positivos.

5) RESULTADOS

5.1) Seleção da quantidade de antígeno, de soros e de anticorpo IgG

Na figura 1 é possível analisar as diferentes diluições do pool de soros positivos e diluições do anticorpos IgG.



Diante dos resultados do *checkerboard* utilizando as quantidades de rLigBrep de 50ng e 100ng, foi selecionada como ideal a de 50ng. Isso porque os resultados referentes a essa quantidade foram satisfatórios e também por usar uma menor quantidade de rLigBrep. No que se refere aos soros, selecionou-se a diluição de

1:100, em razão de que permitiu discriminar com clareza os soros, pois o intervalo de absorbância entre os soros positivos e os negativos foi considerável. Em relação ao anticorpo anti-IgG humano, optou-se pela utilização da diluição de 1:1000, pois possibilitou a diferenciação com precisão dos soros positivos e dos soros negativos para leptospirose.

5.2) Seleção da quantidade de soro e de anticorpo IgM

Como foi estabelecido anteriormente a quantidade ideal de antígeno como sendo a de 50ng, nessa etapa foram realizadas várias diluições do anticorpo anti-humano IgM. Na Figura 2 é possível verificar o *checkerboard* com as diluições do anticorpo secundário variando de 1:10000 até a diluição 1:1000. Também foram utilizados pool de soros humanos positivos para leptospirose, previamente sujeito a análise por MAT.

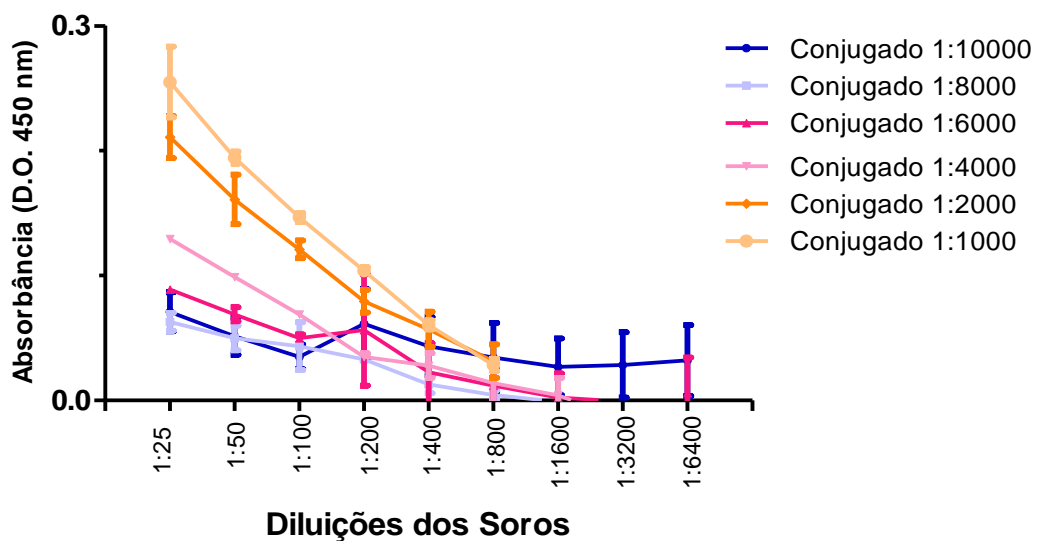


Figura 2. *Checkerboard* com pool positivo e anticorpo anti-humano IgM conjugado com peroxidase. Diluições seriadas do pool de soros positivos em escala geométrica de razão dois. Diluições do anticorpo anti-humano IgM iniciando em 1:100 e encerrando em 1:10000.

Tendo em vista os resultados obtidos com o *checkerboard* do anticorpo anti-humano IgM, pode-se concluir que a melhor diluição foi a 1:1000. No que diz respeito a diluição dos soros, foi escolhido como ideal a 1:100.

Esse resultado foi confirmado através de outro teste de ELISA utilizando um pool de soros positivos e um pool de soros negativos, com as diluições 1:500, 1:1000 e 1:200 do anticorpo secundário IgM (Figura 3).

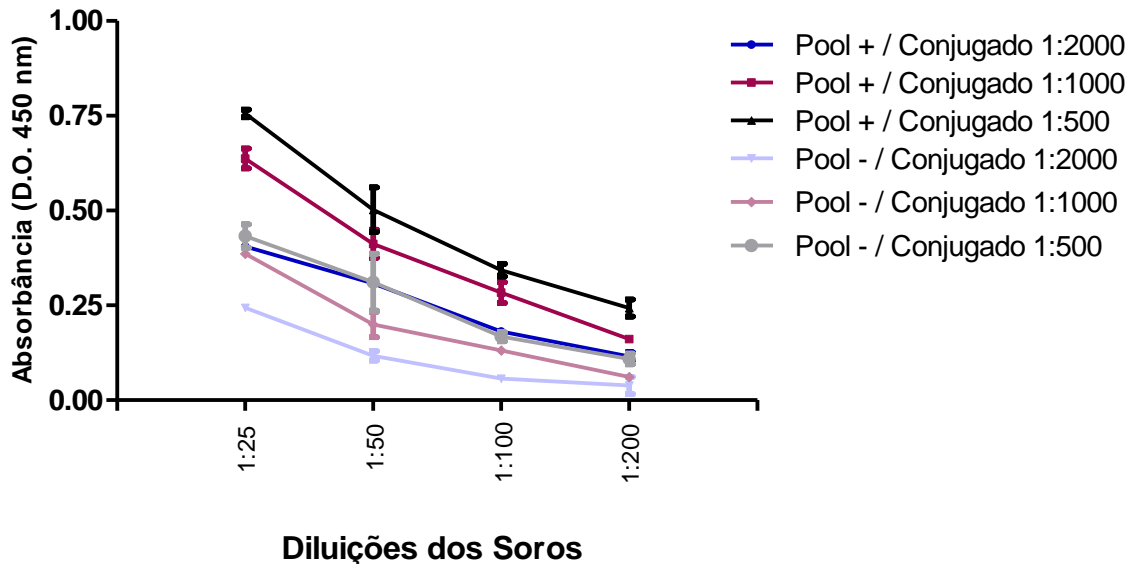


Figura 3. Teste de ELISA para confirmação da padronização do anticorpo IgM conjugado com peroxidase. Diluições seriadas do pool de soros positivos e negativos de 1:25 até 1:200. Diluições do anticorpo de 1:200 até 1:500 para ambos soros.

Com os resultados obtidos no teste inicial da padronização demonstrado na Figura 2, foi possível realizar a confirmação dos dados obtidos anteriormente, podendo ser visto na Figura 1. Observou-se que a diluição 1:1000 do anticorpo IgM e a diluição 1:100 dos soros, foram capazes de distinguir os positivos dos negativos para leptospirose, visto que, a média das absorbâncias dos soros positivos na diluição 1:100 foi de 0,28 e dos soros negativos também na diluição 1:100 foi de 0,13.

5.3) Desenvolvimento do ELISA avaliando soros humanos utilizando anticorpo IgG

Já estabelecidos as diluições de soro e de anticorpo, foram realizadas as análises através do teste de ELISA dos soros humanos individuais. Para isso, uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 50 ng de rLigBrep diluída

em tampão carbonato-bicarbonato. Foram avaliados 12 soros individuais positivos oriundos da FIOCRUZ de Salvador e 24 soros individuais negativos obtidos no bairro Py Crespo de Pelotas, todos previamente submetidos ao teste padrão-ouro de diagnóstico, o MAT (Figura 4). Os soros individuais foram testados na diluição 1:100 e o anticorpo IgG de 1:1000.

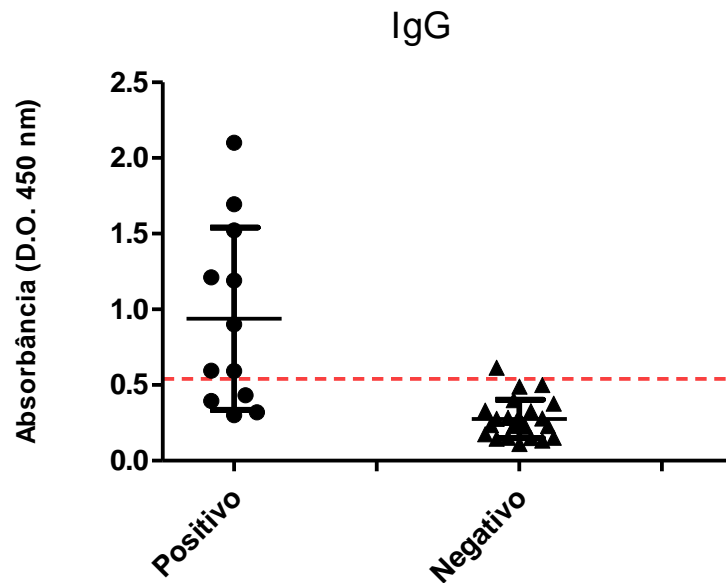


Figura 4. Avaliação de soros individuais utilizando a quantidade de 50ng de rLigBrep, diluição de soro 1:100 e anticorpo anti-IgG de 1:1000. A linha pontilhada vermelha se refere ao valor do *Cut-off* do teste.

O valor do *Cut-off* é 0,54 (média dos negativos + 2 vezes o desvio padrão), sendo representado na figura acima como sendo a linha vermelha. Através da avaliação individual das amostras, foi possível detectar como positivos 8 soros individuais (os quais foram analisados anteriormente pelo teste MAT) e 23 soros individuais como sendo negativos (os quais adquiriram títulos de MAT igual a 100). Sendo assim, a sensibilidade desse teste é de 66,7% e a especificidade de 95,8%.

Todavia, essa medida pode ser alterada dependendo da quantidade de multiplicação do valor do desvio padrão, com o intuito de melhorar os resultados do teste, sendo tanto no valor da sensibilidade ou da especificidade, o que pode ser visualizado na Curva ROC. Essa curva é usada para determinar o ponto de corte de sensibilidade e especificidade ideal alcançado pelo ensaio, ou seja, reflete os melhores resultados do teste para distinguir entre pacientes com e sem a doença (XUE E TING, et al.,2014). Quando se usa, hipoteticamente, o valor de *Cut-off* como

sendo três vezes o desvio padrão somando ao valor da média dos negativos, os valores de sensibilidade e especificidade se alteram, conforme visto na Curva de ROC (Figura 5). Pode ser visto também essa diferença na tabela anexada a análise de ROC (Tabela 1).

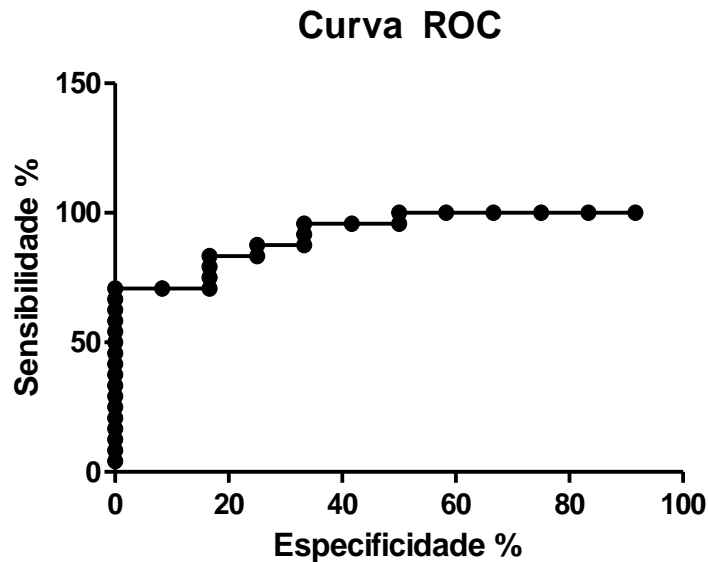


Figura 5. Curva ROC utilizando o anticorpo IgG, mostrando a variação de porcentagem de sensibilidade e especificidade.

Tabela 1: Variação do valor do *Cut-off* e consequentemente, mudança nos valores de sensibilidade e especificidade.

| Análise ROC | | |
|-------------------------|-------------------|--------------------|
| Valor do <i>Cut-off</i> | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) |
| <0,2392 | 100 | 45,8 |
| <0,5465 | 66,7 | 95,8 |
| <0,7583 | 50 | 100 |

Através da análise do gráfico apresentado na figura 6, é possível verificar a diferença de sensibilidade e especificidade de acordo com o valor do *Cut-off* estabelecido. Nesse caso, o valor estipulado foi de 0,54, mostrando valores de sensibilidade e especificidade condizentes com a tabela 1. Porém, se diminuirmos o valor do *Cut-off* para 0,2392 com o objetivo de melhorar a sensibilidade, consequentemente a porcentagem de especificidade diminui, como no caso, para 45,8%. E ocorre o contrário quando aumenta-se o valor do *Cut-off* para 0,7583, como pode-se notar na tabela 1, a especificidade se torna 100%, todavia a sensibilidade suaviza para 50%.

5.4) Desenvolvimento do ELISA avaliando soros humanos utilizando o anticorpo IgM

Uma vez estabelecido a quantidade de rLigBrep e diluições dos soros e do anticorpo IgM, foram realizados testes avaliando soros individuais positivos e negativos para a doença de leptospirose. Para isso, foi realizado a sensibilização da placa de poliestireno utilizando a quantidade de 50ng de rLigBrep e os soros testados foram diluídos em 1:100 em PBS-T e o anticorpo IgM foi diluído em 1:1000. Foram testados os mesmos soros avaliados anteriormente para o anticorpo IgG, ou seja, 12 soros individuais positivos e 24 soros individuais negativos (Figura 6).

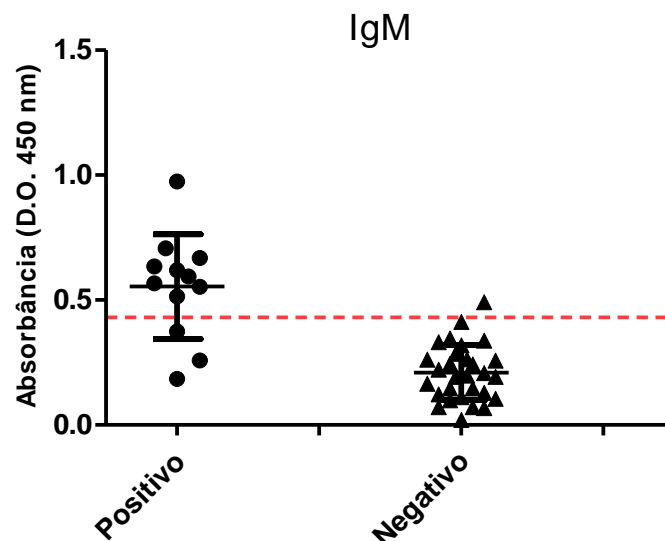


Figura 6. Avaliação dos soros individuais nas diluições de soro 1:100 e de anticorpo IgM 1:1000, utilizando a quantidade de 50ng de rLigBrep. O *Cut-off* é representado no gráfico através da linha pontilhada vermelha.

Na avaliação de anticorpos IgM com soros individuais, foram reconhecidos como positivos 9 soros do total de 12 soros testados (soros esses que foram positivos para o MAT) e também capaz de detectar 23 soros individuais como negativos do total de 24 (os quais apresentaram títulos de MAT igual a 100). Isso porque o valor do *Cut-off* é de 0,43 (média dos negativos + 2 vezes o desvio padrão). Sendo assim, a sensibilidade foi de 75% e especificidade de 95,8%.

Em relação aos valores para o anticorpo IgM, foi escolhido o *Cut-off* como 0,43, resultando em sensibilidade de 75% (reconheceu 9/12 soros individuais como

positivos) e especificidade de 95,8% (reconheceu 23/24 soros negativos para leptospirose). Esses valores podem melhorar conforme a alteração no valor do *Cut-off*, como pode-se visualizar na figura 7 e na tabela 2.

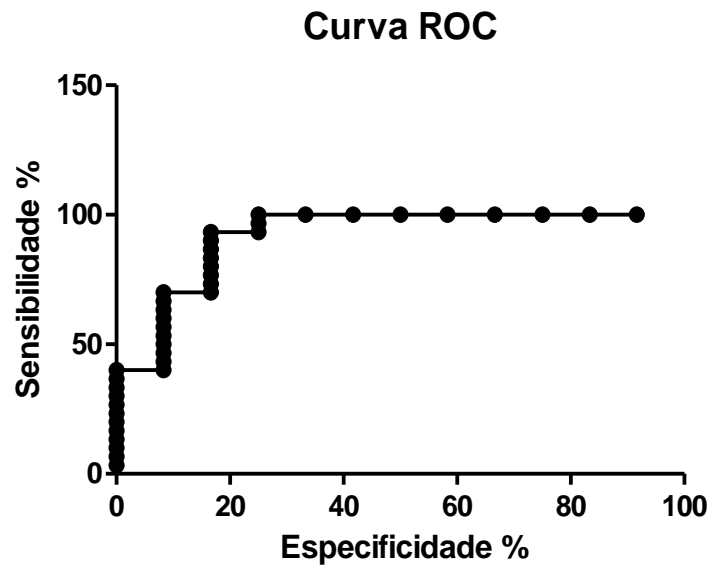


Figura 7. Curva ROC utilizando o anticorpo IgM, evidenciando a variação dos valores em porcentagem da sensibilidade e especificidade.

Tabela 2. Diferentes valores de *Cut-off* com interferência nas porcentagens de sensibilidade e especificidade.

| Análise ROC | | |
|-------------------------|-------------------|--------------------|
| Valor do <i>Cut-off</i> | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) |
| <0,1755 | 100 | 40 |
| <0,4311 | 75 | 95,8 |
| <0,5598 | 58,3 | 100 |

Visualizando as figuras 7 e a tabela 2, pode-se perceber que os valores de sensibilidade e especificidade estão diretamente relacionados com o valor do *Cut-off* escolhido. No teste, optou-se pelo valor de 0,43, e como visto na Tabela 2, a sensibilidade e especificidade correspondem a 75% e 95,8%, respectivamente. Porém, se diminuirmos o valor do *Cut-off* para 0,1755 obtêm-se um melhor resultado de sensibilidade, com reconhecimento de todos os soros positivos analisados. Porém, a especificidade diminui drasticamente para 40%. Por outro lado, se o intuito é

melhorar a especificidade do teste para identificar os 24 soros negativos utilizados, a sensibilidade enfraquece para 58,3%. Com isso, percebe-se a importância do *Cut-off* no desenvolvimento de um teste diagnóstico.

6. DISCUSSÃO

A leptospirose é muitas vezes diagnosticada erroneamente como sendo outras doenças febris, devido à falta de um teste de diagnóstico eficaz para essa doença. Além disso, o teste padrão-ouro para a leptospirose, o MAT, na maioria das vezes possui baixa sensibilidade na fase aguda e se torna difícil de ser utilizado como uma forma de diagnóstico para um rápido tratamento do paciente (RICA, 2007; VALVERDE et al., 2007). Em virtude disso, existe a necessidade do desenvolvimento de melhores testes diagnósticos para a leptospirose, pois estes contribuirão na detecção de casos de leptospirose e conseqüentemente um controle maior acerca da doença, beneficiando a saúde pública (HARTSKEERL et al., 2011). Sendo assim, para o desenvolvimento de novos testes de diagnósticos, é importante selecionar um antígeno o qual seja altamente conservado entre as diversas espécies patogênicas de *Leptospira* (GUERREIRO et al., 2001). Com esse intuito, proteínas recombinantes imunogênicas são uma alternativa de uso em testes sorológicos que utilizem antígenos brutos (CULLEN et al., 2004).

Sendo assim, no presente trabalho, a proteína recombinante rLigBrep foi empregada como antígeno nos diferentes testes de ELISA realizados. Isso porque, a proteína rLigBrep é amplamente conservada e presente somente em espécies patogênicas da bactéria (CRODA et al., 2007). Nos ensaios de ELISA efetivados, utilizou-se um banco de soros humanos bem caracterizados, o qual era constituído por indivíduos saudáveis e por aqueles acometidos pela doença. Nesses testes, aplicou-se o uso dos anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanos, avaliados separadamente para os mesmos soros individuais, nas diluições 1:1000 para ambos anticorpos. Foi escolhido o uso desses dois anticorpos, devido a importância de cada um em fases específicas da doença. Ou seja, foi escolhido a detecção do anticorpo IgM principalmente pelo fato dele estar relacionado com a fase inicial da doença (fase aguda) e foi empregado a detecção do anticorpo IgG, pois os níveis desse anticorpo são mais elevados na fase tardia da doença (fase convalescente), e em muitos casos,

os indivíduos são diagnosticados nessa etapa (LAI et al., 2014; WAGGONER et al., 2014).

Tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos até o momento e planejando futuros testes com novos soros, o intuito é alcançar ótimos saldos para posteriormente, conseguir a patente e conseqüentemente, a disponibilidade comercial. Isso por dois motivos principais, sendo que o primeiro se refere a falta de testes diagnósticos disponíveis no Brasil e por último, a baixa reação desses testes já existentes em diferentes localidades do país. Isto é, atualmente não existe nenhum teste de diagnóstico de leptospirose humana disponível para comercialização no Brasil, pois testes como o desenvolvido pela Bio-Manguinhos, o DDP Leptospirose, não foi aprovada pelo Ministério da Saúde. Isso faz com que tenhamos que importar novos testes, causando altos custos para quem os adquirirem. Além de que, os sorovares de leptospira utilizados na composição desses testes, na grande maioria são diferentes dos presentes em locais que possuem a presença de leptospirose. Portanto, devido a essas adversidades relacionadas ao diagnóstico da leptospirose, pretende-se, após análises com um maior número de soros, tornar o teste diagnóstico baseado em ELISA desenvolvido nesse trabalho, disponível para comercialização, na tentativa de amenizar os problemas decorrentes de outros testes. Problemas esses como a falta de sensibilidade e especificidade conseqüente do antígeno utilizado. No caso do teste de ELISA desenvolvido neste estudo, isso seria diminuído pelo uso da proteína rLigBrep, por ser conservada apenas entre as espécies patogênicas da bactéria.

Em relação a sensibilidade e especificidade desse teste de ELISA, quando empregou-se o uso do anticorpo anti-IgG, obteve-se a capacidade de detectar 8 soros positivos individuais, em um banco contendo 12 soros, ocasionando a sensibilidade de 66,7%. Em relação ao valor da especificidade, obteve-se um melhor resultado, ou seja, foi capaz de identificar 23 soros de um total de 24 soros individuais negativos, resultando em um valor de 95,8% de especificidade. Porém, esses valores foram obtidos utilizando o valor de *Cut-off* decorrente da soma do valor da média dos negativos mais duas vezes o valor do desvio padrão.

7. CONCLUSÕES

- A quantidade de 50 ng de antígeno rLigBrep é a ideal para ser utilizada.

- O ELISA com o anticorpo anti-IgG humano obteve sensibilidade de 66,7% e especificidade de 95,8%. Enquanto que o ELISA com o anticorpo anti-IgM humano apresentou sensibilidade e especificidade de 75% e 95,8%, respectivamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESIYUN, A. A., BABOOLAL, S., SUEPAUL, S., DOOKERAN, S., & STEWART-JOHNSON, A. Human leptospirosis in the Caribbean , 1997 – 2005 : characteristics and serotyping of clinical samples from 14 countries. **Infect Immun**. 29(6), 350–357. 2011.
- ADLER, B., & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140(3-4), 287–96. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012. 2010.
- BAJANI, M. D.; ASHFORD, D. A.; BRAGG, S. L.; WOODS, C. W.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; PLIKAYTIS, B. D.; PERKINS, B. A.; PHELAN, M.; LEVETT, P. N. e WEYANT, R. S. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.41, n.2, p. 803-9. 2003.
- BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L. e ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, v.78, n.7, p. 3207-16. 2010.
- BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L. e RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect Immun**, v.70, n.12, p. 6926-32. 2002.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICALDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., ... VINETZ, J. M. REVIEWS. Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance, **Journal of Clinical Microbiology**. 757–771. 2003.

BROWNLOW, T., KAVANAGH, O. V., LOGAN, E. F., HARTSKEERL, R. a, SAVAGE, R., PALMER, M. F., ... ELLIS, W. a. "Leptorapide" - a one-step assay for rapid diagnosis of human leptospirosis. **Epidemiology and Infection**, 142(6), 1182–7. doi:10.1017/S0950268813002112. 2014.

BUDIHAL, S. V., & PERWEZ, K. Leptospirosis diagnosis: Competancy of various laboratory tests. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 8(1), 199–202. 2014.

CHEN, H.-W., ZHANG, Z., HALSEY, E. S., GUEVARA, C., CANAL, E., HALL, E., CHING, W.-M. Detection of *Leptospira*-specific antibodies using a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 89(6). 2013.

CRODA, J., RAMOS, J. G. R., MATSUNAGA, J., QUEIROZ, A., HOMMA, A., RILEY, L. W., KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, pp. 1528–34. doi:10.1128/JCM.02344-06. 2007.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol Rev**, v.28, n.3, p.291-318, 2004.

DELLAGOSTIN, O. A, GRASSMANN, A. A, HARTWIG, D. D., FELIX, S. R., da SILVA, É. F., & MCBRIDE, A. J. a. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, 7(11), 1215–24. doi:10.4161/hv.7.11.17944. 2011.

ESTEVEZ, L. M., BULHOES, S. M., BRANCO, C. C., MOTA, F. M., PAIVA, C., CABRAL, R., MOTA-VIEIRA, L. Human leptospirosis: seroreactivity and genetic susceptibility in the population of são miguel island (azores, portugal). **PloS One**, 9(9).2014.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol**, v.5, n.9, p.1413-1425, 2010.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., & PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis Second Edition**.1999.

FELZEMBURGH, R. D. M., RIBEIRO, G. S., COSTA, F., REIS, R. B., HAGAN, J. E., MELENDEZ, A. X. T. O., KO, A. I. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(5), e 2927.2014.

GORIS, M. G. a, LEEFLANG, M. M. G., LODEN, M., WAGENAAR, J. F. P., KLATSER, P. R., HARTSKEERL, R. a, & BOER, K. R. Prospective evaluation of three rapid diagnostic tests for diagnosis of human leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(7).2013.

GORIS, M. G. A., BOER, K. R., KLIFFEN, S. J., HARTSKEERL, R. A., EUROPE, I., SURVEILLANCE, P., Human Leptospirosis Trends, the Netherlands, **J Bacteriol Parasitol**. 1925–2008, 19(3).2013.

GUERRA, M. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 41(5), 295–7. 2013.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I. e HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun**, v.69, n.8, p. 4958-4968. 2001.

HARTSKEERL, R. a, COLLARES-PEREIRA, M., & ELLIS, W. a. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 17(4), 494–501.2011.

KO, A. I., GOARANT, C., & PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, 7(10), 736–47.2009.

KO, A. I., REIS, M. G., DOURADO, C. M. R., Jr, W. D. J., & RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil, **Lancet**. 354, 820–825.1999.

LAI, C.H., CHANG, L.L., LIN, J.N., TSAI, K.H., HUNG, Y.C., KUO, L.L. CHEN, Y.H. Human spotted fever group rickettsioses are underappreciated in southern Taiwan, particularly for the species closely-related to *Rickettsia felis*. **PloS One**, 9(4). 2014.

- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(2), 296–326.2001.
- MCBRIDE, A. J. A, PEREIRA, F. A, DA SILVA, E. D., DE MATOS, R. B., DA SILVA, E. D., FERREIRA, A. G. P., KO, A. I. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospire assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Clin Vaccine Immunol**, 102(3), 206–11. 2007
- MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. a, REIS, M. G., & KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 18(5), 376–386. 2005.
- MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J. e NALLY, J. E. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. **Infect Immun**, v.76, n.11, p. 4952-8. 2008.
- PAPPAS, G., & CASCIO, A. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 28(6), 491–6. 2006.
- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULOUDIS, A. N., DURSKI, K., & HARTSKEERL, R. a. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 78(1), 1–8.2014.
- RICA, C. Development of a Lepto-IgM EIACR test to diagnose leptospirosis disease in Costa Rican patient samples. **Clin Microbiol Vet.** 48(3), 295–304. 2007.
- RICALDI, J. N.; VINETZ, J. M. Leptospirosis in the tropics and in travelers. **Curr Infect Dis Rep**, v.8, n.1, p.51-58, 2006.
- STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A. e HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, v.2, n.11, p. e1188. 2007.
- VALVERDE, M., LEON, B., TAYLOR, L., VISONA, K. Delelopment of Lepto-IgM EIACR test to diagnose leptospirosis disease in Costa Rican patient samples. **Invest Clin**, 48(3):295 – 304, 2007

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P. e SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J Biosci**, v.33, n.4, p. 557-69. 2008.

WAGGONER, J. J., BALASSIANO, I., ABEYNAYKE, J., SAHOO, M. K., MOHAMED-HADLEY, A., LIU, Y., PINSKY, B. a. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. **PloS One**, 9(11), 2014.

WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2002.

WHO. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. 2011.

XUE E TING, T., Amran, F., Chee Cheong, K., & Ahmad, N. In-house ELISA screening using a locally-isolated *Leptospira* in Malaysia: determination of its cut-off points. **BMC Infectious Diseases**, 14(1), 563. 2014.