Roberta Morozetti Blanco

**Padronização e avaliação do Teste de Dot-blot IgM para o
sorodiagnóstico da leptospirose humana**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Profa. Dra. Eliete Caló
Romero

São Paulo

2021

Roberta Morozetti Blanco

**Padronização e avaliação do Teste de Dot-blot IgM para o
sorodiagnóstico da leptospirose humana**

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Profa. Dra. Eliete Caló
Romero

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Blanco, Roberta Morozetti
Padronização e avaliação do teste de Dot-blot IgM
para o sorodiagnóstico da leptospirose humana /
Roberta Morozetti Blanco. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Eliete Caló Romero.

Descritores: 1. Leptospirose 2. Leptospira
3. Antígenos 4. Fosfatase alcalina 5. Peroxidase
6. Testes sorológicos 7. Dot immunoblotting

USP/FM/DBD-139/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Aos meus pais, Rogério Blanco Peres e Sonia
María de Oliveira Morozetti , meus maiores
exemplos de luta, coragem, honestidade e
lealdade. Por acreditarem nas minhas escolhas e
me apoiarem durante meu caminho.*

*Ao Valner por seu respeito, carinho, amor e
paciência. Por me trazer paz, equilíbrio,
confiança e felicidade.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Eliete Caló Romero, minha orientadora e amiga. Obrigada por dividir seu conhecimento comigo. Agradeço por você ter acreditado em mim e pela nossa amizade, por podermos dividir nossas alegrias e tristezas, pelos conselhos e pelo ensinamento na carreira e na vida;

Ao meu irmão Rodrigo Morozetti Blanco que além de ser um gênio possui uma sensibilidade ímpar. Obrigada pelo apoio incondicional, por me entender sempre e muitas vezes expressar em palavras o que eu mesma não consigo dizer. É inenarrável a incrível experiência de ter nascido sua irmã e também ser sua amiga;

À Roberta Guimarães Peres por ser mais que uma amiga, ser minha irmã e ser meu exemplo de sabedoria, gentileza, acolhimento e integridade. Obrigada por essa amizade plena, baseada em alegria, respeito, admiração e confiança. Obrigada pela cumplicidade, pelo suporte e por dividir os momentos tristes, mas principalmente todos os momentos felizes;

À Thais Cunha de Oliveira e Silva minha amiga inteligente e sensível que é meu exemplo desde criança de justiça, de honestidade, de solidariedade e de empatia. Obrigada por todo apoio e incentivo e por estar sempre pronta pra escutar. Obrigada também pelos conselhos e pela delicadeza. Tenho muito orgulho de ter você como minha melhor amiga de infância;

Ao Marcelo Sansone que foi o melhor presente que a faculdade me deu. Obrigada pela amizade verdadeira, pelas risadas sem fim e pela confiança

mútua. E à Ana Claudia Miranda Sansone, obrigada pela amizade sincera. Obrigada pela oportunidade de poder caminhar junto com vocês o que faz com que a minha vida seja mais rica, mais cheia de amor e mais feliz. Vocês são incríveis;

À Danielle Vedovello e à Flavia Vedovello pelas muitas risadas e divertimento e também pelo apoio nos bons e nos maus momentos. Obrigada por estarem sempre presentes e pela amizade verdadeira;

À Maria Cecília dos Santos Blanco Peres pelo acolhimento e por agregar toda a família. Obrigada pelo apoio de sempre;

À minha irmã Carla Morozetti Blanco e minha sobrinha Rafaela Morozetti Blanco Sinto, pelos encontros felizes e pela torcida de sempre;

Aos meus amigos do Coral Uni e Feliz mês novo, obrigada pela construção dessa amizade com muita música, poesia, alegria e afeto e por trazer alento em nossas festas virtuais nesses tempos sombrios de pandemia;

À Angela Pires Brandão e Juliana Maíra Watanabe Pinhata por compartilharem comigo o desejo de uma sociedade mais justa e pela troca de ideias que me ajudam a ter esperança. À Lucilaine Ferrazoli pelo apoio e torcida e pelas palavras doces e apaziguadoras em momentos de tensão. À Ana Paula Lemos, Samanta Cristine Grassi Almeida, Rosemeire Cobo Zanella Ramos, Rosangela Siqueira de Oliveira, Daniela Leite, Maria Conceição Martins pelo carinho, apoio e torcida durante todo o caminho até aqui.

Aos alunos que tive a oportunidade de orientar por trocarem suas experiências comigo, por permitirem que meus conhecimentos sejam passados adiante e por me ensinarem sempre.

Aos meus companheiros de Pós-graduação Maria de Lourdes Farinas, Gabriela Rodrigues e Fonseca, Marcelo Andreetta Corral, Lauro Perdigão Neto, Luiz Henrique Moraes Caetano de Camargo, Mariana Aschar Ferraz, Natalia Barros Cerqueira e Ana Paula Marchi pela parceria que começou no Workshop, mas que eu espero que dure por muitos anos;

Ao grupo de happy hour anual pelas risadas e desabafos, e pelos encontros valiosos que sempre deixam os dias mais leves;

Aos membros da banca de qualificação, Décio Diamant, Adriana Pardini Vicentini e Amaro Nunes Duarte Neto pelas importantes sugestões que enriqueceram a elaboração desse trabalho;

Ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz e à Camila Mika Kamikawa pela imensa ajuda técnica que foi muito importante para a realização deste trabalho e também pelo acolhimento e ensinamento, pelas dicas, conselhos e discussões tornando o processo muito mais prazeroso;

À Sandra Regina da Silva e à Elaine dos Santos Lima pelo companheirismo, por todo apoio e pelo trabalho em conjunto no laboratório de leptospirose do IAL;

Aos companheiros do Instituto Adolfo Lutz, em especial do Centro de Bacteriologia pelo ótimo convívio, compartilhamento de experiências, pelo apoio e torcida;

À Maria Cecília Outeiro Gorla e à Rosemeire Cobo Zanella Ramos, por permitirem que o trabalho fosse desenvolvido no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo;

À Camila Cardoso de Oliveira e à Ana Carolina Apelle Bortolucci pelas valiosas considerações sobre validação que ajudaram a melhorar o trabalho;

Aos funcionários da Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo serviço exemplar;

Ao programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente às coordenadoras Profa. Dra. Anna Sara Shafferman Levin e Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa e ao apoio da Roseli Antonia Santo, Vânia Regina Miguel e Luiza Maria Vieira de Assis por tornarem possível o desenvolvimento desse trabalho.

“A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação”.

Artigo 196 da Constituição Federal de 1988

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Quadros

Lista de tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Classificação de leptospiras	1
1.2 Biologia e morfologia das leptospiras	2
1.3 Fatores de virulência	4
1.4 Epidemiologia.....	8
1.5 Manifestações Clínicas	9
1.6 Diagnóstico Laboratorial.....	11
1.6.1 Isolamento e identificação de leptospiras.....	13
1.6.2 Métodos moleculares	14
1.6.3 Métodos sorológicos	15
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Teste de aglutinação microscópica (MAT).....	25
3.2 Teste ELISA IgM	27
3.3 Primeira etapa.....	27
3.3.1 Extração de antígenos	27
3.3.1.1 Cepas de leptospiras.....	27
3.3.1.2 Antígeno sonificado	28
3.3.1.4 Antígeno n-butanol.....	29
3.3.2 Amostras de soro.....	29
3.3.3 Teste de Dot-blot IgM.....	30
3.3.3.1 Padronização	30

3.3.3.2 Teste.....	30
3.4 Segunda etapa.....	32
3.4.1 Antígenos	32
3.4.2 Amostras de soro.....	32
3.4.3 Teste de Dot-blot IgM.....	33
3.4.3.1 Padronização	33
3.4.3.2 Teste.....	34
3.4.4 Reprodutibilidade e repetibilidade do teste	35
3.5 Metodologias utilizadas tanto na primeira quanto na segunda etapa	36
3.5.1 Dosagem de proteínas dos antígenos	36
3.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	37
3.5.3 “Immunoblotting”	37
3.5.4 Estabilidade do teste	38
3.6 Terceira etapa	39
3.6.1 Preparação de “kit” de Dot-blot IgM.....	39
3.6.2 Teste Dot-blot IgM.....	39
3.7 Análises estatísticas.....	40
3.8 Aspectos éticos.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Primeira etapa.....	42
4.2 Segunda etapa.....	57
4.3 Terceira etapa	66
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	80
7. ANEXO A	82
8. REFERÊNCIAS.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies de leptospiros por classificação molecular	2
Quadro 2 - Relação se sorovares utilizados no teste de MAT	25
Quadro 3 - Interpretação dos resultados do índice Kappa	41
Quadro 4 - Concentração de proteínas de cada antígeno, detectada pela técnica de Bradford	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concordância entre as visualizações dos resultados do teste Dot-blot IgM interpretados por dois observadores independentes.....	44
Tabela 2 - Resultados da reação de Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina ou peroxidase, realizada com soros de 147 casos de leptospirose e 148 casos controle	48
Tabela 3 - Valores relativos (%) da Sensibilidade (S) e Especificidade (E), observados no Dot-blot IgM com conjugado fosfatase alcalina, utilizando o MAT como referência	50
Tabela 4 - Valores relativos (%) da Sensibilidade (S) e Especificidade (E), observados no Dot-blot IgM com conjugado peroxidase, utilizando o MAT como referência.....	51
Tabela 5 - Resultados dos testes MAT e Dot-blot IgM, realizados em soros dos 147 casos de leptospirose, segundo os prováveis sorogrupos infectantes	53
Tabela 6 - Sensibilidade do Dot-blot IgM em relação aos dias após início dos sintomas.....	54
Tabela 7 - Resultados do Dot-blot IgM segundo a titulação do MAT nas segundas amostras de soro de casos confirmados de leptospirose.	56
Tabela 8 - Resultados reagentes dos testes Panbio® Leptospira IgM ELISA e de Dot-blot IgM aplicadas às primeiras amostras* de soros dos casos de leptospirose.....	57

Tabela 9 - Resultados do teste de Dot-blot IgM, realizado com soros de 124 casos de leptospirose e 143 casos controle.....	61
Tabela 10 - Valores relativos (%) da Sensibilidade (S) e Especificidade (E) observados no Dot-blot IgM, utilizando o MAT como referência	62
Tabela 11 - Resultados dos testes MAT e Dot-blot IgM, realizados em soros dos 124 casos de leptospirose, segundo os prováveis sorogrupos infectantes	63
Tabela 12 - Sensibilidade do Dot-blot IgM em relação aos dias após início dos sintomas.....	64
Tabela 13 - Resultados reagentes no Dot-blot IgM segundo a titulação do MAT nas segundas amostras de soro de casos confirmados de leptospirose.	65
Tabela 14 – Comparação entre os testes Dot-blot IgM com antígeno TR e Panbio® Leptospira IgM ELISA em amostras de soro de pacientes com suspeita de leptospirose.....	66
Tabela 15 – Comparação entre os testes Dot-blot IgM com antígeno TR19 e Panbio® Leptospira IgM ELISA em amostras de soro de pacientes com suspeita de leptospirose.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede de leptospiros	4
Figura 2 - Cinética da leptospirose no sangue e o período de coleta de material biológico.	12
Figura 3 - Algoritmo I: encerramento de caso de leptospirose quando a amostra for colhida antes do 7º dia de sintomas.....	18
Figura 4 - Algoritmo II: encerramento de caso de leptospirose quando a amostra for colhida a partir do 7º dia do início de sintomas.	19
Figura 5 - Fluxograma de etapas realizadas no trabalho para padronização do teste de Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana.....	24
Figura 6 - Interpretação dos resultados do teste de Dot-blot IgM.....	43
Figura 7 - Análise por SDS-PAGE 12,5% corado com “coomassie blue”.....	45
Figura 8 - “Immunoblotting” do antígeno TR2.....	46
Figura 9 - “Immunoblotting” do antígeno TR19.....	47
Figura 10 - Análise por SDS-PAGE 12,5% corado com “coomassie blue”.....	59
Figura 11 - “Immunoblotting” do antígeno TR.....	60

RESUMO

BLANCO RM. *Padronização e avaliação do Teste de Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A leptospirose é uma zoonose com ampla distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp. Os sintomas da leptospirose podem se apresentar de forma bastante inespecífica dificultando o diagnóstico clínico e por isso o diagnóstico laboratorial é fundamental para a confirmação dos casos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi padronizar um teste de Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana. O teste de Dot-blot IgM foi avaliado utilizando antígenos extraídos de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e de *Leptospira biflexa* sorovar Patoc por termo-resistência, n-butanol e sonicação para detecção de anticorpos IgM anti-leptospiras. Além disso, anticorpo anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina foi comparado a anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase. Foram analisadas amostras pareadas de soros de 147 pacientes com leptospirose confirmada pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) que apresentaram soroconversão. Foram analisadas também amostras únicas de soro de 88 pacientes com diferentes patologias e 60 amostras de soro de indivíduos sadios, pertencentes ao grupo controle. Os testes de Dot-blot IgM com antígenos extraídos por termo-resistência e com conjugado fosfatase alcalina apresentaram maiores taxas de sensibilidade, principalmente na fase aguda da doença. Assim, foi realizada uma padronização do teste de Dot-blot IgM com conjugado fosfatase alcalina e antígenos extraídos por termo-resistência de sorovar Copenhageni (TR2) e de sorovar Patoc (TR19) e foi testado também a mistura desses dois antígenos (TR). Foram analisadas amostras pareadas de 124 casos confirmados de leptospirose pelo MAT que apresentaram soroconversão e como grupo controle, 85 amostras únicas de soro de pacientes com outras doenças e 58 soros de indivíduos sadios foram analisadas. Os resultados foram interpretados por dois observadores independentes. Também foram avaliadas a reprodutibilidade e repetibilidade dos testes. O Dot-blot IgM com antígeno TR19 e conjugado fosfatase alcalina apresentou maior taxa de sensibilidade nos primeiros sete dias após o início dos sintomas (60,5%) e por isso se mostrou melhor que os antígenos TR2 e TR. A sensibilidade desse teste variou de 58,1% a 96,0% entre as primeiras e segundas amostras de soro e a especificidade foi de 93,7%. O teste se mostrou consistente com 100% de repetibilidade e reprodutibilidade e com resultado visual confiável, com concordância quase perfeita entre as interpretações dos resultados realizadas por dois observadores independentes. O teste de Dot-blot IgM com antígeno TR19 e conjugado fosfatase alcalina pode ser utilizado como teste de triagem no diagnóstico sorológico da leptospirose humana.

Descritores: Leptospirose; *Leptospira*; Antígenos; Fosfatase alcalina; Peroxidase; Testes sorológicos; Dot Immunoblotting.

ABSTRACT

BLANCO RM. *Standardization and evaluation of the IgM Dot-blot Test for serodiagnosis of human leptospirosis* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Leptospirosis is a zoonosis with a worldwide distribution caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* spp. Symptoms of leptospirosis can be nonspecific, making clinical diagnosis difficult, so laboratory diagnosis is essential to confirm cases. Thus, the aim of this work was to standardize an IgM Dot-blot test for the serodiagnosis of human leptospirosis. The IgM Dot-blot test was evaluated using antigens extracted from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and *Leptospira biflexa* serovar Patoc by thermal-resistance, n-butanol and sonication to detect anti-leptospiral IgM antibodies. In addition, antibody anti human IgM conjugated to alkaline phosphatase was compared to antibody anti human IgM conjugated to horseradish peroxidase. Paired serum samples from 147 patients with leptospirosis confirmed by the microscopic agglutination test (MAT) with seroconversion were analyzed. Single serum samples from 88 patients with different pathologies and 60 serum samples from healthy individuals belonging to the control group were also analyzed. The IgM Dot-blot tests with antigens extracted by thermal-resistance and with alkaline phosphatase conjugate showed higher sensitivity rates, especially in the acute phase of the disease. Thus, a standardization of the IgM Dot-blot test with alkaline phosphatase conjugate and antigens extracted by thermal-resistance from serovar Copenhageni (TR2) and from serovar Patoc (TR19) was carried out and the mixture of these two antigens (TR) was also tested. Paired serum samples from 124 confirmed cases of leptospirosis by MAT with seroconversion were analyzed. The control group consisted of 85 single serum samples from patients with other diseases and 58 sera from healthy individuals. The results were interpreted by two independent observers. The reproducibility and repeatability of the tests were also evaluated. IgM Dot-blot with TR19 antigen and alkaline phosphatase conjugate showed a higher sensitivity rate in the first seven days after the onset of illness (60.5%) and therefore proved to be better than TR2 and TR antigens. The sensitivity of the test ranged from 58.1% to 96.0% between the first and second serum samples and the specificity was 93.7%. The test was shown to be consistent with 100% repeatability and reproducibility and with a reliable visual result, with almost perfect agreement between the interpretations of the two independent observers. The IgM Dot-blot test with TR19 antigen and alkaline phosphatase conjugate can be used as a screening test in the serological diagnosis of human leptospirosis.

Descriptors: Leptospirosis; *Leptospira*; Antigens; Alkaline Phosphatase; Horseradish Peroxidase; Serologic Tests; Dot Immunoblotting.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação de leptospiros

Leptospiros são espiroquetas pertencentes à ordem Spirochaetales e à família *Leptospiraceae*, que compreende três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema*, e *Turneriella*.¹

O gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies pela classificação sorológica, que compreendem leptospiros patogênicos, pertencentes à espécie *L. interrogans* e leptospiros saprófitas, pertencentes à espécie *L. biflexa*. Todas as espécies de leptospiros são divididas em um grande número de sorovares pela análise de sua constituição antigênica, por meio de reações de absorção cruzada de aglutininas (CAAT). Dois ou mais sorovares, antigenicamente relacionados, formam um sorogrupo.^{2,3}

A espécie *L. interrogans* compreende 24 sorogrupos e mais de 300 sorovares enquanto que *L. biflexa* compreende 38 sorogrupos com mais de 60 sorovares. As variações dos carboidratos da cadeia lateral do lipopolissacarídeo (LPS) são responsáveis pela diversidade antigênica dos sorovares das leptospiros.^{1,2,4}

A classificação sorológica das leptospiros tem sido substituída pela classificação molecular e com isso novas espécies foram descritas nos últimos anos.⁵⁻¹¹ Atualmente, o gênero *Leptospira* possui 22 genomoespécies classificadas por hibridização DNA-DNA e divididas em leptospiros

patogênicas, intermediárias e não patogênicas.^{1,4} O quadro 1 mostra a classificação molecular das leptospiros.

Quadro 1 - Espécies de leptospiros por classificação molecular

Patogênicas	Intermediárias	Não patogênicas
<i>L. alexanderi</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. alstonii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. idonii</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. terpstae</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. kmetyi</i>		<i>L. wolbachii</i>
<i>L. mayottensis</i>		<i>L. yanagawae</i>
<i>L. noguchii</i>		
<i>L. santarosai</i>		
<i>L. weilii</i>		

1.2 Biologia e morfologia das leptospiros

As leptospiros são organismos helicoidais, medindo de 10 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro aproximadamente. Apresentam uma ou as duas extremidades em forma de gancho e se movimentam através de flagelos (filamentos axiais) ancorados no espaço periplásmico, que proporcionam movimentos rotacionais.¹² Podem ser de vida livre ou patogênicas para homens e outros animais.^{2,3,13} Por serem muito finas, são visualizadas por microscópio de campo escuro ou contraste de fase e não são facilmente coradas. São bactérias fastidiosas, com tempo de geração de 6 a 16 horas, crescimento ótimo em pH 7,2 – 7,6 e temperatura ótima de crescimento de 28°C a 30°C.

São aeróbias estritas e utilizam sais de amônia como fonte de nitrogênio, ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e purinas. Podem ser cultivadas em meios artificiais, líquidos ou semissólidos, contendo soro ou albumina e polissorbato.^{2,3,14}

As leptospiras possuem estrutura típica de outras espiroquetas, onde a membrana citoplasmática interna é intimamente associada à camada de peptidoglicana e sobrepostas pela membrana externa. O LPS é o principal componente da superfície da célula e tem uma composição semelhante à de outras bactérias Gram negativas, mas possui menor atividade endotóxica, sendo 12 vezes menor em camundongos quando comparado ao LPS de *E. coli*, porém podendo causar hemorragia nesses animais, além de ativar macrófagos.^{2,3,15} Além do LPS, a membrana externa é composta por diversas proteínas, como mostra a figura 1.

Fonte: Haake e Zückert (2015)¹⁶

Figura 1 - Estrutura da parede de leptospiros. A membrana externa contém lipopolissacarídeos, lipoproteínas tais como LipL21, Loa22 e LigA, e proteínas de transmembrana tais como FecA, OmpL1, TolC. O peptidoglicano e os flagelos periplásmicos (PF) estão localizados no periplasma.

O genoma das leptospiros é maior do que de outras espiroquetas e são constituídos de pelo menos dois cromossomos circulares de tamanhos diferentes. Aproximadamente um terço dos genes de *L. biflexa*, espécie saprófita, está ausente em leptospiros patogênicas e 2.052 genes são compartilhados por leptospiros patogênicas e saprófitas sendo, portanto, comum ao gênero *Leptospira*.^{17,18}

1.3 Fatores de virulência

Os mecanismos de patogenicidade envolvidos na leptospirose ainda não estão claros, porém vários fatores de virulência têm sido identificados, principalmente após o sequenciamento completo do genoma de leptospiros,

incluindo LPS, hemolisinas, moléculas envolvidas na adesão, proteínas de membrana externa (OMPs) e outras proteínas de superfície.^{2,17,27–29,19–26}

A adesão das leptospiiras no tecido do hospedeiro é a primeira etapa para que haja a infecção e patogênese na leptospirose. Estudos têm demonstrado o papel de diferentes proteínas, entre elas Lp95, Lsa21, Lsa63, Lsa23, Lsa26 e Lsa36, capazes de aderir em componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina, elastina e fibronectina. Além disso, muitas dessas proteínas aderem ao plasminogênio, podendo transformá-lo em plasmina, sua forma ativa, e a componentes reguladores do sistema complemento. Foi demonstrado também que *L.interrogans* aderem a caderinas de células endoteliais.^{19–21,29–32}

LipL32 é a principal e mais estudada lipoproteína de leptospiiras. Estudos recentes demonstraram que essa lipoproteína está localizada na camada periplasmática e não na superfície da membrana externa, como era descrito anteriormente.³³ É altamente conservada nas espécies patogênicas e está ausente nas espécies saprófitas. Tem capacidade de se ligar ao colágeno, à laminina e fibronectina e é expressa durante a infecção humana. Apesar disso, cepas de leptospiiras com mutações no gene lipL32 não apresentaram diferença das cepas selvagens quanto à morfologia, crescimento, características de adesão e virulência em modelos animais.^{21,29}

Leptospiiras patogênicas expressam na sua superfície proteínas denominadas de imunoglobulinas-like (Lig), entre elas as LigA e LigB. A proteína LigB está presente em todas as leptospiiras patogênicas e tanto LigA como LigB são capazes de aderir a componentes da matriz extra celular como

elastina, tropoelastina, colágenos, laminina e principalmente em fibronectina. Além disso, experimentos utilizando *L. biflexa* geneticamente modificada para expressar LigA e/ou LigB demonstraram que essas leptospiros saprófitas aderiram mais fortemente às células eucarióticas, à fibronectina e às proteínas do sistema complemento. Entretanto, mutação genética com “knockout” do gene *ligB* não afetou a virulência e a colonização de leptospiros em hamsters e ratos infectados.^{21,29,34,35}

Loa 22 foi o primeiro fator de virulência descrito geneticamente em leptospiros. É uma lipoproteína de membrana externa e foi demonstrado que cepas com mutações no gene que codifica essa proteína, perderam a virulência em experimentos com animais suscetíveis à leptospirose.³⁶

A Len A é uma proteína similar à endostatina e é capaz de interagir com fator H humano (FHR-1). Sendo o fator H um regulador de fase fluida que desempenha um papel vital durante a ativação de via alternativa do complemento no sistema imunológico do hospedeiro, a Len A tem papel na resistência das leptospiros patogênicas à morte mediada pela via alternativa do sistema complemento. Além disso, resíduos de lisina encontrados em Len A têm a capacidade de se ligar ao plasminogênio, gerando a plasmina enzimaticamente ativa na superfície das leptospiros, podendo prejudicar os tecidos do hospedeiro pela degradação da matriz extracelular.¹²

Diversas hemolisinas têm sido encontradas em leptospiros e seus papéis na patogenicidade têm sido amplamente estudados. Foram encontrados vários genes que codificam esfingomielinases que demonstraram ter atividades citotóxicas, causando lise em eritrócitos e danos em células endoteliais. A

ausência dessas esfingomielinases em cepas saprófitas sugere que elas exercem papel na virulência e patogenicidade²¹.

As leptospiros expressam uma glicolipoproteína (GLP) que exerce efeito tóxico intercalando sua porção lipídica com ácidos graxos e fosfolípidos de membrana, levando ao extravasamento do conteúdo celular. Além disso, exerce efeito inibidor sobre o hormônio antidiurético e está associada ao agravamento das lesões nas etapas mais avançadas da leptospirose, sendo muito importante na patogenicidade da doença.³⁷⁻³⁹

O LPS desempenha um importante papel na virulência de leptospiros patogênicos, sendo a expressão de LPS intacto essencial para a sobrevivência dessas bactérias tanto dentro como fora do hospedeiro.^{16,40} LPS de leptospiros é formado de lípide A, polissacarídeo e núcleo, assim como LPS de outras bactérias, porém, o lípide A possui um único fosfato que é metilado. Os fosfatos metilados são extremamente incomuns na biologia e não foram previamente observados em outros lípidos A até o momento.¹⁶ Foi demonstrado que LPS de leptospiros ativa os macrófagos humanos através dos receptores Toll-Like 2 (TLR2), diferentemente de outras bactérias Gram negativas que ativam os receptores Toll-Like 4 (TLR4), devido à essa composição incomum, do lípide A. Porém, em camundongos, o LPS dessas bactérias é reconhecido tanto por TLR2 quanto por TLR4, sendo esse mecanismo crucial para controlar a leptospirose nesses animais considerados portadores sãos de leptospiros⁴¹. A falha do TLR4 humano em reconhecer o LPS de leptospiros pode ser um dos motivos pelos quais os seres humanos são hospedeiros acidentais e podem desenvolver infecções graves e com alta letalidade.¹⁶

1.4 Epidemiologia

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas mundialmente. Estima-se que ocorram anualmente 1.03 milhões de casos e 58.900 mortes por leptospirose em todo o mundo.⁴² No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória, com ocorrência de aproximadamente 3.700 casos e 357 óbitos por ano, sendo o maior número na região sudeste do país.⁴³

É uma doença sazonal ocorrendo predominantemente nos períodos de chuva, sendo a incidência significativamente mais alta em países de clima quente devido à longa sobrevivência das leptospirosas no meio ambiente em temperaturas quentes e condições úmidas.^{3,44,45} No Brasil a leptospirose é endêmica, com ocorrência de epidemias urbanas após enchentes e inundações e está diretamente relacionada à falta de saneamento básico, às aglomerações populacionais de baixa renda e às altas infestações de roedores. Acomete principalmente indivíduos do sexo masculino entre 21 e 50 anos, ou seja, ainda em idade produtiva, tendo uma enorme importância social e econômica por causa dos altos custos de internação e perdas de dias de trabalho.^{44,46,47}

A leptospirose também pode estar associada a riscos ocupacionais, ocorrendo principalmente em agricultores que trabalham em campos alagados, trabalhadores do serviço de esgoto e minas e profissionais que trabalham em contato direto com animais, como profissionais de laboratório, veterinários e açougueiros. Além disso, a doença também pode estar relacionada a atividades de recreação, tais como natação, canoagem e pesca.^{2,3,48}

Diversas espécies de animais podem servir de reservatório para leptospirosas, incluindo animais selvagens, domésticos e sinantrópicos, como

caninos, suínos, equinos, bovinos, ovinos e caprinos. Porém, o principal reservatório são os pequenos roedores, sendo as espécies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* os mais importantes na disseminação da doença, por serem portadores sãos e apresentarem leptospiúria prolongada, eliminando leptospiras vivas no ambiente e contaminando solos, água e alimentos.^{2,3,45,48,49} Os sorovares de leptospiras normalmente estão associados com hospedeiros específicos e com a gravidade da doença, sendo portanto, importante conhecer os sorovares prevalentes e seus reservatórios em cada região. Os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, são os de maior circulação nos centros urbanos no Brasil, sendo o *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto) o principal portador.^{13,44,47,49,50}

O homem é um hospedeiro terminal e acidental da doença e a transmissão pode ocorrer de forma direta, através de contato com órgãos, sangue e ou urina de animais infectados ou mais comumente de forma indireta, através de água e solo úmido contaminados com urina de animais infectados. A transmissão de homem para homem é rara e não tem importância epidemiológica. A penetração do microrganismo ocorre em lesões na pele ou através da pele íntegra imersa em água por longo tempo ou através de mucosas.^{45,46}

1.5 Manifestações Clínicas

O período de incubação da leptospirose é de 1 a 30 dias, ocorrendo mais frequentemente entre o quinto e o décimo quarto dia. Em humanos, pode manifestar-se de várias formas, desde quadros assintomáticos, passando por

formas anictéricas de gravidade moderada, até formas severas e potencialmente fatais.^{3,46}

Independente do sorovar infectante, a leptospirose humana, em geral, apresenta uma evolução bifásica, dividida em fase precoce ou leptospirêmica e fase tardia ou fase imune.^{2,3}

A fase precoce da doença, na qual as leptospiras podem ser encontradas na circulação sanguínea e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR), é caracterizada por sintomas como febre, mialgia, calafrio, cefaleia, anorexia, náuseas e vômitos. Podem ocorrer diarreia, artralgia, problemas oculares e tosse. Exantema, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia também podem ocorrer, porém são sintomas menos comuns. Essa fase tende a ser autolimitada podendo regredir em três a sete dias, sem deixar sequelas. Apesar de essa fase corresponder a aproximadamente 90% das apresentações clínicas da leptospirose, por apresentar sintomas inespecíficos e semelhantes a outras doenças como gripe, dengue, febre maculosa e febre amarela, apenas uma pequena parte dos casos é identificada e notificada. Em 10 a 15% dos casos, a doença evolui para a fase tardia, com apresentação de manifestações clínicas graves, chamada de Síndrome de Weil, com comprometimento de múltiplos órgãos e presença de icterícia, insuficiência renal e hemorragias, sendo a mais importante a hemorragia pulmonar. Essas apresentações clínicas podem ocorrer de forma concomitante ou isoladamente. O sorogrupo Icterohaemorrhagiae foi associado à presença de icterícia e às formas mais graves da leptospirose.^{2,3,14,45,46,51}

A hemorragia pulmonar associada à leptospirose foi descrita pela primeira vez em 1943 e tem sido reportada cada vez com mais frequência, em diversos lugares do mundo^{52,53}. Os casos que apresentam a forma pulmonar grave da leptospirose podem evoluir para óbito nas primeiras 24 horas de internação, sendo a letalidade desses casos maior que 50%, enquanto que a letalidade geral dos casos de leptospirose é em torno de 10%.^{45,46,54}

Os pacientes que recebem tratamento e suporte adequados geralmente se recuperam totalmente, inclusive os que necessitam de diálise. Porém, alguns pacientes apresentam alguns sintomas na fase de convalescença, como uveíte unilateral ou bilateral.^{45,46}

Para o tratamento da leptospirose humana, a antibioticoterapia deve ser administrada a qualquer momento, porém é mais eficaz quando iniciada na primeira semana da doença. As drogas de escolha são amoxicilina ou doxiciclina na fase precoce e penicilina, ampicilina ou ceftriaxona na fase tardia, para adultos. Para as crianças, não se deve utilizar doxiciclina. Medidas terapêuticas de suporte, como hidratação e monitoramento cardíaco, manejo respiratório, manejo sistêmico, manejo renal e manejo da hemorragia representam importante papel no tratamento da leptospirose humana.^{2,3,14,46}

1.6 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é de extrema importância para a confirmação dos casos suspeitos e para o monitoramento da doença, uma vez que as características clínicas são bastante inespecíficas. Pode ser feito através do isolamento do agente, de técnicas de detecção do DNA e de métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-leptospiras.^{2,45,55}

As leptospirosas podem ser encontradas no sangue nos primeiros dias de infecção e amostras de sangue devem ser colhidas até aproximadamente 10 dias após o início dos sintomas para realização dos exames que detectam antígenos. Os anticorpos IgM são detectáveis no sangue antes dos anticorpos IgG, aproximadamente cinco a sete dias após o início dos sintomas, atingindo níveis máximos na segunda semana da doença. Técnicas sorológicas devem ser realizadas a partir desse período. Os anticorpos podem persistir no soro de pacientes infectados, levando meses ou até anos para cair para níveis baixos. (Figura 2).^{3,56-58}

Fonte: Picardeau (2013); Picardeau et al. (2014)^{56,57}

Figura 2 - Cinética da leptospirose no sangue e o período de coleta de material biológico.

1.6.1 Isolamento e identificação de leptospiras

O isolamento de leptospiras pode ser realizado a partir de diversos materiais biológicos, como sangue, LCR e urina. Meios específicos semissólidos, como Fletcher e Ellighausen McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH)^{59,60} são utilizados para esse fim. Na primeira semana da doença, as leptospiras encontram-se na corrente sanguínea e é nesse período que deve ser feita a coleta de sangue total ou de LCR. A urina deve ser coletada a partir do décimo dia da doença, período em que as leptospiras estão nos rins e sendo excretadas de forma intermitente. O isolamento de leptospiras é de grande importância, uma vez que pode identificar os sorovares circulantes e confirmar casos suspeitos. Porém, devido ao crescimento lento dessas bactérias, a cultura pode demorar até quatro meses para apresentar um resultado definitivo. Além disso, apresenta baixa sensibilidade em decorrência da coleta, que deve ser realizada no período adequado e antes da administração de antibióticos, e da presença de microrganismos contaminantes que inibem o crescimento de leptospiras.^{2,3,61,62}

A identificação de leptospiras isoladas pode ser realizada pelo teste sorológico de absorção cruzada de aglutininas (CAAT) que, por ser muito trabalhoso é restrito a poucos laboratórios de referência.^{3,61} Por esse motivo, as técnicas moleculares são as mais utilizadas.⁴⁵ Estudos demonstraram que a eletroforese em campo pulsado (PFGE) é uma técnica eficiente na diferenciação dos sorogrupos de leptospiras e de alguns sorovares.⁶³⁻⁶⁶ Técnicas baseadas em sequência de DNA como análise em multilocus de repetições em tandem de número variável (MLVA) e sequenciamento de

multilocus (MLST) foram desenvolvidas e apresentaram resultados satisfatórios na identificação dos sorogrupos de leptospiros.^{67–71}

1.6.2 Métodos moleculares

Os testes baseados na detecção de DNA têm sido cada vez mais utilizados para o diagnóstico da leptospirose, por serem rápidos e precoces, fornecendo um diagnóstico logo nos primeiros dias da doença. Diversas técnicas foram descritas como ampliação da base do DNA nucleico (NASBA), amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) e principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) que foi descrita há mais de 20 anos para detecção de leptospiros.^{29,45,55,72–75}

Ensaio de PCR desenvolvidos para o uso diagnóstico têm utilizado amplificação de DNA a partir de diferentes materiais biológicos, como soro, sangue total, urina, LCR e tecidos.^{75–81} Diferentes tipos de alvo também foram estudados, tanto os universalmente presentes em bactérias, como *rrs*, *gyrB* ou *secY*,^{82–84} quanto os genes restritos a leptospiros patogênicos como *lipL32*, *lig* ou *lfb1*.^{85–88} A PCR em tempo real vem substituindo a PCR convencional por ser mais rápida e menos sensível a contaminações. Várias técnicas de PCR em tempo real foram descritas, utilizando tanto o sistema “SYBR Green” quanto o sistema “TaqMan” e apresentaram boa sensibilidade, precocidade e especificidade, porém poucos testes foram validados.^{45,55,84,88–93}

A desvantagem da PCR, tanto convencional como em tempo real, é a necessidade de infraestrutura laboratorial e equipamentos, que encarecem a técnica. Além disso, como há dificuldades referentes a suspeita de caso no início da doença e como a sensibilidade da PCR diminui à medida que o

paciente evolui para as fases tardias da leptospirose, resultados falso-negativos podem ocorrer. Foi demonstrado que o teste de aglutinação microscópica (MAT) foi capaz de detectar mais casos de leptospirose humana em pacientes de uma população com alta prevalência do que a PCR, apesar desse método ser mais sensível.⁹⁴

1.6.3 Métodos sorológicos

Devido às desvantagens apresentadas pelos métodos baseados em detecção de leptospiras, as técnicas de detecção de anticorpos circulantes anti-leptospiras são as mais utilizadas para o diagnóstico laboratorial da leptospirose.

O MAT é o teste de referência para o diagnóstico laboratorial da leptospirose recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Tem grande importância por ser o teste confirmatório para os casos de leptospirose e é fundamental para a vigilância epidemiológica da doença, uma vez que fornece o provável sorogrupo infectante.³ É um teste de aglutinação, visualizada em microscopia de campo escuro, que detecta anticorpos aglutinantes das classes IgG e IgM. O ponto final para determinação do resultado é a maior diluição do soro em que ocorre 50% de aglutinação, o que torna o teste subjetivo.^{3,95}

O MAT requer pelo menos duas amostras de soro, com no mínimo uma semana de diferença entre os dias de coleta, para correta interpretação dos resultados. Um caso suspeito é confirmado pelo MAT quando apresenta soroconversão ou uma variação sorológica no título de anticorpos de quatro ou mais vezes. O provável sorogrupo infectante é o que apresenta o maior título

no teste. Se mais de um sorogrupo apresentar o maior título, devido ao alto grau de reação cruzada entre diferentes sorogrupos, considera-se como inconclusivo. Título ≥ 200 é utilizado para confirmar um caso de leptospirose quando há evidências clínicas, porém essa definição é válida para uso em populações que não são comumente expostas à leptospirose. Em áreas em que a leptospirose é endêmica, títulos ≥ 800 , são recomendados.^{2,3}

Para a execução da técnica utiliza-se uma diversidade grande de leptospirosas patogênicas vivas representantes dos principais sorovares circulantes e são necessários técnicos treinados para proceder à leitura da aglutinação em microscopia de campo escuro, e, portanto, é um teste complexo, realizado principalmente em laboratórios de referência.^{2,3}

Devido às dificuldades apresentadas para a realização do MAT, vários testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos e avaliados para o diagnóstico da leptospirose, como contraímunoeletroforese, hemaglutinação indireta, imunofluorescência, “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e os testes rápidos como teste de aglutinação em látex, dot-blot ou “dipstick” e imunocromatografia.^{55,57,104–108,96–103}

Testes de ELISA são bastante utilizados para o diagnóstico da leptospirose. A maioria deles detecta anticorpos IgM e fornece resultado diagnóstico antes do MAT nas amostras colhidas na fase aguda.^{45,57} Esses testes têm sido desenvolvidos a partir de sorovares saprófitas, intermediários e patogênicos de leptospirosas, utilizando tanto extratos brutos quanto lipoproteínas recombinantes como LipL32, LigA, Lp29 e Lp49.^{4,45,56,57,95,99,109,110} Testes que utilizam leptospirosas patogênicas prevalentes em determinado local de estudo

podem não ser eficazes fora dessa área geográfica.^{3,111} Os “kits” comerciais comumente utilizam extratos brutos de leptospiros, principalmente leptospira saprófita sorovar Patoc como antígeno e a maioria utiliza anticorpos anti-IgM humanos conjugados com peroxidase. No Brasil o teste de ELISA IgM, Panbio® Leptospira IgM ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Australia) distribuído pela Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) é utilizado como triagem para o diagnóstico sorológico da leptospirose em todo o território nacional,⁴⁶ e segundo o manual do teste apresenta 96,5% (IC 95% 87,9-99,6%) de sensibilidade e 98,5% (IC 95% 95,6-99,7%) de especificidade. As figuras 3 e 4 representam os algoritmos I e II, respectivamente, utilizados para confirmação de casos de leptospirose no Brasil, segundo o manual de leptospirose do Ministério da Saúde.⁴⁶

Algoritmo I

Fonte: Leptospirose diagnóstico e manejo clínico⁴⁶

Figura 3 - Algoritmo I: encerramento de caso de leptospirose quando a amostra for colhida antes do 7º dia do início de sintomas.

Algoritmo II

Fonte: Leptospirose diagnóstico e manejo clínico⁴⁶

Figura 4 - Algoritmo II: encerramento de caso de leptospirose quando a amostra for colhida a partir do 7º dia do início de sintomas.

Diversos testes rápidos com plataformas variadas, utilizando diferentes preparações de antígenos e anticorpos conjugados foram desenvolvidos e avaliados para o diagnóstico da leptospirose, sendo vários deles distribuídos comercialmente. Testes como Dip-S-Tick (PanBio, Inc.), LeptoTek Dri-Dot (Biomérieux), Leptocheck WB (Zephyr Biomedicals), SD Bioline Leptospira

(Abbott), Leptorapide (Linnodee Diagnostics), entre outros testes comerciais e não comerciais, foram comparados ao teste de MAT e a testes de ELISA IgM. Esses trabalhos apresentaram uma grande variação de sensibilidade e especificidade, porém, independentemente do método utilizado, seja ELISA ou testes rápidos, pode-se concluir que esses ensaios são realmente úteis como teste de triagem para o diagnóstico da leptospirose por serem muito simples e precoces na detecção da leptospirose em relação ao MAT.^{92,94,100,104,105,109–120}

Testes de dot-blot foram desenvolvidos para o diagnóstico de diversas doenças a partir de modificações do teste de ELISA, substituindo a microplaca de poliestireno por membrana de nitrocelulose, utilizando cromógenos precipitáveis, menor quantidade de reagentes e resultado visual, sendo, portanto, um teste de menor custo e maior simplicidade.^{112–114} Levando em consideração que as etapas de realização dos testes de dot-blot e ELISA são iguais e os reagentes utilizados são semelhantes, o que diferencia um do outro é principalmente a necessidade de utilizar equipamentos especializados para a realização do ELISA, como lavadora de placas e espectrofotometro de microplacas para leitura dos resultados. Os gastos com aquisição e manutenção preventiva e corretiva desses equipamentos elevam o custo do teste de ELISA em relação ao teste de dot-blot.

Todos os testes rápidos para o diagnóstico da leptospirose vendidos comercialmente foram desenvolvidos fora do Brasil. Muitos deles oferecem quantidade pequena de testes por “kit”, apresentando alto custo para lugares onde a leptospirose é endêmica e um grande número de amostras é testado, como no Brasil. Além disso, não utilizam sorovares prevalentes na nossa

região o que pode fornecer resultado falso negativo. Portanto, o desenvolvimento de um teste rápido, de baixo custo, acessível a todos os laboratórios, e que seja desenvolvido utilizando materiais clínicos oriundos do Brasil são de extrema importância para a melhoria do diagnóstico da leptospirose e de grande relevância para a saúde pública do país.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Padronizar um de teste Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana que seja fácil de realizar, rápido e que apresente boa sensibilidade e especificidade.

Objetivos específicos

- Avaliar diferentes métodos de extração de antígenos brutos de leptospirosas saprófitas e patogênicas para utilização em teste de Dot-blot IgM;
- Avaliar anticorpos anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina e anti-IgM humano conjugado com peroxidase em teste de Dot-blot para detecção de anticorpos IgM anti-leptospirosas em soros humanos de pacientes com suspeita de leptospirose;
- Avaliar o desempenho diagnóstico do teste de Dot-blot IgM utilizando cada um dos antígenos e conjugados estudados, tendo o teste de MAT como referência;
- Avaliar a precocidade dos testes de Dot-blot IgM utilizando cada um dos antígenos e conjugados estudados e comparar com o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Australia);
- Desenvolver o teste de Dot-blot IgM com os antígenos e conjugado que apresentarem melhores resultados na primeira avaliação;
- Avaliar o desempenho diagnóstico do teste de Dot-blot IgM desenvolvido utilizando o teste de MAT como referência;

- Comparar o teste de Dot-blot IgM desenvolvido com o teste Panbio®
Leptospira IgM ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Australia).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de condução do presente trabalho estão resumidas no fluxograma abaixo (Figura 5).

Fonte: adaptado de Corral (2018)¹¹⁵

Figura 5 - Fluxograma de etapas realizadas no trabalho para padronização do teste de Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana.

3.1 Teste de aglutinação microscópica (MAT)

O MAT foi realizado de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde – OMS² utilizando culturas vivas de leptospiras como antígenos. Foram utilizados os sorovares representantes dos principais sorogrupos prevalentes no Estado de São Paulo (quadro 2).

Quadro 2 - Relação se sorovares utilizados no teste de MAT

Espécie	Sorovar	Sorogrupo
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
<i>L. kirshneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc
<i>L. kirshneri</i>	Cynopteri	Cynopteri

As cepas foram oriundas da Coleção de *Leptospira* (CLEP) do Centro de Referência Nacional em Leptospirose, Fiocruz-RJ, Brasil, e da coleção de

culturas do Instituto Adolfo Lutz e foram mantidas em meio EMJH suplementado com 10% de enriquecimento para EMJH (Difco), a 30°C, com repiques semanais, no laboratório de leptospirose do Instituto Adolfo Lutz Central.

Os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina com tampão do tipo Sörensen. Alíquotas de 50µL de cada soro diluído foram colocadas frente aos 20 sorovares utilizados como antígeno em placas para microaglutinação contendo 96 poços de fundo chato. As amostras foram colocadas em 20 cavidades da placa, uma para cada sorovar. Acrescentou-se a seguir 50µL de cada um dos antígenos para cada amostra de soro, obtendo-se uma diluição final de 1:100. As placas foram incubadas a 30°C durante 2 horas. A seguir foi realizada a leitura utilizando microscópio munido de dispositivo para campo escuro (Olympus BX 51).

O grau de aglutinação foi avaliado através da escala de cruces, de 1+ a 4+. (1+ representa 25% de leptospiras aglutinadas; 2+ 50% de leptospiras aglutinadas; 3+ e 4+ de 75% a 100% de leptospiras aglutinadas). Foram consideradas positivas as aglutinações com 2+ ou mais.

Os soros considerados positivos nesta etapa de triagem foram submetidos à titulação com os respectivos antígenos reagentes, em diluição seriada de razão dois. Como ponto final da reação, foi considerada a diluição da amostra capaz de aglutinar 50% das leptospiras. Os soros que apresentaram título $\geq 1:200$ foram considerados como reagentes. O provável sorogrupo infectante foi o que apresentou o maior título e quando dois ou mais

sorogrupos apresentaram o maior título, o provável sorogrupo infectante foi considerado como inconclusivo.

3.2 Teste ELISA IgM

O teste Elisa IgM foi realizado conforme instruções do “kit” Panbio® *Leptospira* IgM ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Australia). Resumidamente, 100 µL de amostras de soro, controles positivo e negativo e calibrador, diluídos a 1:100 em diluente de amostra, foram adicionados em microplaca contendo 96 micropoços revestidos com leptospiros. A microplaca foi incubada durante 30 min a 37 °C. Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05 % de tween 20, adicionou-se 100 µL de anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase e incubou-se durante mais 30 min a 37 °C. Após lavagem, adicionou-se 100 µL de substrato de tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (cromógeno TMB) e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. A reação foi interrompida com 100 µL de ácido fosfórico 1 M. A absorbância de cada poço foi medida a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram considerados reagentes, não reagentes ou inconclusivos segundo cálculo do “cut off” fornecido pelo “kit” e pelos valores de absorbância de cada amostra de soro.

3.3 Primeira etapa

3.3.1 Extração de antígenos

3.3.1.1 Cepas de leptospiros

Os antígenos foram extraídos a partir de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc I, pertencente ao sorogrupo Semaranga.

Todas as leptospiiras foram cultivadas em meio EMJH suplementado com 10% de enriquecimento para EMJH (Difco) durante 7 dias a 30°C.

3.3.1.2 Antígeno sonicado

Os antígenos sonicados foram extraídos segundo Camargo *et al.* (1995).¹¹⁶ As leptospiiras cultivadas em 5,5 ml de meio EMJH (Difco) foram congeladas a -20°C durante 7 dias. Após esse período, a cultura foi descongelada e centrifugada a 10 000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes com solução fisiológica tamponada (PBS) 0,02 M, pH 7,2, e ao final da última centrifugação foi ressuspenso em PBS no volume correspondente ao volume inicial. A suspensão foi levada ao sonicador (Fisher scientific), com ciclos de 20 KHz, 0,8 mA, por três períodos de 3 minutos cada. O antígeno extraído a partir do sorovar Copenhageni foi denominado Son2 e a partir do sorovar Patoc foi denominado Son19.

3.3.1.3 Antígeno termo-resistente

Os antígenos termo-resistentes foram extraídos segundo Faine (1982) com algumas modificações.¹¹⁷ As leptospiiras cultivadas por 7 dias em 5,5 ml de meio de EMJH (Difco) foram centrifugadas a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e lavadas duas vezes. A cada lavagem, o sedimento foi ressuspenso com PBS pH 7,2. O sedimento da última centrifugação foi homogeneizado com PBS e deixado em geladeira durante 24 horas, com agitação constante. Para a inativação térmica, a suspensão foi colocada em banho seco a 100°C por 30 minutos, com agitação. Uma última centrifugação foi processada conforme centrifugação inicial e então o sedimento foi ressuspenso em PBS de maneira a ajustar sua densidade de acordo com o tubo 10 da escala de Mc Farland. O

antígeno foi mantido em geladeira por 7 dias, com agitação constante, antes de ser utilizado. O antígeno extraído a partir do sorovar Copenhageni foi denominado TR2 e a partir do sorovar Patoc foi denominado TR19.

3.3.1.4 Antígeno n-butanol

Os antígenos n-butanol foram extraídos segundo Delbem (2004)¹¹⁸ com algumas modificações. As leptospiras cultivadas por 7 dias em 1 litro de meio EMJH (Difco) foram centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com 10 ml de PBS pH 7,2 a 4.000 rpm por 20 minutos cada. O sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em 10 ml de n-butanol a 9% e foi centrifugado por três vezes a 4.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante da última centrifugação foi coletado. O antígeno extraído a partir do sorovar Copenhageni foi denominado But2 e a partir do sorovar Patoc foi denominado But19.

Após os três métodos de extração, os antígenos foram mantidos em temperatura de -20°C até o momento do uso.

3.3.2 Amostras de soro

Todas as amostras de soro utilizadas estavam armazenadas no laboratório de leptospirose do Instituto Adolfo Lutz a -20°C e foram divididas em dois grupos: casos confirmados de leptospirose e controles negativos.

Casos confirmados de leptospirose: amostras pareadas de soro de 147 casos, recebidas no laboratório de leptospirose do Instituto Adolfo Lutz - SP, entre janeiro de 2007 e março de 2018. Todas as primeiras amostras de soro apresentaram resultado não reagente no teste de MAT e todas as segundas amostras de soro apresentaram resultado reagente no teste de MAT com

títulos ≥ 200 caracterizando soroconversão. Informações sobre as amostras tais como data do início dos sintomas e data da coleta, foram obtidas nas fichas de notificação compulsória de cada paciente.

Controles negativos: a) 88 amostras de soros de casos confirmados laboratorialmente para outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes à leptospirose. Destes casos, quatro foram confirmados para hepatite A, 20 para sífilis, 29 para dengue, 15 para toxoplasmose, três para febre amarela, um para chikungunya, 13 para febre maculosa e três para hantavirose. b) 60 amostras de soro de indivíduos sadios oriundos de banco de sangue. Todas as amostras apresentaram resultado não reagente no teste de MAT.

3.3.3 Teste de Dot-blot IgM

3.3.3.1 Padronização

Foram realizadas titulações em bloco com soros com resultados reagentes e não reagentes pelo ELISA IgM e pelo MAT, com os anticorpos anti-IgM humanos conjugados com fosfatase alcalina e com peroxidase e com os antígenos. Os soros foram diluídos em leite desnatado diluído em PBS pH 7,2 na concentração de 5% (L-PBS), a 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, e 1:800, os antígenos foram utilizados puros e diluídos em PBS pH7,2 a 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 e os conjugados foram diluídos em L-PBS a 1:1.000, 1:2.000 e 1:3.000.

3.3.3.2 Teste

O teste foi realizado a partir de modificações na técnica descrita por Blanco et al. (2009).¹⁰⁵ Membranas de nitrocelulose (Bio Rad-poro de 0,45 μm)

foram sensibilizadas com 1µL de cada um dos antígenos TR2, TR19, Son2, Son19, But2, But19 e após secagem ao ar livre por no mínimo 30 minutos, foram utilizadas imediatamente ou armazenadas em geladeira por até 24 horas. Para bloqueio, as membranas foram incubadas com L-PBS a temperatura ambiente por 30 minutos em agitador. Os soros dos pacientes e os controles (positivo e negativo) foram diluídos na solução de bloqueio. As membranas foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora, em agitador. Após o período de incubação as membranas foram lavadas três vezes com 600 µL de PBS pH 7,2, 4 minutos cada vez. As membranas foram então incubadas com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com fosfatase alcalina ou com peroxidase por 1h, à temperatura ambiente, em agitador. Após este procedimento, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente. As membranas que foram incubadas com conjugado fosfatase alcalina foram reveladas submergindo-as em solução contendo 10 mL de solução tampão 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5/ NaCl 100 mM), 66µL de “nitroblue tetrazólio” (NBT) 5% e 33µL de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) 5% (Promega, Madison, USA). As membranas que foram incubadas com conjugado peroxidase foram reveladas em solução contendo 10 mL de tampão salina tris (TBS), 2 mL de 4-cloro-1 naftol (Bio-Rad, California, USA) diluído em metanol e 10 µL de água oxigenada (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para bloqueio da reação, as membranas foram submersas em água destilada por 1 minuto.

Adotou-se como critério para resultado reagente a visualização da presença bem definida de cor rósea para os testes que utilizaram conjugado fosfatase alcalina e cor roxa para os testes que utilizaram conjugado peroxidase, para resultado fraco reagente a presença fraca das cores rósea e

roxa e para resultado não reagente a ausência de cor. A leitura foi realizada por dois observadores independentes que não tinham conhecimento prévio dos resultados sorológicos e em caso de discordância, um terceiro observador realizou a leitura. Nesse caso, o resultado considerado foi o da maioria. Para as análises dos resultados, tanto a presença bem definida de cor quanto a presença fraca de cor foram considerados como reagentes.

3.4 Segunda etapa

Após a realização das metodologias descritas acima e análise dos resultados, foi verificado que os melhores desempenhos do teste Dot-blot IgM foram com os antígenos TR2 e TR19 e anticorpo anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina. Assim, uma nova padronização do teste de Dot-blot IgM foi realizada para desenvolver um teste que possa ser utilizado como triagem para o diagnóstico da leptospirose.

3.4.1 Antígenos

Os antígenos TR2 e TR19 utilizados nessa segunda etapa foram os extraídos por termo-resistência, descrito anteriormente. Esses antígenos foram utilizados separadamente e também misturados em volumes iguais. O antígeno contendo TR2 e TR19 misturados foi denominado antígeno TR.

3.4.2 Amostras de soro

Foram utilizadas as mesmas amostras de soro da primeira etapa que ainda tinham volume suficiente para realização dos testes, como descrito a seguir:

Casos confirmados de leptospirose: amostras pareadas de soro de 124 casos, recebidas no laboratório de leptospirose do Instituto Adolfo Lutz - SP, entre janeiro de 2007 e março de 2018. Todas as primeiras amostras de soro apresentaram resultado não reagente no teste de MAT e todas as segundas amostras de soro apresentaram resultado reagente no teste de MAT com títulos ≥ 200 caracterizando soroconversão.

Controles negativos: a) 85 amostras de soros de casos confirmados laboratorialmente para outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes à leptospirose. Destes casos, quatro foram confirmados para hepatite A, 20 para sífilis, 28 para dengue, 15 para toxoplasmose, três para febre amarela, um para chikungunya, 11 para febre maculosa e três para hantavirose. b) 58 amostras de soro de indivíduos sadios oriundos de banco de sangue. Todas as amostras apresentaram resultado não reagente no teste de MAT.

3.4.3 Teste de Dot-blot IgM

3.4.3.1 Padronização

A padronização foi realizada colocando as membranas de nitrocelulose sensibilizadas com os antígenos em microtubos do tipo “eppendorf” de 1,5 ml, em microplacas de 96 poços e em placa com canaletas (método usado na primeira etapa).

Foram feitas titulações em bloco com soros previamente sabidos como reagentes e como não reagentes pelo ELISA IgM e pelo MAT, com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com fosfatase alcalina e com os antígenos TR2, TR19 e TR. O leite desnatado utilizado para bloqueio das membranas, para

diluição dos soros e para diluição do conjugado foi testado diluído em PBS pH 7,2 e em PBS pH 7,2 acrescido de tween 20 a 0,1% (PBS-T), denominados como L-PBS e L-PBS-T, respectivamente, nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. Os soros foram diluídos em L-PBS ou L-PBS-T a 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, e 1:800, os antígenos foram utilizados puros e diluídos em PBS pH 7,2 a 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 e o conjugado foi testado diluído em L-PBS ou L-PBS-T a 1:1.000, 1:2.000 e 1:3.000.

3.4.3.2 Teste

As membranas que estavam nas placas com canaletas ficaram em agitador em todas as incubações. As que estavam em microtubos do tipo “eppendorf” e em microplacas foram incubadas sem agitador.

Membranas de nitrocelulose (Bio Rad-poro de 0,45 μ m) foram sensibilizadas com 1 μ L de cada um dos antígenos TR, TR2 e TR19. As membranas foram incubadas com L-PBS ou L-PBS-T à temperatura ambiente por 30 minutos. Os soros dos pacientes e os controles (positivo e negativo) foram diluídos na solução de bloqueio. As membranas foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação as membranas foram lavadas com PBS ou PBS-T. Nos microtubos do tipo “eppendorf” e nas microplacas a lavagem foi realizada agitando as membranas nos tampões de lavagem de 6 a 8 vezes. A lavagem em placas com canaletas foi realizada colocando 600 μ L de tampão de lavagem em cada membrana e desprezando logo após. Essa etapa foi testada repetindo-se por 3, 4 e 5 vezes. As membranas foram então incubadas com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com fosfatase alcalina por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Após este procedimento, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente. O resultado foi revelado submergindo as membranas em 10 mL de solução tampão 3, contendo 66µL de NBT 5% e 33µL de fosfato de BCIP 5% (Promega, Madison, USA) por 15 minutos. Para bloqueio da reação, as membranas foram submersas em água destilada por 1 minuto.

Adotou-se como critério para resultado reagente a visualização da presença bem definida de cor rósea, para resultado fraco reagente a presença fraca de cor rósea e para resultado não reagente a ausência de cor. A leitura foi realizada por dois observadores independentes que não tinham conhecimento prévio dos resultados sorológicos, e em caso de discordância, um terceiro observador realizou a leitura. Nesse caso, o resultado considerado foi o da maioria. Para as análises dos resultados, tanto a presença bem definida de cor quanto a presença fraca de cor foram considerados como reagentes.

3.4.4 Reprodutibilidade e repetibilidade do teste

Para verificar a precisão do teste de Dot-blot IgM utilizando os antígenos TR, TR2 e TR19 foram avaliadas a reprodutibilidade e repetibilidade.^{119,120} Essas medidas avaliam a consistência de resultados quando o exame se repete.¹²¹ Para verificar a repetibilidade foram selecionadas quatro amostras controles de soro de pacientes com suspeita de leptospirose conforme os resultados obtidos no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, sendo duas amostras positivas e duas negativas, próximas e afastadas do “cut off”. O teste de Dot-blot IgM foi realizado em duplicata por 10 dias consecutivos, excetuando finais de semana. Se uma das amostras controle não apresentar o

resultado esperado, rejeitam-se todos os resultados. Não mais de uma corrida pode ser rejeitada em 10 repetições. Para análise dos resultados foi calculado a porcentagem de concordância.

Para verificar a reprodutibilidade foram selecionadas 20 amostras controles de soro de pacientes com suspeita de leptospirose conforme os resultados obtidos no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, sendo 10 amostras reagentes e 10 não reagentes com resultados próximos e afastados do “cut off”. O teste de Dot-blot IgM com essas amostras foi realizado por dois técnicos diferentes no mesmo dia. Para análise dos resultados foram calculados a porcentagem de concordância e o índice Kappa.

3.5 Metodologias utilizadas tanto na primeira quanto na segunda etapa

3.5.1 Dosagem de proteínas dos antígenos

A dosagem de proteína contida no sedimento foi realizada pelo método de Bradford,¹²² utilizando o “Bio-Rad Protein Assay Kit II” (Boehringer, Alemanha). O sedimento contendo os antígenos extraídos de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. biflexa* sorovar Patoc foram diluídos a 1:10. O padrão BSA (albumina de soro bovino) foi diluído nas concentrações de 0,9, 0,6, 0,4, 0,3, 0,2 mg/mL para montagem da curva padrão, utilizando as respectivas absorbâncias. Após adição de 5 mL do corante (“Coomassie Brilliant Blue” G-250) e 100 µL de amostras e padrões em cada tubo, foi feita incubação à temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por 5 minutos. As absorbâncias foram então medidas utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína dos antígenos foi determinada utilizando a curva padrão de BSA. Foram realizadas três

dosagens para cada preparação antigênica e a concentração proteica foi determinada pela média dos valores encontrados.

3.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo Laemmli (1970)¹²³ com gel de corrida a 12,5% e gel de empilhamento a 3%. Cada um dos antígenos foi misturado com tampão redutor e a essa solução foi acrescentado azul de bromofenol (suficiente para dar cor à amostra) em diluição 1:4 e após essa etapa, foi fervido em banho seco a 100°C, durante três minutos e então aplicados no gel. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem fixa de 80V por dez minutos e depois de 100V até o fim da corrida, com amperagem livre, em tampão de corrida 1x concentrado. Para cada corrida foi utilizado padrão de peso molecular “Precision Plus Protein Standards” de 10 a 250 kDa (Bio-Rad, California, USA). Os géis foram corados com “Coomassie Brilliant Blue”.

3.5.3 “Immunoblotting”

O “immunoblotting” foi realizado segundo Passos (2012)¹²⁴, e foram utilizados os antígenos TR2, TR19 e TR. Após a eletroforese de proteínas, os géis foram colocados sobre membranas de nitrocelulose de 0,22µm (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) e acima destas foram colocados papéis filtros e em seguida esponjas de poliuretano. Esse material foi colocado no meio de placa acrílica perfurada e essa placa foi posicionada em cuba de eletroforese com tampão de transferência.

O processo de transferência foi realizado empregando-se voltagem constante de 30V por 18 horas, a 4°C. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por cinco minutos e descoradas em água destilada. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas e cortadas em fitas de aproximadamente 0,5 cm foram bloqueadas com leite diluído em PBS (leite-PBS) a 5% por 1 hora, à temperatura ambiente, em agitador. As fitas foram então incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, em agitador, com os soros de pacientes com leptospirose e soros controle diluídos a 1:100 em leite-PBS a 3%. Após essa etapa, as fitas foram lavadas seis vezes, 10 minutos cada vez, com solução de PBS contendo 0,1% de tween.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com fosfatase alcalina ou com peroxidase, diluídos a 1:3000 em leite-PBS 3%, por 1 hora e 30 minutos sob agitação constante, a temperatura ambiente, protegidas da luz, e em seguida, novamente lavadas como descrito anteriormente. A reação foi revelada empregando-se solução de NBT e BCIP (Promega, Madison, USA) para as fitas que estavam em conjugado com fosfatase alcalina e em solução 4-cloro-1naftol (SigmaAldrich Co. St. Louis, Mo, USA) para as fitas que estavam em conjugado com peroxidase e o bloqueio feito por lavagens sucessivas em água destilada.

3.5.4 Estabilidade do teste

Para conhecer a estabilidade do teste de Dot-blot IgM, membranas foram sensibilizadas com os antígenos e foram estocadas, sem bloqueio ou bloqueadas com L-PBS 5% na primeira etapa e L-PBS-T 3% na segunda etapa

por 30 minutos, em temperatura ambiente, de 2 a 8°C e -20°C. As membranas estocadas foram testadas após três, seis, nove e 12 meses com soros controles positivo e negativo para leptospirose.

3.6 Terceira etapa

3.6.1 Preparação de “kit” de Dot-blot IgM

Após análise dos resultados da segunda etapa do trabalho, um “kit” de Dot-blot IgM foi preparado contendo membranas de nitrocelulose sensibilizadas com 1 µl de antígeno TR (diluído em PBS a 1:8) ou TR19 (diluído em PBS a 1:4), leite a 3% em PBS-T (L-PBS-T 3%), conjugado fosfatase alcalina diluída em L-PBS-T 3% a 1:3000, solução de PBS-T para lavagem, tampão 3, NBT 5% e BCIP 5% e soros controle positivo e controle negativo. Esse “kit” foi mantido em geladeira, com exceção das soluções de NBT e BCIP que foram mantidas em freezer -20°C, por quatro meses. Após esse período, foram testadas 144 amostras cegas de soro de pacientes com suspeita de leptospirose, recebidas no laboratório de leptospirose do IAL Central entre os meses de março e julho de 2020 e submetidas ao teste Panbio® *Leptospira* IgM ELISA para o diagnóstico de leptospirose.

3.6.2 Teste Dot-blot IgM

As membranas foram separadas e identificadas de acordo com as amostras a serem testadas. Duas membranas foram utilizadas para o controle positivo e controle negativo. Foi colocada uma membrana por canaleta da placa. As membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, com agitação, com 1 mL de L-PBS-T 3%. Após esse período as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, com agitação, com

2,5 µL de cada amostra (incluindo controles positivo e negativo) diluídas no L-PBS-T 3% previamente colocado nas canaletas e foram então lavadas desprezando as amostras diluídas e colocando 600 µL de PBS-T em cada canaleta com membrana. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes. Após a lavagem as membranas foram incubadas com 1 ml de conjugado fosfatase alcalina por canaleta com membrana, por 30 minutos, à temperatura ambiente, com agitação. Nova lavagem foi realizada desprezando o conjugado e colocando 600 µL de PBS-T em cada canaleta com membrana e repetindo esse procedimento por quatro vezes. Para revelação as membranas foram submergidas em 10 mL de tampão 3 e então foram adicionados 66µL de NBT 5% e 33µL de BCIP 5% (Promega, Madison, USA) e por fim, incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Para bloqueio da reação, as membranas foram submersas em água destilada por 1 minuto. A leitura visual dos resultados foi realizada após secagem total das membranas. Adotou-se como critério para resultado reagente a visualização da presença forte de cor rósea, para resultado fraco reagente a presença fraca de cor rósea e para resultado não reagente a ausência de cor.

3.7 Análises estatísticas

Para a determinação da eficiência dos testes de Dot-blot IgM tendo-se como referência os resultados obtidos pelo teste de MAT, foram calculados os valores relativos de sensibilidade (S), especificidade (E) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%).¹²⁵⁻¹²⁸ As análises estatísticas foram calculadas utilizando o programa MedCalc para Windows, versão 15.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Para análise da comparação entre a

leitura dos resultados do Dot-blot IgM realizada pelos dois observadores independentes, da comparação entre os testes de Dot-blot IgM realizados por dois técnicos diferentes para avaliar a reprodutibilidade e da comparação entre o teste do “kit” Dot-blot IgM e do teste Panbio® Leptospira IgM ELISA utilizou-se o índice Kappa, cuja interpretação consta no quadro 3.¹²⁹

Quadro 3 - Interpretação dos resultados do índice Kappa

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Sem concordância
0-0.19	Fraca
0.20-0.39	Razoável
0.40-0.59	Moderada
0.60-0.79	Substancial
0.80-1.00	Quase perfeita

3.8 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz, sob o número CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) Plataforma Brasil 66641616.9.0000.0059 e número de parecer consubstanciado 2.101.072 (Anexo A).

4. RESULTADOS

4.1 Primeira etapa

A concentração de proteínas de cada antígeno, detectada pela técnica de Bradford, variou de 120 µg/mL a 140 µg/mL (quadro 4).

Quadro 4 - Concentração de proteínas de cada antígeno, detectada pela técnica de Bradford

Antígenos	Concentrações em µg/mL
TR2	120
TR19	130
Son2	120
Son19	140
But2	140
But19	130

Foi demonstrado com a titulação em bloco que a melhor diluição de cada antígeno foi de 1:16 para o antígeno TR19, 1:8 para os antígenos TR2, But19 e Son19 e 1:4 para os antígenos Son2 e But2 quando utilizado anticorpo anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina. Para as reações utilizando anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase, as melhores diluições foram 1:8

para antígeno TR19 e 1:2 para os antígenos TR2 e But2. Os antígenos Son2, Son19 e But19 foram utilizados puros com esse conjugado, ou seja, sem diluição. A melhor diluição encontrada para os conjugados peroxidase e fosfatase alcalina foi de 1:3000 e para as amostras de soro foi de 1:400 com ambos os conjugados.

As membranas sensibilizadas com os antígenos apresentaram resultados reagentes no Dot-blot IgM após um ano da sensibilização, independente se estavam previamente bloqueadas ou não, da temperatura de armazenamento e o conjugado utilizado. Porém, as membranas submetidas ao Dot-blot IgM com o conjugado fosfatase alcalina apresentaram resultados reagentes com o controle negativo com seis meses de estocagem em todas as condições de armazenamento.

A Figura 6 representa os resultados da leitura do teste de Dot-blot IgM classificadas em reagente, fraco reagente e não-reagente.

Figura 6 - Interpretação dos resultados do teste de Dot-blot IgM. Linha A: Fosfatase alcalina; Linha B: Peroxidase; Coluna 1: Reagente; Coluna 2: Fraco reagente; Coluna 3: Não reagente.

A concordância entre as visualizações dos resultados do teste de Dot-blot IgM, com todos os antígenos testados e com ambos os conjugados, interpretados por dois observadores independentes foi quase perfeita, apresentando Kappa entre 0,98 e 1,00, como demonstrado na tabela 1. As discordâncias que ocorreram foram entre resultado fraco reagente e resultado não reagente, não tendo ocorrido nenhuma discordância entre reagente e não reagente.

Tabela 1- Concordância entre as visualizações dos resultados do teste Dot-blot IgM interpretados por dois observadores independentes.

Kappa (95% IC)		
Dot-blot IgM	Fosfatase alcalina	Peroxidase
TR2	0.99 (0.97 a 1.00)	0.99 (0.98 a 1.00)
TR19	1.00 (1.00 a 1.00)	0.99 (0.98 a 1.00)
Son2	0.98 (0.97 a 1.00)	1.00 (1.00 a 1.00)
Son19	0.99 (0.97 a 1.00)	0.99 (0.98 a 1.00)
But2	0.99 (0.97 a 1.00)	1.00 (1.00 a 1.00)
But19	1.00 (1.00 a 1.00)	0.99 (0.98 - 1.00)

Todos os antígenos foram submetidos à separação eletroforética por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, como mostra a figura 7. Os antígenos apresentaram perfis proteicos diferentes, porém com uma banda em comum com massa molecular aparente entre 75 e 50 kDa, sendo que os antígenos extraídos por sonicação (Son2 e Son19) apresentaram somente essa banda.

Os antígenos TR2 e But19 apresentaram maior número de frações proteicas, porém, os antígenos com extração por termo-resistência (TR2 e TR19) foram os escolhidos para análise por “immunoblotting” por apresentarem perfis com maior semelhança entre si do que os antígenos com extração por butanol (But2 e But19).

Figura 7 - Análise por SDS-PAGE 12,5% de acrilamida corado com “coomassie blue”. 1: Marcador de peso molecular “All Blue” (Bio-Rad); 2: Antígeno But2; 3: Antígeno But19; 4: Antígeno TR2; 5: Antígeno TR19; 6: Antígeno Son2; 7: Antígeno Son19.

As Figuras 8 e 9 representam os resultados do “immunoblotting” realizados para os antígenos TR2 e TR19. O “immunoblotting” do antígeno TR2 quando utilizado conjugado fosfatase alcalina, apresentou para o controle positivo quatro frações, sendo uma entre 37 e 25 kDa, uma entre 20 e 15 kDa e duas entre 15 e 10 kDa. Para o soro 1, apresentou seis frações, sendo uma entre 37 e 25 kDa, três entre 25 e 15 kDa e duas entre 15 e 10 kDa. Para o

soro 2 apresentou duas frações entre 15 e 10 kDa e para o soro 3 duas frações, uma entre 37 e 25 kDa e uma entre 20 e 15 kDa. O controle negativo e os soros 4 e 5 apresentaram resultados não reagentes. Quando utilizado o conjugado peroxidase, o “immunoblotting” do antígeno TR2 apresentou o mesmo resultado apresentado quando utilizado conjugado fosfatase alcalina. O “immunoblotting” do antígeno TR19 apresentou para o controle positivo e para os soros 1, 2 e 3, cinco frações entre 20 e 10 kDa, tanto com conjugado fosfatase alcalina quanto com conjugado peroxidase. Para ambos os conjugados, o controle negativo e os soros 4 e 5 apresentaram resultados não reagentes.

Figura 8 - “Immunoblotting” do antígeno TR2. As fitas do lado A foram incubadas com conjugado fosfatase alcalina e as fitas do lado B foram incubadas com conjugado peroxidase. MW: Marcador de peso molecular “All Blue” (Bio-Rad); C+: Controle positivo; C-: Controle negativo, 1, 2 e 3: Soros de casos de leptospirose; 4: Soro de caso de dengue; 5: Soro de caso de febre maculosa.

Figura 9 - “Immunoblotting” do antígeno TR19. As fitas do lado A foram incubadas com conjugado fosfatase alcalina e as fitas do lado B foram incubadas com conjugado peroxidase. MW: marcador de peso molecular “All Blue” (Bio-Rad); C+: Controle positivo; C-: Controle negativo; 1, 2 e 3: Soros de casos de leptospirose; 4: Soro de caso de dengue; 5: Soro de caso de febre maculosa.

Os resultados do teste de Dot-blot IgM com os casos de leptospirose e os casos controles estão demonstrados na Tabela 2. As primeiras amostras dos 147 casos de pacientes com leptospirose apresentaram reação não reagente no MAT, porém o Dot-blot IgM com todos os antígenos testados detectou anticorpos anti-leptospiras nessas amostras, variando de 46,9% (Son2) a 57,8% (TR19) de detecção quando utilizado conjugado fosfatase alcalina. Quando o conjugado peroxidase foi utilizado, a detecção de anticorpos anti-leptospiras nas primeiras amostras de soro variou de 15,7% (Son2) a 34,0% (TR19). As segundas amostras dos 147 casos de pacientes com leptospirose apresentaram reação reagente no MAT com títulos ≥ 200 . A

porcentagem de resultados reagente do Dot-blot IgM nessas amostras, quando utilizado conjugado fosfatase alcalina, variou de 93,2% (Son19 e But19) a 96,6% (TR2). Utilizando conjugado peroxidase, a porcentagem de resultados reagente variou de 85,0% (But19) a 90,5% (But2).

Todos os 148 soros do grupo controle apresentaram resultado não reagente no MAT e no Dot-blot IgM com conjugado peroxidase. Com o conjugado fosfatase alcalina, 9,5% dos soros apresentaram resultados fraco reagente com antígeno TR2, 4,7% com TR19, 8,1% com Son2, 5,4% com Son19, 7,4% com But2 e 16,9% com But19.

Tabela 2 - Resultados da reação de Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina ou peroxidase, realizada com soros de 147 casos de leptospirose e 148 casos controle

		Dot-blot IgM com fosfatase alcalina			Dot-blot IgM com peroxidase		
Dot-blot IgM Reagente	Antígenos	Casos de leptospirose (1ª amostra)	Casos de leptospirose (2ª amostra)	Casos Controle	Casos de leptospirose (1ª amostra)	Casos de leptospirose (2ª amostra)	Casos Controle
	TR2	73(49,7%)	142(96,6%)	14(9,5%)	25(17,0%)	129(87,8%)	0
	TR19	85(57,8%)	138(93,9%)	7(4,7%)	50(34,0%)	132(89,8%)	0
	Son2	69(46,9%)	139(94,6%)	12(8,1%)	23(15,7%)	127(86,4%)	0
	Son19	75(51,0%)	137(93,2%)	8(5,4%)	47(32,0%)	131(89,1%)	0
	But2	70(47,6%)	141(95,9%)	11(7,4%)	26(17,7%)	133(90,5%)	0
	But19	75(51,0%)	137(93,2%)	25(16,9%)	39(26,5%)	125(85,0%)	0

Os resultados relativos de sensibilidade e especificidade dos testes de Dot-blot IgM e seus intervalos de confiança de 95%, utilizando fosfatase alcalina e peroxidase como conjugado estão apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Nos testes realizados nas primeiras amostras de soro, o Dot-blot IgM apresentou maior sensibilidade (57,8%) utilizando fosfatase alcalina como conjugado e TR19 como antígeno. Nas segundas amostras de soro, o

teste Dot-blot IgM utilizando fosfatase alcalina como conjugado e TR2 como antígeno apresentou a maior taxa de sensibilidade (96,6%).

O Dot-blot IgM utilizando peroxidase como conjugado apresentou 100% de especificidade com todos os antígenos avaliados. O Dot-blot IgM utilizando fosfatase alcalina como conjugado apresentou maior taxa de especificidade quando realizado com o antígeno TR19 (95,2%).

Tabela 3 - Valores relativos (%) da Sensibilidade (S) e Especificidade (E), observados no Dot-blot IgM com conjugado fosfatase alcalina, utilizando o MAT como referência

1ª amostra							2ª amostra					
	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19
S	49,7	57,8	46,9	51,0	47,6	51,0	96,6	93,9	94,6	93,2	95,9	93,2
(95% IC)	(41,3 - 58,0)	(49,4 - 65,9)	(38,7 - 55,3)	(42,7 - 59,3)	(39,3 - 56,0)	(42,6 - 59,3)	(92,2 - 98,9)	(88,7 - 97,1)	(89,6 - 97,6)	(87,8 - 96,7)	(91,3 - 98,5)	(87,9 - 96,7)
E	90,5	95,2	91,9	94,6	92,6	83,1	90,5	95,2	91,9	94,6	92,6	83,1
(95% IC)	(84,6-94,7)	(90,5 - 98,1)	(86,3 - 95,7)	(89,6 - 97,6)	(87,1 - 96,2)	(76,1 - 88,8)	(84,6-94,7)	(90,5 - 98,1)	(86,3 - 95,7)	(89,6 - 97,6)	(87,1 - 96,2)	(76,1 - 88,8)

Entre os sorogrupos encontrados nos 147 casos confirmados de leptospirose pelo MAT, *Icterohaemorrhagiae* (61,9%) foi o sorogrupo infectante prevalente, seguido dos sorogrupos *Canicola* (7,4%), *Cynopteri* (6,8%), *Australis* (3,4%), *Sejroe* (2,7%), *Hebdomadis* e *Pyrogenes* (2,0%), *Bataviae*, *Grippotyphosa* e *Javanica* (0,7%). Dezesete casos (11,6%) apresentaram resultado inconclusivo. Os resultados do MAT e Dot-blot IgM segundo os prováveis sorogrupos infectantes estão na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes MAT e Dot-blot IgM, realizados em soros dos 147 casos de leptospirose, segundo os prováveis sorogrupos infectantes

Provável sorogrupo infectante	Nº de casos detectados pelo MAT (%)	Nº de casos detectados pelo Dot-blot IgM com Fosfatase alcalina (%)						Nº de casos detectados pelo Dot-blot IgM com Peroxidase (%)					
		TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19
Australis	5 (3,4)	5 (100)	4 (80,0)	3 (60,0)	3 (60,0)	4 (80,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	2 (40,0)
Bataviae	1 (0,7)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Canicola	11 (7,4)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	10 (90,9)	11 (100)	9 (81,8)	11 (100)	10 (90,9)	7 (63,6)
Cynopteri	10 (6,8)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (90)	10 (100)	9 (90,0)	10 (100)	10 (100)	9 (90)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
Grippotyphosa	1 (0,7)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Hebdomadis	3 (2,0)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
Icterohaemorrhagiae	91 (61,9)	88 (96,7)	85 (93,4)	85 (93,4)	84 (92,3)	86 (94,5)	84 (92,3)	83 (91,2)	79 (86,8)	82 (90,1)	81 (89,0)	85 (93,4)	80 (87,9)
Javanica	1 (0,7)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Pyrogenes	3 (2,0)	3(100)	2 (66,7)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	3(100)	2 (66,7)	2 (66,7)	2 (66,7)	3 (100)	2 (66,7)
Sejroe	4 (2,7)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	2 (50,0)	4 (100)	2 (50,0)	3 (75,0)	2 (75,0)	3 (75,0)
Inconclusivos	17 (11,6)	16 (94,1)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	16 (94,1)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	17 (100)	17 (100)

A tabela 6 mostra a sensibilidade dos testes de Dot-blot IgM de acordo com o número de dias após o início dos sintomas. Nos primeiros sete dias de doença o teste de Dot-blot IgM que apresentou maior sensibilidade foi o que utilizou antígeno TR19 tanto com fosfatase alcalina quanto com peroxidase, resultado que se repetiu considerando até o 14º dia da doença. Após 22 dias do início dos sintomas, o teste de Dot-blot IgM com antígeno TR2 foi o que apresentou maior sensibilidade, com ambos os conjugados.

Tabela 6 - Sensibilidade do Dot-blot IgM em relação aos dias após início dos sintomas

		Sensibilidade (%)											
		Dot-blot IgM com fosfatase alcalina						Dot-blot IgM com peroxidase					
Dias após início dos sintomas*	Número de amostras	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19
1-7	102	53,9	61,8	52,0	55,9	52,0	54,9	17,0	36,3	15,7	35,3	17,6	30,4
8-14	62	74,2	74,6	71,4	71,4	74,6	73,0	58,7	68,2	61,9	65,0	60,3	60,3
15-21	43	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	90,7	90,7	90,7	90,7	93,0	90,7
≥ 22	49	95,9	87,7	89,8	87,7	93,9	87,7	85,7	81,6	77,5	81,6	87,7	73,5

* Informações entre os dias de sintomas e coleta de soro estavam ausentes em 38 amostras.

Na tabela 7 estão os resultados dos testes de Dot-blot IgM em relação aos títulos apresentados no MAT nas segundas amostras de soro dos casos confirmados de leptospirose. Para o Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina, os resultados reagentes com todos os antígenos foram menores que 70% para amostras com título de 200, aumentando para mais de 90% para todos os outros títulos. Para o Dot-blot IgM utilizando conjugado peroxidase, os resultados reagentes com todos os antígenos foram menores

que 55% para amostras com título de 200, aumentando para mais de 80% para os outros títulos com exceção do antígeno But19 que apresentou 75% de soros reagentes com título de 400.

Tabela 7 - Resultados do Dot-blot IgM segundo a titulação do MAT nas segundas amostras de soro de casos confirmados de leptospirose.

Resultados do MAT em títulos*	Número de Casos	Dot-blot IgM com fosfatase alcalina (%)						Dot-blot IgM com peroxidase (%)					
		TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19
200	15	10 (67)	9 (60)	8 (53)	8 (53)	9 (60)	8 (53)	7 (47)	8 (53)	7 (47)	7 (47)	7 (47)	6 (40)
400	16	16 (100)	15 (94)	16 (100)	16 (100)	16 (100)	16 (100)	14 (87)	13 (81)	13 (81)	13 (81)	15 (94)	12 (75)
800	23	23 (100)	22 (96)	23 (100)	22 (96)	23 (100)	22 (96)	21 (91)	22 (96)	20 (87)	20 (87)	21 (91)	19 (83)
1600	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	30 (96,8)	31 (100)	31 (100)	31 (100)
3200	22	22 (100)	22 (100)	22 (100)	21 (95)	22 (100)	21 (95)	21 (95)	19 (86)	20 (91)	21 (95)	22 (100)	19 (86)
6400	27	27 (100)	26 (96)	26 (96)	26 (96)	27 (100)	26 (96)	23 (85)	26 (96)	23 (85)	26 (96)	25 (93)	25 (93)
12800	12	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
102400	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)

*Nenhuma amostra de soro apresentou título de 25.600 ou 51.200

A comparação entre os testes Dot-blot IgM e Panbio® Leptospira IgM ELISA aplicados às primeiras amostras de soro dos 147 casos de leptospirose mostrou que o teste Dot-blot IgM utilizando TR19 como antígeno e conjugado fosfatase alcalina apresentou maior número de resultados reagentes do que o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, tendo 85 (57,8%) e 78 (53,1%) soros apresentados reatividade, respectivamente. Esses resultados estão demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados reagentes dos testes Panbio® Leptospira IgM ELISA e de Dot-blot IgM aplicadas às primeiras amostras* de soros dos casos de leptospirose.

ELISA IgM (%)	Dot-blot IgM com fosfatase alcalina (%)						Dot-blot IgM com peroxidase (%)					
	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19	TR2	TR19	Son2	Son19	But2	But19
78 (53,1)	73 (49,7)	85 (57,8)	69 (46,9)	75 (51,0)	70 (47,6)	75 (51,0)	25 (17,0)	50 (34,0)	23 (15,7)	47 (32,0)	26 (17,7)	39 (26,5)

*Primeiras amostras coletadas de um a 30 dias após o início dos sintomas.

4.2 Segunda etapa

Após análise dos resultados da primeira etapa do trabalho, foi observado que o Dot-blot IgM com os antígenos extraídos por termo-resistência e o anticorpo anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina apresentaram melhor desempenho. Porém observou-se a necessidade de ajustes no teste para que houvesse maior estabilidade dos antígenos nas membranas em diferentes condições de estocagem, diminuição no tempo total de realização do ensaio e também para avaliar a possibilidade de usar microtubos ou microplacas no teste não havendo necessidade de utilizar equipamentos como agitador de placas. Assim, foi realizada uma nova padronização com os

antígenos TR2, TR19 e TR, esse último constituído da mistura em volumes iguais dos antígenos TR2 e TR19.

As padronizações do teste de Dot-blot IgM em microtubos do tipo “eppendorf” e em microplacas apresentaram resultados visuais muito fracos, tendo que concentrar todos os reagentes para uma visualização satisfatória. Por esse motivo, os testes nessas plataformas foram descontinuados e todas as análises foram feitas com Dot-blot IgM realizado em placas com canaletas submetidas à agitação durante as etapas de bloqueio das membranas e de incubação com amostras de conjugados.

A concentração de proteínas do antígeno TR foi de 100 µg/ml, detectada pela técnica de Bradford. A do TR2 e TR19 foi de 120 µg/ml e 130 µg/ml, como descrito anteriormente.

A titulação em bloco mostrou que a melhor diluição de cada antígeno foi de 1:4 para TR2 e TR19 e 1:8 para TR. A melhor diluição encontrada para o conjugado foi de 1:3000 e para as amostras de soro foi de 1:400.

A concentração do leite desnatado a 3% diluído em PBS contendo 0,1% de tween 20 (L-PBS-T 3%) e a sequência de quatro lavagens com PBS adicionado de tween 20 a 0,1% (PBS-T) apresentaram melhores resultados no Dot-blot IgM e foram utilizadas no teste.

As membranas sensibilizadas com os antígenos não perderam a estabilidade até um ano, independente da temperatura de armazenamento ou se estavam previamente bloqueadas ou não.

A concordância entre a visualização dos resultados dos testes de Dot-blot IgM interpretados por dois observadores independentes, foi quase perfeita,

apresentando índice Kappa de 0,97 com os antígenos TR e TR2 e 0,96 com o antígeno TR19. A discordância entre os resultados também foi em relação à interpretação de fraco reagente e não reagente, não tendo havido discordâncias entre resultados interpretados como reagente e não reagente.

Todos os antígenos foram novamente submetidos à separação eletroforética por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida junto com o antígeno TR, analisado a partir da segunda etapa do trabalho (figura 10). O antígeno TR também apresentou uma banda em comum a todos os outros antígenos, entre 75 e 50 kDa.

Figura 10 - Análise por SDS-PAGE 12,5% de acrilamida corado com “coomassie blue”. 1: Marcador de peso molecular “All Blue” (Bio-Rad); 2: Antígeno TR; 3: Antígeno TR2; 4: Antígeno TR19; 5: Antígeno Son2; 6: Antígeno Son19; 7: Antígeno But2; 8: Antígeno But19.

A figura 11 representa os resultados do “immunoblotting” realizados para o antígeno TR. Quando utilizado conjugado fosfatase alcalina, o “immunoblotting” apresentou para o controle positivo quatro frações, sendo

uma entre 37 e 25 kDa, uma entre 20 e 15 kDa e duas entre 15 e 10 kDa. Para o soro 1, apresentou seis frações, sendo uma entre 37 e 25 kDa, três entre 25 e 15 kDa e duas entre 15 e 10 kDa. Para os soros 2 e 3 apresentou três frações, sendo uma entre 20 e 15 kDa e duas entre 15 e 10 kDa. O controle negativo e os soros 4 e 5 apresentaram resultados não reagentes. Quando utilizado o conjugado peroxidase, o “immunoblotting” do antígeno TR apresentou o mesmo resultado que quando utilizado o conjugado fosfatase alcalina.

Figura 11 - “Immunoblotting” do antígeno TR. As fitas do lado A foram incubadas com conjugado fosfatase alcalina e as fitas do lado B foram incubadas com conjugado peroxidase. MW: Marcador de peso molecular “All Blue” (Bio-Rad); C+: Controle positivo; C-: Controle negativo; 1, 2 e 3: Soros de casos de leptospirose; 4: Soro de caso de dengue; 5: Soro de caso de febre maculosa.

Os resultados do teste de Dot-blot IgM com os casos de leptospirose e os casos controles estão demonstrados na tabela 9. As primeiras amostras dos

124 casos de pacientes com leptospirose apresentaram reação não reagente no MAT, porém, apresentaram 51,6%, 43,5% e 58,1% de reatividade no Dot-blot com os antígenos TR, TR2 e TR19, respectivamente. As segundas amostras dos 124 casos de pacientes com leptospirose apresentaram reação reagente no MAT com títulos ≥ 200 . Os resultados de reatividade no Dot-blot IgM foram de 96,0% (TR19), 96,8% (TR) e 97,6% (TR2).

Tabela 9 - Resultados do teste de Dot-blot IgM, realizado com soros de 124 casos de leptospirose e 143 casos controle

	Antígenos	Casos de leptospirose (1ª amostra)	Casos de leptospirose (2ª amostra)	Casos Controle
Dot-blot IgM Reagente	TR	64 (51,6%)	120 (96,8%)	6 (4,2%)
	TR2	54 (43,6%)	121 (97,6%)	8 (5,6%)
	TR19	72 (58,1%)	119 (96,0%)	9 (7,2%)

Os resultados relativos de sensibilidade e especificidade dos testes de Dot-blot IgM e seus intervalos de confiança de 95% estão apresentado na tabela 10. Nos testes realizados nas primeiras amostras de soro, as taxas de sensibilidade do Dot-blot IgM com TR, TR2 e TR19 foram de 51,6%, 43,6% e 58,1% respectivamente. Nas segundas amostras de soro, o teste Dot-blot IgM apresentou sensibilidade de 96,8% com TR, 97,6% com TR2 e 96,0% com TR19.

Tabela 10 - Valores relativos (%) da Sensibilidade (S) e Especificidade (E) observados no Dot-blot IgM, utilizando o MAT como referência

Dot-blot IgM						
	1 ^{as} amostras de soro			2 ^{as} amostras de soro		
	TR	TR2	TR19	TR	TR2	TR19
S (95% IC)	51,6 (42,5 – 60,7%)	43,6 (34,7 – 52,7%)	58,1 (48,9 – 66,9%)	96,8 (92,0 – 99,1%)	97,6 (93,1 – 99,5%)	96,0 (90,8 – 98,7%)
E (95% IC)	95,8 (91,1 – 98,4%)	94,4 (89,3% - 97,6%)	93,7 (88,4 – 97,1%)	95,8 (91,1 – 98,4%)	94,4 (89,3% - 97,6%)	93,7 (88,4 – 97,1%)

O sorogrupo Icterohaemorrhagiae (58,0%) foi o mais prevalente entre os prováveis sorogrupos infectantes dos 124 casos confirmados de leptospirose pelo MAT, seguido dos sorogrupos Canicola e Cynopteri (8%), Australis e Sejroe (3,2%), Hebdomadis e Pyrogenes (2,4%), Bataviae e Grippotyphosa (0,8%). Dezesesseis casos (12,9%) apresentaram resultado inconclusivo. O caso que tinha como provável sorogrupo infectante Javanica, apresentado na tabela 5, não foi incluído nessa segunda etapa do estudo por não haver volume de soro disponível para realização do teste. Os resultados do MAT e Dot-blot IgM segundo os prováveis sorogrupos infectantes estão na tabela 11.

Tabela 11 - Resultados dos testes MAT e Dot-blot IgM, realizados em soros dos 124 casos de leptospirose, segundo os prováveis sorogrupos infectantes

Provável sorogrupo infectante	Nº de casos detectados pelo MAT (%)	Nº de casos detectados pelo Dot-blot IgM (%)		
		TR	TR2	TR19
Australis	4 (3,2)	4 (100)	4 (100)	3 (75)
Bataviae	1 (0,8)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Canicola	10 (8)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
Cynopteri	10 (8)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
Grippotyphosa	1 (0,8)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Hebdomadis	3 (2,4)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
Icterohaemorrhagiae	72 (58,0)	70 (97,2)	70 (97,2)	69 (95,8)
Pyrogenes	3 (2,4)	2 (66,7)	3 (100)	2 (66,7)
Sejroe	4 (3,2)	4 (100)	4 (100)	4 (100)
Inconclusivos	16 (12,9)	16 (100)	16 (100)	16 (100)

A tabela 12 mostra a sensibilidade dos testes de Dot-blot IgM de acordo com o número de dias após o início dos sintomas. Nos primeiros sete dias de doença o teste que apresentou maior sensibilidade foi o que utilizou TR19 como antígeno.

Tabela 12 - Sensibilidade do Dot-blot IgM em relação aos dias após início dos sintomas

Dias após o início dos sintomas*	Número de amostras	Sensibilidade do Dot-blot IgM (%)		
		TR	TR2	TR19
1-7	86	52,3	39,5	60,5
8-14	54	72,2	75,9	74,1
15-21	35	97,1	94,3	100
≥22	41	95,1	97,6	90,2

* Informações entre os dias de sintomas e coleta de soro estavam ausentes para 32 amostras

A tabela 13 apresenta os resultados dos testes de Dot-blot IgM em relação aos títulos apresentados no MAT nas segundas amostras de soro dos casos confirmados de leptospirose. O teste Dot-blot IgM em soros com título de 200 apresentaram reatividade de 78,6% com antígeno TR19 e 85,7% com ambos os antígenos TR e TR2, aumentando para mais de 90% nos soros com títulos maiores ou iguais a 400.

Tabela 13 - Resultados reagentes no Dot-blot IgM segundo a titulação do MAT nas segundas amostras de soro de casos confirmados de leptospirose.

Resultados do MAT em títulos*	Número de casos	Dot-blot IgM (%)		
		TR	TR2	TR19
200	14	12 (85,7)	12 (85,7)	11 (78,6)
400	13	13 (100)	13 (100)	12 (92,3)
800	18	17 (94,4)	18 (100)	17 (94,4)
1600	22	22 (100)	22 (100)	22 (100)
3200	22	22 (100)	22 (100)	22 (100)
6400	23	23 (100)	23 (100)	23 (100)
12800	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)
102400	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)

*Nenhum soro apresentou título de 25.600 ou 51.200

Na comparação do teste Dot-blot IgM com o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA utilizando antígenos TR, TR2 e TR19 nas primeiras amostras de soro dos 124 casos de leptospirose, o teste Dot-blot IgM foi reagente em 51,6% com TR, 43,2% com TR2 e 57,6% com TR19 enquanto o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA foi de 50,4%.

Todos os resultados dos ensaios realizados para verificação da repetibilidade e da reprodutibilidade do teste de Dot-blot IgM, com os três antígenos avaliados (TR, TR2 e TR19) foram concordantes, apresentando 100% de repetitividade e 100% de reprodutibilidade. Além disso, a concordância entre os testes realizados por dois técnicos diferentes apresentou índice Kappa=1,00.

4.3 Terceira etapa

A análise das 144 amostras cegas de soro de pacientes com suspeita de leptospirose e que foram submetidas ao teste Panbio® Leptospira IgM ELISA e ao teste de Dot-blot IgM mostrou que a concordância entre os dois testes foi quase perfeita tanto com antígeno TR quanto com antígeno TR19, apresentando índice Kappa de 0,93 (IC 95% 0.84 - 1.00) e 0,81 (IC 95% 0.69 - 0.94), respectivamente.

Das 144 amostras testadas, 26 (18,1%) apresentaram resultado reagente e 118 (81,9%) resultado não reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA. No teste Dot-blot IgM com antígeno TR, 23 (16,0%) amostras apresentaram resultado reagente e 121 (84,0%) amostras apresentaram resultado não reagente. Das 26 amostras com resultado reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA três apresentam resultado não reagente (tabela 14).

Tabela 14 – Comparação entre os testes Dot-blot IgM com antígeno TR e Panbio® Leptospira IgM ELISA em amostras de soro de pacientes com suspeita de leptospirose

Teste de	Teste Panbio® Leptospira IgM ELISA		Total
	Reagente	Não Reagente	
Dot-blot IgM TR			
Reagente	23	0	23 (16,0%)
Não reagente	3	118	121 (84,0%)
Total	26 (18,1%)	118 (81,9%)	144 (100%)

No teste Dot-blot IgM com antígeno TR19, 26 amostras (18,1%) apresentaram resultado reagente e 118 (81,9%) resultado não reagente. Das 26 amostras com resultado reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, quatro apresentaram resultado não reagente no teste Dot-blot IgM com antígeno TR19 e das 118 amostras com resultado não reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, quatro apresentaram resultado reagente no teste Dot-blot IgM com antígeno TR19 (tabela 15).

Tabela 15 – Comparação entre os testes Dot-blot IgM com antígeno TR19 e Panbio® Leptospira IgM ELISA – em amostras de soro de pacientes com suspeita de leptospirose

Teste de	Panbio® Leptospira IgM ELISA		Total
	Reagente	Não Reagente	
Dot-blot IgM TR19			
Reagente	22	4	26 (18,1%)
Não reagente	4	114	118 (81,9%)
Total	26 (18,1%)	118 (81,9%)	144 (100%)

5. DISCUSSÃO

A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial presente principalmente em países tropicais de clima úmido. No Brasil é uma doença endêmica diretamente associada a situações precárias de higiene e falta de saneamento básico com ocorrência de epidemias nos períodos de chuva principalmente após temporais e enchentes, com média de 13.000 casos notificados anualmente, sendo aproximadamente 3700 confirmados e letalidade média de 10,8%.^{46,130}

Os testes sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico da leptospirose e o MAT é o teste considerado como padrão ouro pela OMS. Porém, é bastante complexo por necessitar de leptospirosas vivas e de técnicos especializados para sua realização, principalmente para leitura de aglutinação em microscopia de campo escuro, e por isso é um teste restrito a laboratórios de referência.^{2,3} No Brasil o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA é distribuído em todo território nacional, pelo Ministério da Saúde, para os laboratórios centrais de saúde pública (LACENs) e é utilizado como teste de triagem no diagnóstico sorológico da leptospirose, sendo o MAT o teste confirmatório de casos.⁴⁶

Testes de ELISA tem a desvantagem de utilizar equipamentos específicos como leitora de microplacas e eventualmente lavadoras de placas para sua realização. A aquisição, manutenção e calibração desses equipamentos aumentam o custo desses exames. Além disso, dificulta a portabilidade do teste e consequentemente o uso da técnica em áreas com

menos recursos.¹¹² Dessa forma, é urgente a necessidade de testes rápidos, simples e baratos, que possam ser realizados em laboratórios de qualquer complexidade e em regiões com diferentes níveis socioeconômicos, para o diagnóstico da leptospirose humana no Brasil.

O teste de Dot-blot foi elaborado com o intuito de desenvolver imunoensaios que não necessitem de equipamentos especializados para sua realização, sendo mais simples e de menor custo. Para isso o teste de ELISA foi modificado substituindo microplacas de poliestireno por membranas de nitrocelulose como suporte e empregando um substrato cromogênico precipitável. Esse substrato, na forma oxidada, permitiu que o resultado fosse visualizado como um ponto colorido, não havendo necessidade de equipamentos para a realização da leitura dos resultados.^{112,114}

Pappas et al.¹³¹, em 1985, introduziram o teste de Dot-blot para o diagnóstico da leptospirose humana, utilizando antígenos extraídos pelo etanol. Após esse trabalho, vários outros estudos desenvolveram e avaliaram o teste de Dot-blot para o sorodiagnóstico da leptospirose humana, utilizando diferentes preparações antigênicas. Extrações por sonicação e por termo-resistência, realizadas a partir de cepas saprófitas e patogênicas, foram bastante utilizadas e os trabalhos demonstraram taxas de sensibilidade que variaram de 83,3% a 100% e de especificidade que variaram de 92,7% a 100%.¹³²⁻¹³⁸ Extração de antígenos de leptospiras por n-butanol foi utilizada para desenvolver um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da leptospirose em animais,¹³⁹ porém não foi estudado para leptospirose humana.

No presente trabalho, foram avaliadas três extrações diferentes de antígenos: por termo-resistência, por sonicação e por n-butanol. As extrações foram feitas a partir de *Leptospira* saprófita sorovar Patoc e *Leptospira* patogênica sorovar Copenhageni para o uso em teste de Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana. O sorovar Patoc é utilizado em testes para o diagnóstico da leptospirose por não apresentar risco biológico, já que não é patogênico, e por apresentar aglutinação com soros humanos contendo anticorpos anti-leptospiras patogênicas.¹⁴⁰ O sorovar Copenhageni é o mais prevalente no Brasil e o uso de sorovares circulantes na área em estudo para testes diagnósticos deve ser levado em consideração para melhorar o desempenho do teste.^{111,141}

A extração mais simples foi por termo-resistência, não necessitando de nenhum equipamento como o sonicador, nem utilizando substâncias que apresentam toxicidade, como o n-butanol. Antígenos extraídos por n-butanol de leptospiras patogênicas e não patogênicas, que nunca haviam sido avaliados para o sorodiagnóstico da leptospirose humana, mostraram reatividade em amostras de soro com anticorpos IgM anti-leptospiras de pacientes com leptospirose e o Dot-blot IgM utilizando esses antígenos apresentaram bons resultados de sensibilidade e especificidade, porém, a comparação dos três antígenos mostrou que o Dot-blot IgM com antígenos extraídos por termo-resistência apresentou melhores resultados.

O presente estudo também objetivou comparar a utilização de anticorpos anti-IgM humanos conjugados com fosfatase alcalina com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com peroxidase no teste de Dot-blot. Ambos conjugados

foram utilizados em testes diagnósticos para leptospirose, porém a comparação entre eles nunca foi realizada.^{105,110,111,138,142–145} O teste de Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina apresentou maior sensibilidade e precocidade, porém utilizando conjugado peroxidase apresentou maior especificidade e maior estabilidade nas membranas. As membranas de Dot-blot IgM utilizando conjugado peroxidase foram estáveis por 12 meses nas temperaturas de freezer, refrigerador e ambiente, bloqueadas ou não com leite a 5%, porém no Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina, perdeu a especificidade, apresentando resultados falso positivos em 6 meses em todas as condições de estocagem. Como o diagnóstico precoce da leptospirose é de extrema importância para o tratamento adequado do paciente podendo reduzir a letalidade da doença,⁵⁷ a baixa sensibilidade apresentada pelo teste Dot-blot IgM com conjugado peroxidase, principalmente em amostras de soro coletadas na fase aguda, mostra que este conjugado não é a melhor opção para ser utilizado nesse teste.

Testes com interpretação visual de resultados são subjetivos, porém, os testes de Dot-blot IgM com todos os antígenos e ambos os conjugados avaliados no presente estudo apresentaram resultados visuais confiáveis, já que a concordância dos resultados interpretados por dois observadores independentes foi quase perfeita.

Apesar de os antígenos estudados terem apresentado uma banda dominante entre 75 e 50 kDa na eletroforese de proteínas por SDS-PAGE, no “immunoblotting” realizado para os antígenos TR2 e TR19, os soros de pacientes com leptospirose reagiram com frações proteicas de peso molecular

mais baixos, entre 37 e 10 kDa para TR2 e entre 20 e 10 kDa para TR19. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Ribeiro et al. (1992)¹⁴⁶ que estudou antígenos envolvidos na resposta de anticorpos humanos a infecções naturais por leptospirose e mostrou que os anticorpos IgM reagiram com frações antigênicas entre 22 e 14,8 kDa de leptospirosas.

Os testes de Dot-blot IgM com antígenos extraídos a partir de sorovar Patoc detectaram precocemente anticorpos IgM anti-leptospirosas em relação aos testes com antígenos extraídos do sorovar Copenhageni, apresentando maior número de resultados reagentes nas primeiras amostras de soro de casos confirmados de leptospirose. Em um estudo realizado por Blanco et al. (2009)¹⁰⁵ também foi demonstrado que Dot-blot utilizando glicolipoproteína extraída de sorovar Patoc era precoce em relação ao que utilizou glicolipoproteína extraída de sorovar Copenhageni.

Nas segundas amostras de soro dos casos confirmados de leptospirose que tinham resultado reagente no MAT com títulos ≥ 200 , nenhum antígeno apresentou 100% de reatividade. O TR2 foi o antígeno com maior número de resultados reagentes no Dot-blot IgM utilizando fosfatase alcalina, apresentando 96,6% de reatividade, com apenas cinco soros não reagentes e que apresentaram títulos de 200 no MAT. No Dot-blot IgM utilizando peroxidase o antígeno que apresentou maior número de resultados reagentes foi o But2, com 90,5% de reatividade e 14 soros com resultados não reagentes, sendo que oito apresentaram título de 200 no MAT. Títulos de 200 são considerados baixos, principalmente em áreas endêmicas para leptospirose.^{3,147}

O Dot-blot IgM com antígeno TR19 apresentou maior sensibilidade nos sete primeiros dias da doença, sendo o mais precoce em detectar a doença. Essa precocidade também foi demonstrada quando o Dot-blot IgM foi comparado ao teste Panbio® Leptospirose ELISA IgM, sendo o que utilizou antígeno TR19 o único que apresentou maior número de resultados reagentes nas primeiras amostras de soro, quando utilizado fosfatase alcalina como conjugado.

O Dot-blot IgM utilizando todos os antígenos mostrou ser gênero-específico, tendo apresentado resultados reagentes com todos os diferentes sorogrupos, classificados pelo MAT, de maior circulação no Brasil. Os resultados dos testes de Dot-blot IgM utilizando antígenos extraídos de sorovar Patoc foram semelhantes aos que utilizaram antígenos extraídos de sorovar Copenhageni, inclusive nos soros cujo sorogrupo era o Icterohaemorrhagiae, ao qual o sorovar Copenhageni pertence. Essa semelhança pode ser explicada pelo alto grau de reação cruzada que ocorre entre diferentes sorogrupos.³

A avaliação final da comparação entre os antígenos e os conjugados estudados demonstrou que o Dot-blot IgM com antígenos TR2 e TR19 e com conjugado fosfatase alcalina apresentaram melhores resultados, com taxas de sensibilidade de 96,6% e 93,9% e de especificidade de 90,5% e 95,3%, respectivamente. Comparando esses dados com os apresentados pelo teste Panbio® Leptospira ELISA IgM, atualmente utilizado no Brasil como teste de triagem para leptospirose, quando avaliado em outros estudos, as taxas de sensibilidade e especificidade foram semelhantes. Esses estudos mostraram

que as taxas de sensibilidade desse teste variaram entre 76,1% e 100% e de especificidade entre 82,6% e 93,3%.^{99,148,149}

Uma nova padronização do Dot-blot IgM foi realizada utilizando os antígenos TR2, TR19 e a mistura desses dois antígenos em volumes iguais (antígeno TR) e utilizando anticorpo anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina e foi demonstrado que essa padronização apresentou algumas melhorias em relação ao teste da primeira etapa, como a estabilidade por 12 meses em todas as condições de estocagem testadas, com as membranas bloqueadas ou não com L-PBS-T 3%, mostrando que as membranas de nitrocelulose sensibilizadas com antígenos podem ficar armazenado por um longo período. Além disso, houve a diminuição do tempo de incubação das membranas que era de uma hora para 30 minutos, tanto com as amostras de soro quanto com o conjugado, diminuindo o tempo total de realização do teste.

Na eletroforese de proteínas por SDS-PAGE o antígeno TR também apresentou uma banda dominante entre 75 e 50 kDa, assim como os antígenos avaliados na primeira etapa do trabalho, e no “immunoblotting”, como já era esperado, os soros de pacientes com leptospirose reagiram com frações de peso molecular mais baixos, entre 37 e 10 kDa.

Na segunda etapa, o Dot-blot IgM também detectou os casos de leptospirose precocemente em relação ao teste de MAT, tendo apresentado resultado reagente em 58,1%, 51,6% e 43,5% das primeiras amostras de soro de casos confirmados de leptospirose com os antígenos TR19, TR e TR2, respectivamente. Nas segundas amostras de soro dos casos confirmados de leptospirose que tinham resultado reagente no MAT com títulos ≥ 200 , os

resultados do Dot-blot IgM com os três antígenos foram semelhantes, sendo que o antígeno TR2 (97,6%), apresentou maior número de resultados reagentes, seguido do antígeno TR (96,8%) e TR19 (96,0%). As duas amostras de soro que apresentaram resultado não reagente no Dot-blot IgM com antígeno TR2 apresentaram título de 200. Das três amostras com resultado não reagente no Dot-blot IgM com antígeno TR, duas apresentaram título de 200 e das cinco amostras com resultados não reagentes no Dot-blot IgM com antígeno TR19, três apresentaram título de 200. Sendo 200 um título considerado baixo, principalmente em áreas endêmicas para leptospirose,³ como no Brasil, isso pode explicar esses resultados não reagentes.

A sensibilidade relativa do teste de Dot-blot IgM foi maior nas primeiras amostras de soro de casos de leptospirose com o antígeno TR19 (58,1%), porém nas segundas amostras o antígeno TR2 (97,6%) apresentou resultado maior de sensibilidade. A taxa de sensibilidade do teste Dot-blot IgM com antígeno TR variou de 51,6% para 96,8% entre as primeiras e segundas amostras de soro. O antígeno TR apresentou maior taxa de especificidade (95,8%) quando comparado aos antígenos TR2 e TR19. Esses resultados são semelhantes a outros testes Dot-blot desenvolvidos para o diagnóstico de leptospirose humana, no entanto, é importante avaliar testes diagnósticos nos locais onde se pretende usá-los na prática, pois os resultados variam em diferentes países e regiões devido às suas características epidemiológicas e sorovares circulantes de leptospira.^{16,55,57,103,104,133,150,151}

Os resultados de sensibilidade e especificidade do teste padronizado no presente estudo foram maiores do que os apresentados por um teste rápido TR

DPP® Leptospirose, desenvolvido pela Bio-Manguinhos/Fiocruz em parceria com a Chembio Diagnostics (EUA) e aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil para ser utilizado no diagnóstico da leptospirose humana. O TR DPP® Leptospirose apresentou 85% de sensibilidade e 87% de especificidade em amostras de soro humano. Além disso, esse teste rápido utiliza como antígeno altas concentrações de proteína recombinante, sendo esse um processo de obtenção de antígenos mais complexo do que por termo-resistência.¹⁵²

Nos primeiros sete dias após o início dos sintomas o Dot-blot IgM com antígeno TR19 foi o que apresentou maior taxa de sensibilidade (60,5%), seguido do Dot-blot IgM com antígeno TR (52,3%) e com antígeno TR2 (39,5%). O Dot-blot IgM com os antígenos TR19 (58,1%) e TR (51,6%) também apresentaram maior número de resultados reagentes quando comparado ao teste Panbio® Leptospirose ELISA IgM, que apresentou 50,0% de reatividade, em amostras agudas de casos de leptospirose. A baixa sensibilidade apresentada pelo antígeno TR2 nas amostras coletadas na fase aguda em comparação aos antígenos TR e TR19, mostra que esse não é o melhor antígeno para ser utilizado no teste de Dot-blot IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana, já que o diagnóstico precoce é essencial para o tratamento oportuno do paciente como forma de reduzir a gravidade da doença e o número de óbitos.⁴⁶

O teste de Dot-blot IgM com os três antígenos se mostrou altamente consistente, com 100% de repetibilidade e reprodutibilidade, e confiável, com concordância quase perfeita entre os resultados analisados por dois observadores independentes. Além disso, apresentou resultados reagentes

com todos os diferentes sorogrupos classificados pelo MAT, sugerindo que é adequado como teste de triagem para o diagnóstico da leptospirose humana causada pelos principais sorogrupos circulantes no Brasil.

A comparação dos testes de Dot-blot IgM com os antígenos TR, TR2 e TR19 mostrou que Dot-blot IgM com antígeno TR19 apresentou maior taxa de sensibilidade na fase aguda da doença e que com antígeno TR apresentou maior taxa de especificidade. Assim, foram preparados um “kit” de Dot-blot IgM com antígeno TR e um “kit” de Dot-blot IgM com antígeno TR19 e foram testadas 144 amostras cegas de pacientes com suspeita de leptospirose, que haviam sido submetidas ao teste Panbio® Leptospira IgM ELISA.

Apesar do Dot-blot IgM com antígeno TR ter apresentado índice Kappa maior do que com antígeno TR19 (0,93 e 0,81 respectivamente), ambos apresentaram concordância quase perfeita com o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, demonstrando que o Dot-blot IgM desenvolvido no presente estudo possui capacidade de detecção de anticorpos anti-leptospiras comparável à capacidade de detecção do teste já utilizado como teste de triagem para o diagnóstico da leptospirose humana no Brasil, sendo que o teste Dot-blot IgM tem a vantagem de ser realizado totalmente em temperatura ambiente enquanto que o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA necessita de duas incubações a 37°C. Além disso, o teste Dot-blot IgM utiliza menor quantidade de reagentes e não necessita de equipamentos especializados para sua realização.

Não houve discordância entre o teste Dot-blot IgM com antígeno TR e o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA quando aplicados nas amostras com

resultados não reagente no teste de ELISA, porém, três amostras apresentaram resultados discordantes nos dois testes, sendo reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA e não reagente no teste Dot-blot IgM. Essas amostras apresentaram resultado não reagente no teste de MAT.

Na comparação entre os testes de Dot-blot IgM com antígeno TR19 e o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA, oito pacientes apresentaram resultados discordantes. Dos quatro pacientes que apresentaram resultado reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA e não reagente no teste Dot-blot IgM com antígeno TR19, um caso foi confirmado pelo teste de MAT, apresentando soroconversão, ou seja, com resultado não reagente nessa amostra testada no Dot-blot IgM e no Panbio® Leptospira IgM ELISA, mas com uma segunda amostra reagente, demonstrando que o teste Dot-blot IgM com antígeno TR19 deixou de detectar precocemente um caso posteriormente confirmado de leptospirose. Esse caso apresentou resultado reagente no teste Dot-blot IgM com antígeno TR. As outras três amostras apresentaram resultado não reagente no teste de MAT e foram as mesmas amostras que apresentaram discordância com o teste Dot-blot IgM com antígeno TR.

Dos quatro pacientes que apresentaram resultados não reagente no teste Panbio® Leptospira IgM ELISA e reagente no teste Dot-blot IgM com antígeno TR19, três apresentaram resultado não reagente no MAT e um apresentou resultado reagente no MAT com título de anticorpos de 200, porém título de 200 no MAT em amostras únicas de soro não é suficiente para confirmar ou descartar casos de leptospirose, sendo esses casos considerados

como presuntivos. Essas amostras apresentaram resultado não reagente do teste Dot-blot IgM com antígeno TR.

Testes de triagem costumam apresentar maior taxa de sensibilidade do que de especificidade a fim de detectar o maior número de casos possíveis. No diagnóstico da leptospirose o ideal é que existam testes de triagem com boa sensibilidade, principalmente na fase aguda da doença, para que um maior número de casos possa ter conduta terapêutica precoce, podendo reduzir o tempo de internação e o número de óbitos, com posterior confirmação desses casos pelo teste de MAT. O teste Dot-blot IgM com TR19 apresentou maior sensibilidade na fase aguda da doença e, portanto, TR19 é o antígeno mais indicado para ser utilizado nesse teste. Além disso, esse antígeno é extraído de apenas um sorovar, que por ser saprófita apresenta menos risco biológico em sua manipulação.

Os testes sorológicos são os mais utilizados no diagnóstico da leptospirose, sendo fundamentais para o tratamento correto do paciente e no auxílio à vigilância epidemiológica e prevenção da doença. Testes de Dot-blot utilizam pouca quantidade de reagentes e não necessitam de equipamentos especializados, sendo vantajosos em relação aos testes de ELISA. O teste de Dot-blot IgM utilizando como antígeno TR19 e fosfatase alcalina como conjugado desenvolvido no presente trabalho mostrou detecção precoce, facilidade de realização sendo útil em laboratórios com pouca infraestrutura, e boas taxas de sensibilidade e especificidade, podendo ser um teste de triagem sorológica para a rotina diagnóstica da leptospirose humana no Brasil.

6. CONCLUSÕES

- A extração de antígenos por termo-resistência é mais simples e segura do que por sonicação ou n-butanol, não necessitando de equipamentos complexos como sonicador ou de substâncias tóxicas como n-butanol;
- Dot-blot IgM com anticorpos anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina apresentaram maior sensibilidade e detecção precoce;
- Dot-blot IgM com anticorpos anti-IgM humano conjugado com peroxidase apresentaram maior especificidade;
- As membranas sensibilizadas com os antígenos e estocadas em diferentes condições apresentaram maior estabilidade quando submetidas ao Dot-blot IgM com conjugado peroxidase;
- O teste de Dot-blot IgM que apresentou maior sensibilidade foi o que utilizou TR2 como antígeno e fosfatase alcalina como conjugado;
- O teste com maior sensibilidade nos primeiros dias de doença foi o Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina e antígeno TR19;
- O Dot-blot IgM utilizando conjugado fosfatase alcalina e antígeno TR19 foi o único detectou maior número de casos em comparação com o teste Panbio® Leptospira IgM ELISA;
- O teste de Dot-blot IgM desenvolvido com antígenos TR2, TR19 e TR e com conjugado fosfatase alcalina mostrou resultado visual confiável;
- O teste de Dot-blot IgM foi mais sensível do que o MAT nas amostras colhidas na fase aguda da doença;

- O teste de Dot-blot IgM se mostrou consistente, com 100% de reprodutibilidade e repetibilidade;
- O teste de Dot-blot IgM pode ser armazenado por 12 meses tanto em temperatura ambiente, quanto em freezer -20°C ou geladeira;
- O teste de Dot-blot IgM foi capaz de detectar todos os diferentes sorovares fornecidos pelo MAT nos casos confirmados de leptospirose;
- O teste de Dot-blot IgM com antígeno TR19 apresentou maior sensibilidade em amostras colhidas nos primeiros sete dias da doença, em relação ao Dot-blot IgM com antígenos TR2 e TR;
- A capacidade de detecção de anticorpos anti-leptospiras do teste Dot-blot IgM com antígenos TR e TR19 é comparável à capacidade de detecção do teste Panbio® Leptospira IgM ELISA;
- O Dot-blot IgM com antígeno TR19 e conjugado fosfatase alcalina mostrou os melhores resultados e poderá ser usado como teste de triagem para o sorodiagnóstico da leptospirose humana no Brasil.

7. ANEXO A

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Teste dipstick usando diferentes antígenos para o sorodiagnóstico da leptospirose humana

Pesquisador: ELIETE CALO ROMERO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66641616.9.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.101.072

Apresentação do Projeto:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 17/05/2017.

Objetivo da Pesquisa:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 17/05/2017.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 17/05/2017.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 17/05/2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Análise ética com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 17/05/2017 e respostas às pendências de 23/05/2017.

Documentos apresentados e de acordo, a seguir.

1. Termo de anuência dos colaboradores do IAL.
2. Autorização pra uso de material biológico humano e dados associados sob guarda do Laboratório de Leptospirose do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do IAL, assinado por Dra. Rosemeire C. Z. Ramos, diretora substituta, de

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.101.072

18/05/2017.

3. Ciência das normas do Instituto Adolfo Lutz: Portaria DG/IAL 16, de 22 de dezembro de 2010 (Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL) e Portaria DG/IAL 25, de 07 de outubro de 2014 (Regimento do Comitê de Coleções Biológicas do IAL).

4. Orçamento detalhado.

Foi aceita a justificativa de não incluir as amostras em grupos no item "Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro" do documento "PB informações básicas do projeto", uma vez que segundo o entendimento da pesquisadora responsável não serão abordados indivíduos nesta pesquisa e logo não há razão para distribuição em grupos.

A pesquisadora responsável esclareceu a apresentação de dois documentos do CTC IAL em razão de atualização da pesquisa junto ao colegiado.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os documentos apresentados em resposta ao CEPAL atenderam plenamente às exigências do comitê e estão de acordo com as normas de ética em pesquisa e as diretrizes do IAL.

Protocolo de pesquisa aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 18 de maio de 2017.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.101.072

aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_809689.pdf	23/05/2017 14:34:19		Aceito
Orçamento	orcamento.xls	23/05/2017 14:32:59	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Outros	Resposta.pdf	23/05/2017 12:01:41	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	amostras.pdf	18/05/2017 16:22:13	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia.pdf	18/05/2017 16:12:53	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Outros	CTC_DG_04_04_17.pdf	04/04/2017 15:24:24	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Outros	CTC.pdf	31/03/2017 13:57:05	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Outros	CTC_2017.pdf	31/03/2017 13:56:45	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	04/11/2016 09:39:26	Roberta Morozetti Blanco	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	03/11/2016 16:16:25	Roberta Morozetti Blanco	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES

Continuação do Parecer: 2.101.072

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Junho de 2017

Assinado por:

Luz Marina Trujillo
(Coordenador)**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

8. REFERÊNCIAS

1. Levett PN. Systematics of leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:11-20.
2. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne: Medisci Press; 1999.
3. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol*. 2001;14(2):296–326.
4. Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol*. 2017;20(4):184–93.
5. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Bacteriol*. 1987;37(4):407–15.
6. Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42(2):215–9.
7. Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, et al. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48(3):851–8.
8. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:839–58.
9. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(3):671–3.
10. Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthiellii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(5):1859–62.
11. Saito M, Villanueva SYAM, Kawamura Y, Iida KI, Tomida J, Kanemaru T, et al. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(7):2457–62.
12. Samrot A V., Sean TC, Bhavya KS, Sahithya CS, Chandrasekaran S, Palanisamy R, et al. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis—a review. *Pathogens*. 2021;10(2):1–30.
13. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010;140(3–4):287–96.
14. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Figures from Leptospirosis - a zoonotic disease of global importance.

- Lancet Infect Dis. 2003;3(12):757–71.
15. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. Infect Immun. 2005;73(8):4853–63.
 16. Haake DA, Zückert WR. The leptospiral outer membrane. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;387(3–4):187–221.
 17. Nascimento ALTO, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. J Bacteriol. 2004;186(7):2164–72.
 18. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS One. 2008;3(2):1–9.
 19. Atzingen M V., Gómez RM, Schattner M, Pretre G, Gonçalves AP, de Moraes ZM, et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. J Infect. 2009;59(4):264–76.
 20. Vieira ML, de Moraes ZM, Gonçalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. J Infect. 2010;60(1):52–64.
 21. Evangelista K V, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. 2010;5(9):1413–25.
 22. Oliveira TR, Longhi MT, Gonçalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. Microbes Infect. 2010;12(3):207–17.
 23. Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento ALTO. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. Microb Pathog. 2011;51(5):360–5.
 24. Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. Microb Pathog. 2012;53(3–4):125–34. doi.org/10.1016/j.micpath.2012.06.001
 25. Lima SS, Ching ATC, Fávaro RD, Da Silva JB, Oliveira MLS, Carvalho E, et al. Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by in vivo and in vitro shotgun phage display. Biochem Biophys Res Commun. 2013;431(2):342–7.
 26. Fernandes LG, Siqueira GH, Teixeira ARF, Silva LP, Figueredo JM, Cosate MR, et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host–pathogen interactions. Vet Immunol Immunopathol. 2016;176:50–7. doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.004.
 27. Siqueira GH, de Souza GO, Heinemann MB, Vasconcellos SA,

- Nascimento ALTO. The role of Lsa23 to mediate the interaction of *Leptospira interrogans* with the terminal complement components pathway. *Microb Pathog.* 2017;112:182–9 doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.058.
28. Pereira PRM, Fernandes LGV, de Souza GO, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Romero EC, et al. Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. *Int J Med Microbiol.* 2017;307(6):297–310 doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.05.006.
 29. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):297–307. doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5
 30. Evangelista K, Franco R, Schwab A, Coburn J. *Leptospira interrogans* Binds to Cadherins. Lukehart S, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Jan 30;8(1):e2672.
 31. Atzingen M V., Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, De Moraes ZM, Lima DMC, et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol.* 2008;8:1–16.
 32. Siqueira GH, Atzingen M V., Alves IJ, De Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. Characterization of three novel adhesins of *leptospira interrogans*. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(6):1103–16.
 33. Pinne M, Haake DA. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. *PLoS One.* 2013;8(1).
 34. Croda J, Figueira CP, Wunder EA, Santos CS, Reis MG, Ko AI, et al. Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species: Disruption of the LigB Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. *Infect Immun.* 2008;76(12):5826–33.
 35. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Breda LCD, Vasconcellos SA, Figueira CP, Picardeau M, et al. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunol Lett.* 2016;173:61–8.
 36. Ristow P, Bourhy P, McBride FWDC, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):0894–903.
 37. Vinh T, Adler B, Faine S. Glycolipoprotein Cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *J Gen Microbiol.* 1986;132:111–23.
 38. Cesar KR, Romero EC, de Bragança AC, Blanco RM, Abreu PAE, Magaldi AJ. Renal Involvement in Leptospirosis: The Effect of Glycolipoprotein on Renal Water Absorption. Câmara NOS, editor. *PLoS One.* 2012;7(6):e37625.
 39. Macedo Santos RT, Sakata EE, Yasuda PH, Wakamatsu A, Kanamura

- CT, Candelori I, et al. Glicolipoproteína de *Leptospira interrogans* sorogrupo icterohaemorrhagiae: distribuição em fígado e rim de cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989;31(4):235–41.
40. Murray GL, Srikram A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*. 2010;78(3):701–9.
 41. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):408–19.
 42. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. Small PLC, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003898.
 43. Sinan/SVS/MS. Óbitos por Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017 [Internet]. [cited 2018 Nov 26]; Available from: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/09/Leptospirose-2000-2017-obitos.pdf>.
 44. Romero EC, Bernardo CC da M, Yasuda PH. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(5):245–8.
 45. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:65-97.
 46. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico [Internet]. 2014. [cited 2020 Dec 14]; [about 44p.]. Available from: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leptospirose-diagnostico-manejo-clinico2.pdf>
 47. Blanco RM, Romero EC. Fifteen years of human leptospirosis in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Res*. 2015;2(1):56.
 48. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003843.
 49. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Vol. II. [Internet]. 2002. [cited 2020 Dec 14]; [about 842p.]. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_II.pdf
 50. Romero EC, Yasuda PH. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):373–8.
 51. Daher EF, Lima RSA, Silva Júnior GB, Silva EC, Karbage NNN, Kataoka

- RS, et al. Clinical presentation of leptospirosis: A retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2010;14(1):3–10.
52. Carvalho CRR, Bethlem EP. Pulmonary complications of leptospirosis. *Clin Chest Med*. 2002;23(2):469–78.
 53. Gulati S, Gulati A. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Lung India*. 2012;29(4):347.
 54. Gouveia EL, Metcalfe J, De Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):505–8.
 55. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):245–52.
 56. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43(1):1–9.
 57. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(1):1–8.
 58. Romero EC, Caly CR, Yasuda PH. The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40(3):183–4.
 59. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire. *J Bacteriol*. 1967;94(1):27–31.
 60. Ellinghausen HCJ, McCullough WG. Nutrition of leptospira Pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res*. 1965 Jan;26:45–51.
 61. Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC, Silva M V., Lomar A V. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992 Jun;34(3):217–21.
 62. Pinhata JMW, Blanco RM, Romero EC. Evaluation of inhibitors for development of a selective medium for isolation of *Leptospira* spp. from clinical samples. *Lett Appl Microbiol*. 2018;66(6):558–64.
 63. Levett PN, Galloway RL. Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(4):628–32.
 64. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(5):623–7.
 65. Galloway RL, Levett PN. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9).
 66. Machry L, Ribeiro RL, Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Cristina Menezes de

- Oliveira I, Eliane Santos Avelar K, et al. Caracterização de cepas de referência de leptospira sp utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):166–9.
67. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(11):3954–62.
 68. Pavan ME, Cairó F, Brihuega B, Samartino L. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008;31(1):37–45.
 69. Romero ECC, Blanco RMM, Galloway RLL. Analysis of Multilocus Sequence Typing for Identification of *Leptospira* Isolates in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3940–2.
 70. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):1–8.
 71. Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MTG, et al. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1).
 72. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJJM, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*. 1993;139(8):1691–700.
 73. Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994;32(4):1035–9.
 74. Waggoner JJ, Pinsky BA. Molecular diagnostics for human leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29(5):440–5.
 75. Brown PD, Gravekamp C, Carrington D, Van de Kemp H, Hartseerl RA, Edwards CN, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*. 1995;43:110–4.
 76. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons I Saint. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2219–24.
 77. Romero EC, Blanco RM, Yasuda PH. Aseptic meningitis caused by *Leptospira* spp diagnosed by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Dec;105(8):988–92.
 78. Blanco RM, Romero EC. Evaluation of nested polymerase chain reaction for the early detection of *Leptospira* spp. DNA in serum samples from patients with leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;78(4):343–6.
 79. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, Meza-Brewster J, Korver H,

- Terpstra WJ. Detection of Leptospirosis in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. *Clin Microbiol.* 1994;32(8):1894–8.
80. Noda AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón AM. PCR altamente sensible para la detección de *Leptospira* spp. patógenas en tejidos embebidos en parafina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56(5):411–5.
 81. Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: Association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis.* 2012;54(9):1249–55.
 82. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 2006;6:1–10.
 83. Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. Bereswill S, editor. *PLoS One.* 2009 Sep 18;4(9):e7093.
 84. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis.* 2002 Dec 8;2(1):1–7.
 85. Ahmed SA, Sandai DA, Musa S, Hoe CH, Riadzi M, Lau KL, et al. Rapid Diagnosis of Leptospirosis by Multiplex PCR. *Malaysian J Med Sci.* 2012;19(3):9–16.
 86. Esteves LM, Bulhões SM, Branco CC, Carreira T, Vieira ML, Gomes-Solecki M, et al. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of *Leptospira* at the Onset of Disease. *Sci Rep.* 2018;8(1):9213.
 87. Palaniappan RUM, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes.* 2005;19(2):111–7.
 88. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2154–60.
 89. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005;54(1):45–9.
 90. Riediger IN, Stoddard RA, Ribeiro GS, Nakatani SM, Moreira SDR, Skraba I, et al. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(9):1–14.
 91. Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA.

- Novel TaqMan PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods*. 2012;91(1):184–90.
92. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):247–55.
 93. González S, Geymonat JP, Hernández E, Marqués JM, Schelotto F, Varela G. Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(12):941–5.
 94. Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study. *PLoS One*. 2011;6(1):1–6.
 95. Rajapakse S, Rodrigo C, Handunnetti SM, Fernando DD. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: Diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14(1):1–8.
 96. Yasuda PH, E. S, M.A. S-Y, S.A. V, Romero EC, da Silva M V., et al. Avaliação da contraímunoelctroforese com antígenos dos sorovars icterohaemorrhagiae E patoc no diagnóstico sorológico da leptospirose humana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33(6):497–502.
 97. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the Indirect Hemagglutination Assay for Diagnosis of Acute Leptospirosis Evaluation of the Indirect Hemagglutination Assay for Diagnosis of Acute Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):11–4.
 98. Smits HL, Van Der Hoorn MAWG, Goris MGA, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1272–5.
 99. Desakorn V, Wuthiekanun V, Thanachartwet V, Sahassananda D, Chierakul W, Apiwattanaporn A, et al. Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(3):524–7.
 100. Amran F, Liow YL, Noor Halim NA. Evaluation of a commercial immuno-chromatographic assay kit for rapid detection of IgM antibodies against *Leptospira* antigen in human serum. *J Korean Med Sci*. 2018;33(17):e131.
 101. Vanithamani S, Shanmughapriya S, Narayanan R, Raja V, Kanagavel M, Sivasankari K, et al. Lipopolysaccharide specific immunochromatography based lateral flow assay for serogroup specific diagnosis of leptospirosis in India. *PLoS One*. 2015;10(9):1–13.
 102. Eugene EJ, Handunnetti SM, Wickramasinghe SA, Kalugalage TL,

- Rodrigo C, Wickremesinghe H, et al. Evaluation of two immunodiagnostic tests for early rapid diagnosis of leptospirosis in Sri Lanka: A preliminary study. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):1–5.
103. Vijayachari P, SUGUNAN AP, Sehgal SC, Leptospirosis N, Centre R, Medical R, et al. Evaluation of Lepto Dri Dot as a rapid test for the diagnosis of leptospirosis. *Epidemiol Infect*. 2002;129(3):617–21.
 104. Bajani MD, Ashford D a, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel R a, et al. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):803–9.
 105. Blanco RM, Takei K, Romero EC. Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(2):267–73.
 106. Effler P V., Domen H, Bragg SL, Aye T, Sasaki DM. Evaluation of the Indirect Hemagglutination Assay for Diagnosis of Acute Leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1081–4.
 107. Rosa MI, Reis MF dos, Simon C, Dondossola E, Alexandre MC, Colonetti T, et al. IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet*. 2017;22(12):4001–12.
 108. Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med*. 2005;51(3):195–200.
 109. Bourhy P, Vray M, Picardeau M. Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*. 2013;62(6):822–7.
 110. McBride AJA, Pereira FA, da Silva ED, de Matos RB, da Silva ED, Ferreira AGP, et al. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospire assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop*. 2007;102(3):206–11.
 111. da Silva M V., Camargo ED, Vaz AJ, de Souza AM, Chieffi PP, Sakata EE. Imunodiagnóstico da leptospire humana através do teste ELISA-IgM, empregando-se diferentes preparações antigênicas a partir de sorotipos prevalentes de *Leptospira interrogans*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1990;32(4):233–9.
 112. Pappas MG. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. *Vet Parasitol*. 1988;29(2–3):105–29.
 113. Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 1983;64(1–2):205–14.
 114. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies. *Anal Biochem*. 1982;119:142–7.
 115. Corral MA. Imunoproteômica aplicada ao aprimoramento do diagnóstico sorológico da espiroqueliose humana. Universidade de São Paulo; 2018.

116. Camargo ED, Silva M V., Va AJ, Batista L, Brandão AP, Ferreira AW, et al. ELISA-IgM applied to cerebrospinal fluid in human leptospirosis. *Serodiagn Immunother Infect Dis*. 1995;7(1):19–22.
117. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. 67th ed. World Health Organization, editor. Geneva: World Health Organization; 1982.
118. Delbem ÁCB. Purificação, caracterização e avaliação da capacidade imunogênica do lipopolissacarídeo (LPS) de *Leptospira* spp isolada no Brasil associado ao hidróxido de alumínio ou monofosforil lipídico A como adjuvantes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2004.
119. ISO/TR 14468:2010 - Selected illustrations of attribute agreement analysis
120. CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. CLSI document EP12-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.
121. Avaliação de Testes Diagnósticos [Internet]. [cited 2020 Jan 21] [about 20p.]Available from: <https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/59/o/Modulo2-Avaliacaodetestesdiagnosticos.pdf>
122. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May;72:248–54.
123. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
124. Passos AN. Avaliação da aplicabilidade da técnica de imunoblotting para a pesquisa de anticorpos circulantes anti- *Paracoccidioides brasiliensis* e anti- *Histoplasma capsulatum* em laboratório de Saúde Pública [Dissertação] . São Paulo: Coordenadoria de controle de Doenças da secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.
125. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. Statistical Methods in Medical Research. 4th ed. Oxford: Wiley; 2013.
126. Ferreira AW, Moraes-Ávila S do L. Diagnostico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
127. Sackett DL. Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine. 2nd ed. Boston: Little, Brown; 1991.
128. Kawamura T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(4):437–41.
129. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977 Mar;33(1):159.
130. Reinfra e Trata Brasil. Estudo mostra que diarreia, dengue e leptospirose crescem em cidades com saneamento básico precário [Internet]. [cited 2018 Dec 03] [about 24p.]. Available from: <http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/estudos/doencas/press-release.pdf>

131. Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, Takafuji ET, Miller RN, Hockmeyer WT. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific Dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34(2):346–54.
132. Andreescu N. A new preparatory method of thermically inactivated *Leptospira* Patoc antigen for rapid slide agglutination used as serosurvey test for human leptospiroses. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol.* 1990;49(3):223–7.
133. Sekhar WY, Soo EH, Gopalakrishnan V, Devi S. Leptospirosis in Kuala Lumpur and the comparative evaluation of two rapid commercial diagnostic kits against the MAT test for the detection of antibodies to leptospira interrogans *Leptospirosis in Kuala Lumpur and the Comparative Evaluation of Two Rapid C.* *Singapore Med J.* 2000;41(8):370–5.
134. Vinicius M, Silva DA, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, et al. Immunodiagnosis of human leptospirosis by DOT-ELISA for the detection of IgM , IgG , and IgA antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(6):650–5.
135. Gussenhoven GC, Van Der Hoorn MAWG, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol.* 1997;35(1):92–7.
136. Tansuphasiri U, Deepradit S, Phulsuksombati D, Tangkanakul W, Armed T. Two simple immunoassays using endemic leptospiral antigens for serodiagnosis of human. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 2005;36(2):302–11.
137. Shekatkar S, Harish BN, Parija SC. IgM Dot-ELISA assay using prevalent *Leptospira* strain for diagnosis of leptospirosis. *Int J Collab Res Intern Med Public Heal.* 2010;2(10):338–46.
138. Ganesh Kumar A, Rajasekar V, Selvakumar G, Dhanalakshmi DP, Nandagopal S. Comparison study between in-house IgM dot-elisa and the microscopic agglutination test (MAT) for the diagnosis of human leptospirosis. *Int Res J Pharm.* 2012;3(4):314–7.
139. Trueba GA, Bolin CA, Thoen CO. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Bovine Leptospirosis Caused by *Leptospira* Interrogans Serovar Hardjo Type Hardjo-Bovis. *J Vet Diagnostic Investig.* 1990 Oct 25;2(4):323–9.
140. Addamiano L, Babudieri B. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. *Bull World Health Organ.* 1968;39(6):925–34.
141. Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira* interrogans serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):195–9.

142. Cinco M, Balanzin D, Banfi E. Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy. *Eur J Epidemiol.* 1992;8(5):677–82.
143. Camargo ED, da Silva M V., Batista L, Vaz AJ, Sakata EE. Avaliação do teste ELISA-IgM no diagnóstico precoce da leptospirose humana. Vol. 34, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 1992. p. 355–7.
144. Pol S, Bharadwaj R. Evaluation of high performance liquid chromatography purified leptospiral antigen for the diagnosis of leptospirosis. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62(6):428–31.
145. Nakarin J, Pradutkanchana S. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect hemagglutination assay for detection of leptospiral antibody by using three different antigens. *J Med Assoc Thail.* 2004;87(10):1218–24.
146. Ribeiro MA, Sakata EE, Silva M V, Camargo ED, Vaz AJ, De Brito T. Antigens involved in the human antibody response to natural infections with *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *J Trop Med Hyg.* 1992 Aug;95(4):239–45.
147. Al-orry W, Arahou M, Hassikou R, Mennane Z. A review of laboratory diagnosis and treatment of leptospirosis. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016;8(12):7.
148. Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J Clin Microbiol.* 1997;35(8):1938–42.
149. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods.* 2006;65(2):247–57.
150. Goris MGA, Leeflang MMG, Loden M, Wagenaar JFP, Klatser PR, Hartskeerl RA, et al. Prospective Evaluation of Three Rapid Diagnostic Tests for Diagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2290.
151. Shekatkar S, Harish BN, Parija SC. IgM Dot-ELISA assay using prevalent *Leptospira* strain for diagnosis of leptospirosis. *Int J Collab Res Intern Med Public Heal.* 2010;2(10):338–46.
152. Nabity SA, Hagan JE, Araújo G, Damião AO, Cruz JS, Nery N, et al. Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the Dual Path Platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(2):1–13.