UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Contribuição ao imunodiagnóstico da
leptospirose humana: ênfase ao uso de
anticorpos monoclonais

Maricy Alves Ribeiro

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Hermínia Yohko Kanamura

São Paulo
2003
Maricy Alves Ribeiro

Contribuição ao imunodiagnóstico da leptospirose humana: ênfase
ao uso de anticorpos monoclonais

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Hermínia Yohko Kanamura
orientadora/presidente

Profa. Dra. Adelaide José Vaz
1º. examinador

Profa. Dra. Margareth Elide Genovez
2º. examinador

Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola
3º. examinador

Prof.Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves
4º. examinador

São Paulo, 02 de dezembro de 2003.

Por ter a firme convicção de que a vida deve ser vivida com a continua proposição e concretização de sonhos e objetivos...

Dedico este trabalho

À querida lembrança de meu pai

Antonio Marcos Alves Ribeiro

e à minha mãe **Maria Mendes Alves Ribeiro**

pela alegria de viver e pela constante confiança no futuro.

Ao Fabio Regiani

companheiro e incentivador incansável,

pela felicidade compartilhada.

Contribuíram no desenvolvimento deste trabalho os seguintes laboratórios:

Instituto Adolfo Lutz:

Seção de Imunologia

Seção de Bacteriologia

Seção de Sorologia

Divisão de Patologia- Setor de Imuno-histoquímica

Seção de Meios de Cultura

Seção de Coleção de Culturas

Laboratório Fleury

Setor de Desenvolvimento

Laboratório Biolab Meriéux S.A.

Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

Instituto de Medicina Tropical - USP

Laboratórios de Patologia e de Imunologia

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

Departamento de Bioquímica

Agradecimentos:

Ao Dr. Mario Endsfield Camargo, representando o Laboratório Fleury, um exemplo de pesquisador a ser seguido, co-orientador e principal desencadeador desta pesquisa, pelo carinho e inestimável incentivo e colaboração.

À Dra. Hermínia Yohko Kanamura, que aceitou esse desafio, pela confiança e orientação.

À Sônia Kiyomi Nishida e à Maria Tereza Lombardi, pela orientação carinhosa e presteza na produção dos monoclonais no Setor de Desenvolvimento Técnico do Laboratório Fleury, São Paulo, SP.

À Dra. Ione Irulegui Gomes pela amizade e valiosas sugestões e correções na redação deste manuscrito.

Ao Dr. Cristiano Corrêa de Azevedo Marques, Diretor Geral e à Dra. Julia Maria Martins de Souza Felipe, Diretora da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, que permitiram o ACORDO de PESQUISA COOPERATIVA nº 01/ 99, possibilitando o desenvolvimento deste projeto em conjunto com o Laboratório Fleury.

À Dra. Maria das Graças Adelino Alkmin, Diretora do Serviço de Microbiologia e de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio constante e grande amizade.

Ao Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, grande incentivador e amigo, que sempre nos acolheu com muito carinho em inúmeras situações adversas.

À Dra. Raimunda Telma de Macedo Santos, pesquisadora do Laboratório de Imuno-histoquímica do Instituto Adolfo Lutz, pela avaliação imuno-histoquímica dos monoclonais produzidos.

À Zila Rosa Belém e à Aritania Santos, do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Laboratório Biolab Mérieux, pelo auxílio na purificação dos antígenos e pelo fornecimento de: sacos de diálise especiais, do detergente “Zwittergent” e antígenos purificados de *Treponema pallidum*.

À Regina Tomie Kimura, Chefe da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pela constante orientação em diversos procedimentos laboratoriais e a grata convivência diária.

Ao Dr. José Gilberto Henriques Vieira do Setor de Desenvolvimento Técnico do Laboratório Fleury, São Paulo, SP, pela permissão da produção dos monoclonais.

À Eliete Caló Romero, do Setor de Leptospirose da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pela execução da prova de Soroaglutinação Microscópica e fornecimento de soros com sorologia positiva para leptospirose.

À Eide Dias Camargo, da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, pela realização da prova de ELISA clássica.

Ao Dr. Thales de Brito do Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Medicina Tropical, pelo incentivo constante na busca de novos métodos e pelo auxílio na interpretação das lâminas de imuno-histoquímica.

Ao Dr. Marcelo Oswaldo Álvares Corrêa, pesquisador aposentado do Instituto Adolfo Lutz, grande incentivador e amigo cuja influência foi fundamental nos primórdios de nossa carreira quando iniciamos os estudos sobre a leptospirose.

Ao Dr. Hélio K Takahashi e à Dra. Anita H Straus, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, pela receptividade e orientação nas tentativas de purificação dos antígenos lipídicos relevantes à resposta imune na leptospirose.

À Lia Teixeira Bastos, técnica de apoio à pesquisa da Seção de Coleção de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento de cepas de leptospiros de referência.

À Silvana Tadeu Casagrande, pesquisadora da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento de soros positivos para febre tifóide.

À Seção de Meio de Cultura, pelo fornecimento do meio EMJH para o cultivo das leptospiros.

À Dra. Sandra do Lago Moraes Ävila, pesquisadora do Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo fornecimento de antígenos extraídos de *P falciparum* para os testes de especificidade. e de soros positivos para Malária.

À Dra. Regina Célia Moreira e à Isabel Takano Oba do Setor de hepatite do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento de soros de pacientes com hepatite.

À Dra. Adele Caterino de Araújo e à Elisabeth de los Santos Fortuna da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pela grande amizade e estímulo à nossa vida profissional e ainda, pelo empréstimo de: caçapas, centrífugas, placas e materiais de SDS-PAGE e “immunoblotting” e fornecimento de anticorpo monoclonal anti-camundongo marcado com peroxidase.

À Dra. Lia Carmem M S Zerbini, Seção de Sorologia, pelo fornecimento de soros positivos para sífilis.

À Nancy Alves Salles, chefe da Divisão de Sorologia da Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, pelo fornecimento de soros humanos normais.

Ao Paulo Nakamura da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo empréstimo de insumos e execução de um teste de SDS-PAGE e transferência de gel para o papel de nitrocelulose.

Ao Rui Vadik Abrão, da Fundação Oswaldo Cruz, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, pelo fornecimento de soros de pacientes com leptospirose comprovada.

Ao Setor de Fotomicrografia e Divisão de Serviços Básicos pelas fotos dos “immunoblotting”

À Dra. Adelaide José Vaz pelas valiosas sugestões como membro da Banca no Exame de Qualificação.

À Dra. Margareth Elide Genovez pelas valiosas sugestões como membro da Banca no Exame de Qualificação.

À Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, pelas valiosas sugestões na redação desta tese, por ocasião do Exame de Qualificação.

À Dra. Kioko Takei pelas valiosas sugestões na redação desta tese, por ocasião do Exame de Qualificação.

Ao Vasco, D. Terezinha, Marlene, D. Edna e à Judith, funcionários da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos serviços de apoio prestados, pelo convívio e amizade constantes.

Às bibliotecárias Leila e Maria Luiza da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelas correções nas referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica.

Ao atendimento carinhoso do pessoal das Secretarias da Pós-Graduação e da Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Aos inúmeros amigos das Seções de: Imunologia, Sorologia, Bacteriologia, Parasitologia, Virologia, Coleção de Culturas, Divisão de Biologia Médica, Patologia, Biblioteca e Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, pelo grande incentivo e convívio amistoso.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho se tornasse possível

Muito Obrigada

Sumário

Agradecimentos	5
Lista de tabelas	13
Lista de quadro	15
Lista de Figuras.	15
Lista de Abreviaturas e siglas	16
Resumo	18
Abstract	20
 1. INTRODUÇÃO	
1.1 Revisão de Literatura :	
Aspectos gerais	22
Situação atual da leptospirose, Aspectos históricos, Bacteriologia	27
Morfologia e Biologia das leptospirosas Métodos de cultura, Taxonomia e Classificação , Classificação sorológica, Sorovares de leptospirosas, Classificação genotípica, Biologia Molecular	31
Epidemiologia	33
Tratamento e prevenção	36
1.2 Diagnóstico laboratorial	37
..	
1.3 Justificativa para novas investigações	50
2. OBJETIVOS	53
 3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Casuística	54
Soros positivos para leptospirose Soros do grupo controle	

3.2 Preparo de extratos antigênicos	
3.2.1 Extratos antigênicos de <i>Leptospira interrogans</i> tratada com Proteinase K	55
3.2.2 Solubilização de <i>Leptospira interrogans</i> obtida por extração com detergente Zwittergent 3-12.	57
3.2.3 Outros extratos antigênicos.	58
Extrato de <i>T pallidum</i>	
Extrato de <i>P falciparum</i>	
 3.3 Técnicas sorológicas	
3.3.1 Soroaglutinação microscópica (SAM)	59
3.3.2 Aglutinação macroscópica da Fiocruz (SAT)	60
3.3.3 Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (SDS-PAGE) e 'immunoblotting'	60
3.3.4 ELISA clássico (ELISA c)	62
3.3.5 PK- ELISA	63
3.3.6 ELISA com extratos de zwittergent	64
 3.4 Outras técnicas	
3.4.1 Dosagem de proteínas	65
3.4.2 Técnica de biotilação	66
 3.5 Produção de anticorpos monoclonais	66
Protocolo de produção de anticorpos monoclonais	68
Descrição detalhada das etapas do protocolo da produção dos monoclonais	69
.	
3.6 Análise imuno-histoquímica utilizando os monoclonais . . .	80
 3.7 Ensaios desenvolvidos utilizando os monoclonais produzidos H7P1 e A12P4	
3.7.1 ELISA indireto modificado	81
3.7.2 ELISA com captura de IgM humano	83
3.7.3 Cromatografia de afinidade para a purificação dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais ("AgMc")	84
3.7.4 ELISA indireto 1- "AgMc" adsorvido com tampão carbonato às placas de poliestireno para a pesquisa de anticorpos IgM .	86
3.7.5 ELISA indireto 2- "AgMc" adsorvido com etanol às placas de poliestireno para a pesquisa de anticorpos IgM	88
3.7.6 ELISA indireto 2- "AgMc" adsorvido com etanol às placas de poliestireno para a pesquisa de anticorpos IgG.	89
 3.8 Controle de qualidade dos testes ELISA	89
 3.9 Estudo em termos relativos dos índices sorológicos.	90

3.10 Método estatístico	93
4.RESULTADOS	94
4.1 Reatividade dos monoclonais obtidos na primeira fusão: H7P1 e B9P8.	96
4.2 Reatividade dos monoclonais obtidos na segunda fusão: A12P4, B9P1, D10P1, E10P3, F12P5 e F12P7.	97
4.3 Reatividade dos antígenos "AgMc" purificados na coluna de cromatografia.	99
4.4 Análise imuno-histoquímica empregando os anticorpos monoclonais H7P1, B9P8 e A12P4.	102
4.5 Resultados dos ensaios padronizados a partir dos monoclonais produzidos neste estudo (H7P1 e A12P4) ou, com o uso dos produtos derivados destes ("AgMc")	
4.5.1 ELISA indireto modificado	104
4.5.2 ELISA de captura com anti-IgM humana.	105
4.5.3 ELISA indireto 1 AgMc adsorvido com tampão carbonato. . .	105
4.5.4. ELISA indireto 2, AgMc adsorvido com etanol.	106
5. DISCUSSÃO	118
Sobre a imunização e seleção dos anticorpos monoclonais contra leptospiros produzidos neste estudo.	121
Quanto à aplicação dos monoclonais nos testes imuno-histoquímicos.	123
Quanto ao valor diagnóstico dos ensaios desenvolvidos com o uso dos monoclonais.	125
Explicações para os resultados encontrados	127
Cenário ideal para o desenvolvimento de uma vacina.	129
6. CONCLUSÕES	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

8. APÊNDICE

Soluções e tampões. 159

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4
Solução salina tamponada com Tris (hidroximetil)– amino metano pH 7,5
Tampão glicina pH 2,8
Tampão Tris-HCL pH 7,5 com NaCL 0,9%
Tampão Tris-HCL pH 7,5 com NaCL 0,9% com CaCL 20mM
Solução de PMSF (phenylmethysulfonil fluoride)
Acetato de sódio 1M pH 5,0
Sulfato de magnésio (MgSO_4) 0,1M
Dnase

Reagentes necessários na produção dos monoclonais. 160

Meio de RPMI (estoque)
Meio RPMI – completo
RPMI simples
Meio RPMI – HAT completo
Glicose 30%
Glutamina 200 mM
Gentamicina
Fungizone
Solução de aminopterina 100X
Solução de H T 100X
Sacarose 0,34M
PEG 50%
Azul tripan
Soro fetal bovino
Solução criopreservante

Lista de tabelas

Tabela	Assunto	Página
Tabela 1	Distribuição dos casos de leptospirose segundo o critério diagnóstico no Estado de São Paulo . .	35
Tabela 2	Casos, Coeficiente de incidência, óbitos e letalidade por leptospirose no Estado de São Paulo.	35
Tabela 3	Monoclonais obtidos na segunda fusão e suas reatividades no ELISA.	79
Tabela 4	Reatividade dos monoclonais H7P1 e B9P8 no immunoblotting, SAM e ELISA	96
Tabela 5	Frações antigênicas reconhecidas pelos monoclonais da segunda fusão no immunoblotting	97
Tabela 6	Reatividade dos monoclonais A12P4 e D10P1 no ELISA.	98
Tabela 7	Resultados obtidos em amostras pareadas de pacientes com leptospirose (Grupo 2) nas provas de ELISA indireto modificado; no ELISA de captura do anti-IgM humano, no ELISA clássico (c) e na prova de SAM.	109
Tabela 8	Resultados obtidos em amostras pareadas de 20 pacientes (Grupo 2) nas provas de ELISA com antígenos “AgMc”, com antígenos pk-resistentes (PK-ELISA), com antígenos sonicados (ELISA clássico) e na SAM.	110
Tabela 9	Resultados obtidos em amostras pareadas de 32 pacientes com leptospirose (Grupo 1) nas provas de ELISA com antígenos “AgMc”, na Aglutinação microscópica (SAT), no ELISA clássico e na SAM.	111
Tabela 10	Presença de anticorpos nas amostras séricas de pacientes com Doença de Weil (Leptospirose, Grupo 3) nas provas de ELISA com antígenos “AgMc”, no immunoblotting, no PK-ELISA e na SAM segundo o dia da doença após o início dos sintomas.	112
Tabela 11	Resultados das provas de ELISA com antígenos “AgMc”, PK-ELISA, ELISA clássico e na SAM no grupo de soros humanos normais (SHN)	113
Tabela 12	Resultados obtidos no grupo controle, casos de sífilis , malária, febre tifóide e hepatite nas	

provas de ELISA com antígeno “AgMc”, PK-ELISA, ELISA clássico e SAM.	114

Tabela	Assunto	Página
Tabela 13	Comparação dos resultados obtidos nas provas de ELISA com antígenos “AgMc”, no ELISA clássico e na prova de SAM, após conclusão diagnóstica da leptospirose e suas respectivas sensibilidades e especificidades	115
Tabela 14	Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, falsos positivos e falsos negativos e índice de concordância do teste ELISA “AgMc” relativos à prova de SAM no diagnóstico da leptospirose humana, após conclusão diagnóstica.	116
Tabela 15	Comparação entre a proporção de casos reagentes no ELISA “AgMc”, ELISA clássico e na prova de SAM, após conclusão diagnóstica nos 52 casos com leptospirose (Grupos 1 e 2) ..	117

Lista de quadro

Quadro	Assunto	Página
Quadro 1	Painel de diferentes sorovares de leptospiras utilizados nos ensaios ELISA, immunoblotting, SAM etc... ..	95

Lista de Figuras

Figura	Assunto	Página
Figura 1	Immunoblotting esquemático dos extratos dos sorovares icterohaemorrhagiae RGA copenhageni. M20 e canicola	101
Figura 2	Antígenos de leptospiras detectados por anticorpos IgM de pacientes com leptospirose no fígado de cobaia infectada experimentalmente empregando-se técnica imuno-histoquímica (SABP X 200)	103
Figura 3	Antígenos de leptospiras detectados por anticorpos IgM de pacientes com leptospirose no fígado de cobaia infectada experimentalmente empregando-se técnica imuno-histoquímica (SABP X 400)	103

Lista de abreviaturas e siglas

λ = comprimento de onda

μ = micro

μ g= micrograma

μ l= microlitro

“AgMc”= suspensão de antígenos de *Leptospira interrogans* reconhecidos pelos anticorpos monoclonais obtidos por cromatografia de afinidade utilizando Sepharose 4B ativada com BrCN acoplada aos anticorpos monoclonais A12P4 e H7P1.

A12P4= anticorpo monoclonal desenvolvido no presente estudo

BSA= bovine serum albumin, soro albumina bovina

CH₂O= carboidrato

D.O.= densidade óptica

e cols.= e colaboradores

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, teste imunoenzimático

EMJH= meio de cultura para o cultivo de leptospiros de Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris

g= grama

g= gravidade

h= hora

H7P1= anticorpo monoclonal desenvolvido no presente estudo

HAP= hemaglutinação passiva

HRP= horse- radish peroxidase, enzima

Hz= hertz

i. e. = isto é

Ig= imunoglobulina

IgM-PK-ELISA = ELISA para pesquisa do anticorpo IgM que utiliza suspensão antigênica tratada com a proteinase K

Ip= intraperitonealmente

Iv= intravenosamente

kDa= kilodalton

kg= kilograma

Korthoff= meio de cultura para o cultivo de leptospiros.

L= litro

Mg= miligrama

min= minuto

mL= mililitro

mmol= milimole

N= normal (concentração)

Nm= nanômetro

°C= graus Celsius (centígrado)

OPD= o -phenylenediamine

PBS= phosphate- buffered saline, solução salina tamponada com fosfatos

PEG= polietileno glicol

Peroxidase = HRP= horse- radish peroxidase, enzima

PK= proteinase K

PK-ELISA= ELISA para pesquisa do anticorpo IgM que utiliza
suspensão antigênica tratada com a proteinase K

PM= peso molecular

PMSF= phenylmethanesulfonyl fluoride

rpm= rotações por minuto

SABP= Sistema avidina –biotina- peroxidase

SAM= soroaglutinação microscópica

SAT= teste de aglutinação macroscópica, Bio Manguinhos, RJ, Brasil

SDS-PAGE= Eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel
electrophoresis-PAGE) de substâncias tratadas com o
detergente sulfato dodecil sódico (sodium dodecyl sulfate-SDS).

SHN= soro humano normal

v= vol

Resumo

A prova sorológica de referência na leptospirose ainda é a soroaglutinação microscópica (SAM). Devido à complexidade desta prova avaliamos alguns testes rápidos para triagem dos anticorpos anti-leptospiras na fase aguda da infecção. Na década de 80, uma hemaglutinação passiva, utilizando frações polissacarídicas de leptospiras, foi considerada apropriada ao diagnóstico precoce, porém esta preparação antigênica incluía muitos “antígenos comuns” reconhecidos por anticorpos de 4% dos indivíduos normais. Um novo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando uma suspensão de antígenos imunodominantes, resistentes à proteinase K, foi padronizado e avaliado quanto ao seu valor diagnóstico. Com 89,9% de sensibilidade e 97,4% de especificidade, esta técnica, referida como PK-ELISA, satisfaz os requisitos necessários para as provas de triagem da leptospirose humana. No entanto, em virtude de alguns reagentes usados nesta preparação antigênica serem importados e muito instáveis, foi proposta a introdução de novos métodos empregando-se anticorpos monoclonais. Em um “Acordo de Pesquisa Cooperativa” entre o Instituto Adolfo Lutz e o Laboratório Fleury foram produzidos hibridomas contra leptospiras. Dois deles foram selecionados para dar continuidade ao estudo: um, secretando anticorpos monoclonais (AcM) para um epítipo detectado em 16 de 23 sorovares do gênero *Leptospira* mais freqüentes em nosso meio (clone A12P4), e outro específico a somente um sorogrupo patogênico, icterohaemorrhagiae (clone H7P1). O AcM A12P4, uma imunoglobulina G2B (IgG2B), reagiu com epítipo presente nos componentes de pesos moleculares (PM) de 16-18 kDa dos lisados de leptospiras das cepas RGA e M-20, quando separados na eletroforese em gel de poliácridamida, e com componentes de PM de 75-84kDa dos sorovares copenhageni e canicola. Por sua vez, o AcM H7P1, uma imunoglobulina G, reagiu com um epítipo comum a várias frações de PM acima de 21 kDa da cepa RGA e com componentes de PM de 21-22 kDa e de 75-82 kDa da cepa M-20. Os monoclonais foram empregados em provas imunoenzimáticas para a

detecção de anticorpos específicos em amostras séricas pareadas coletadas de 52 pacientes com leptospirose, e do grupo controle que incluiu amostras séricas de 57 pacientes com outras doenças consideradas no diagnóstico diferencial, e de 68 indivíduos normais. Estas provas, no entanto, não foram satisfatórias. Finalmente, um novo ELISA foi desenvolvido no presente estudo que utiliza a suspensão de antígenos “AgMc”, purificados por cromatografia de afinidade utilizando a Sepharose 4B ativada com CNBr acoplada aos anticorpos monoclonais descritos acima. Os resultados obtidos com esta prova foram comparados aos obtidos com outros testes disponíveis em nosso meio, como a SAM e o ELISA clássico (ELISA c). Este novo método, o “ELISA AgMc”, com 80,70 % e 83,33 % de sensibilidade e especificidade, respectivamente, em relação à SAM; valores preditivos positivo e negativo de 69,70% e 90,10% respectivamente e índice de concordância geral de 82,49%, não parece ser um protocolo promissor para o diagnóstico rápido na leptospirose humana. Além disso, tomando-se a SAM como diagnóstico verdadeiro, os resultados obtidos no novo teste, após a conclusão diagnóstica do grupo de pacientes com a leptospirose, mostrou uma discordância significativa. São discutidas as possíveis explicações para os resultados encontrados.

Abstract

The best serological test for leptospirosis laboratory diagnosis remains the microscopic agglutination test (MAT). Because of the complexity of MAT, we have been developed some rapid screening tests for leptospiral antibodies detection in the acute phase of infection. In the decade of 80, a passive hemagglutination test employing polysaccharide fractions of leptospires was considered appropriate for early diagnosis, but its antigen preparation included "common antigens" recognized by antibodies from 4% of healthy individuals. A new ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) employing proteinase K resistant immunodominant antigens was developed and its potential diagnosis evaluated. This technique, the PK-ELISA, presented 89.9% sensitivity and 97.4% specificity, and satisfied the requirements needed for serological screening tests of human leptospirosis. However, some of the reagents used in its antigen preparation are imported and very unstable. So, it was proposed, in a "Cooperative Research Accordance" between Instituto Adolfo Lutz and Laboratório Fleury, to try new approaches with monoclonal antibodies. Two hibridomas secreting specific monoclonal antibodies (MAb) were selected: one, against an epitope detected in 16 of 23 members of the genus *Leptospira* (clone A12P4) and the other, specific to the icterohaemorrhagiae serogroup (clone H7P1). The MAb A12P4, a G2 (IgG2B) immunoglobulin, reacted with an epitope present in the 16-18 kDa components of icterohaemorrhagiae serogroup and with the 75-84 kDa components of serovars copenhageni and canicola, after whole-cell lysates of the leptospires were separated by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. The MAb H7P1, which is an IgG, reacted with an epitope common to several fractions of molecular weight above 21 kDa of strain RGA and with the 21-22 kDa and the 75-82 kDa components of strain M-20. Both monoclonal antibodies were employed in enzyme immunoassays for detecting specific antibodies in serum samples serially collected from 52 patients with leptospirosis, and from the control group, which consisted of sera from 57 patients with other diseases included in the differential

diagnosis, and from 68 healthy individuals. These tests, however, were not satisfactory. A new ELISA was developed in the present study employing an antigen suspension "AgMc", purified by affinity chromatography with CNBr-activated Sepharose 4B coupled to the monoclonal antibodies described above. The results obtained with this test were compared to the MAT and to the classical IgM ELISA (ELISA c). The new method, "AgMc ELISA", presented serological indices, relatively to reference test MAT, of 80.70 % and 83.33 % of sensitivity and specificity, respectively; positive and negative predictive values of 69.70 % and 90.10 %, respectively, and general agreement index of 82.49 %. So, this test was not considered a promising approach to rapid diagnosis of human leptospirosis. Moreover, the proportion of patients diagnosed as having leptospirosis by the "AgMc ELISA" and the MAT differ significantly. The possible explanations for the results obtained are discussed.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão de Literatura

Aspectos gerais

Leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição em todo o mundo, causada pela infecção com um dos mais de 200 sorovares* de espiroquetas do gênero *Leptospira* (Faine e cols., 1999). A espécie patogênica é a *Leptospira interrogans* “senso lato” ** que afeta o homem em todos os continentes, nas áreas rurais e urbanas, e em climas temperado e tropical. A infecção humana resulta freqüentemente da exposição direta ou indireta à urina de animais infectados, ou é adquirida a partir de água ou solo contaminado. Freqüentemente, causa um amplo espectro de manifestações clínicas em humanos, que inclui febre, dor de cabeça, frio, mialgia, dor abdominal e sufusão da conjuntiva (Farr, 1995). Nas manifestações mais severas inclui falha renal, icterícia, hipotensão, meningite, hemorragia e/ou pneumonia hemorrágica, que pode ser letal (Vinetz, 2001). Outras doenças infecciosas que apresentam síndromes febris indiferenciadas, tais como malária, dengue, influenza, febres virais hemorrágicas podem mimetizar a leptospirose. Em contraste com os dogmas dos livros textos, estudos baseados em populações indicam que há pouca relação

---

* Sorovar é a base taxonômica da leptospirose. Definição e caracterização descrita mais adiante em Taxonomia e Classificação.

** As características fenotípicas que antes de 1989 diferenciavam as espécies patogênicas das não-patogênicas, *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa*, respectivamente, não diferenciavam as espécies na classificação genotípica que vem sendo adotada recentemente, por isso ambas as espécies são referidas atualmente como “senso lato”.

entre a cepa de leptospira infectante e a expressão clínica da doença. A imunidade na leptospirose é principalmente humoral. Imunidade passiva pode ser conferida apenas por anticorpos (Adler & Faine, 1978). A imunidade após a infecção está restrita ao sorovar homólogo, ou a sorovares fortemente relacionados a este antigenicamente, e é mediada principalmente por anticorpos que opsonizam leptospiros para a fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Cinco e cols., 1981; Vinh e cols., 1982). A fagocitose, por sua vez, ocorre somente na presença de soro e complemento (McGrath e cols, 1984).

Supressão da imunidade mediada por células com redução do número de linfócitos CD4+ e de suas respostas a alguns mitógenos foi descrita por Yamashiro-Kanashiro e cols., 1991. Evidências da falta de significado do componente da imunidade celular na leptospirose foram dadas no acompanhamento clínico de pacientes com Aids por Silva e cols, 1990.

Leptospirose, segundo o site da Internet do Centro de VigiLância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac” (CVE¹, 2003), da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, é uma doença de notificação compulsória e sua maior incidência se dá nos meses de janeiro a março, devido às enchentes que ocorrem nesta época e, conseqüentemente, ao contato humano com urina de ratos contaminada com a bactéria *Leptospira*. O tempo de incubação pode ser de algumas horas a 28 dias, sendo que, em média, é de 7 a 15 dias. Um caso suspeito é definido como um

---

¹ CVE entra nas referências bibliográficas como SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”

paciente com antecedentes epidemiológicos de risco, ou seja, que teve contato com enchentes ou urina de animais, principalmente roedores, e que apresente febre, cefaléia, mialgia (principalmente nas panturrilhas), hiperemia de conjuntivas, icterícia rubínica, diminuição do volume urinário, manifestações hemorrágicas (escarros hemoptóicos, sufusões hemorrágicas), taquipnéia. O quadro clínico inclui infecções subclínicas, doenças febris anictéricas auto-limitadas e que podem evoluir como uma gripe forte e involuir espontaneamente ou desenvolver o quadro mais grave, como doença potencialmente fatal, conhecida como doença de Weil, que apresenta hemorragia, falha renal, e icterícia (Silva & Camargo, 2001).

Leptospiras podem estar presentes no sangue e no líquido cefalorraquidiano (líquor) durante a primeira semana da doença. Podem aparecer na urina após a segunda semana, sendo que a leptospiúria é intermitente.

O envolvimento do Sistema Nervoso Central é comum em pacientes com leptospirose, embora a patogênese da irritação meníngea seja obscura. Leptospiras penetram no líquido na fase septicêmica da doença e permanecem até o 8-10^o dia após o início dos sintomas. No entanto, há poucas evidências de resposta inflamatória no líquido. Os sinais meníngeos aparecem na segunda semana da doença quando as leptospiras estão sendo retiradas ("clearing") do líquido. Complexos antígeno-anticorpo podem ser responsáveis pela resposta meníngea e pelos sintomas. Meningite asséptica é uma característica do estágio imune. Pleiocitose discreta está presente, com ou sem sinais meníngeos e sintomas. A contagem celular no líquido é < 500/ mm³ na maioria dos casos. Células polimorfonucleares podem predominar precocemente na doença porém células mononucleares predominam num estágio posterior. Os níveis de

proteína variam de <40 mg/dl (normal) a 300 mg/dl; a concentração de glicose é geralmente normal. Há registros de que a leptospirose possa ser responsável por cerca de, aproximadamente, 10% dos casos de meningite asséptica (Farr, 1995).

Leptospiras podem penetrar no humor aquoso durante a fase septicêmica e podem persistir por vários meses. Uveítes podem se desenvolver durante a segunda semana da doença. A persistência das leptospiras no humor aquoso pode causar uma uveíte latente crônica recorrente (Levett, 2001).

Mialgia é comum na leptospirose. Exames de biópsia de músculo da panturrilha podem mostrar vacúolos citoplasmáticos nas miofibrilas em associação com infiltrado de polimorfonucleares (Uip e cols., 1990 e 1992). Mas os perfis das biópsias musculares são inconsistentes, não específicos, e não colaboram no estabelecimento do diagnóstico da leptospirose.

Situação atual da leptospirose

Leptospirose vem sendo reconhecida como uma doença infecciosa emergente ou reemergente (Levett, 2001). Recentes surtos ocorreram na Nicarágua em 1995 (CDC², 1995; Brandling-Bennett, 1996), no Brasil (Ko e cols., 1999), na Malásia (competição da Ecochallenge Sabath 2000) (Evans & Baranton, 2000; CDC, 2001). O interesse internacional pela leptospirose ressurgiu com a ocorrência de vários casos na América Central e do Sul. Estes casos foram relacionados ao excesso de chuvas, como consequência do fenômeno El-Niño (Ko e cols., 1999). No entanto, a ocorrência de surtos após inundações não é um fenômeno recente e nem restrito às regiões tropicais. Nestas e

---

² CDC Centers for Disease Control and Prevention

nas regiões subtropicais a doença é endêmica e a exposição à infecção muito difundida; já nas regiões de clima temperado é primariamente uma doença ocupacional ou de exposição recreativa.

Aspectos históricos

A leptospirose ictérica com falha renal foi descrita há mais de 100 anos, em Heidelberg, por Adolf Weil (1886). No entanto, uma síndrome idêntica, ocorrendo em trabalhadores de rede de esgoto foi descrita alguns anos antes (Landouzy, 1883). A etiologia da leptospirose foi demonstrada em 1915 no Japão e na Alemanha. No Japão, Inada e Ido detectaram as espiroquetas e os anticorpos específicos no sangue de mineiros japoneses com icterícia infecciosa. Por sua vez, dois grupos de clínicos alemães, Uhlenhuth & Fromme (1915) e Hübener & Reiter (1915), estudaram amostras séricas de soldados alemães acometidos de “Doença francesa” nas trincheiras do nordeste da França. Após a inoculação de sangue dos soldados em cobaias, detectaram espiroquetas. A primeira publicação em inglês e em alemão foi do grupo de Inada (Inada e cols, 1916). Posteriormente, Noguchi (1917) criou o gênero *Leptospira* (gr. Leptos, delgado). Entretanto, o organismo foi descrito 10 anos antes, por Stimson (1907) que demonstrou, por coloração com prata, aglomerados de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente cuja causa mortis foi atribuída à febre amarela. Como as espiroquetas tinham terminais em gancho, Stimson as chamou de *Spirochaeta interrogans* devido à sua semelhança com o ponto de interrogação. O papel do rato como fonte de infecção humana foi descrito por Ido e cols., 1917.

Bacteriologia

Morfologia e biologia das leptospiiras

Caracteres gerais das leptospiiras: As leptospiiras apresentam morfologia típica, comprimento de 6 a 20µm, diâmetro de 0,1 µm, espiras curtas e regulares (aspecto granular) e com extremidades encurvadas. Evidenciam-se bem por métodos de coloração com prata porém o método de escolha para o exame bacteriológico é a microscopia de campo escuro (Bier, 1975; Faine, 1982). Dois filamentos axiais (flagelo periplásmico) com inserções polares são localizados no espaço periplásmico. A estrutura das proteínas flagelares é complexa. Trueba e cols. (1992) demonstraram duas proteínas, uma de 34 e outra de 35,5 kDa, ao longo da parte central do flagelo periplásmico das *L. interrogans*. As leptospiiras exibem movimento rápido, rotatório, sobretudo nas extremidades encurvadas, mantendo-se a parte central mais ou menos fixa, donde resulta um aspecto em 8, muito característico. Morfologicamente todas as leptospiiras são indistinguíveis; podem modificar-se nas subculturas “*in vitro*” e podem ser restauradas por passagem em hamsters (Ellis e cols., 1983). A *L. interrogans* tem uma estrutura de membrana dupla, comum a outras espiroquetas, nas quais a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicanas estão fortemente associadas e revestidas por uma outra membrana externa. Os lipopolissacarídeos das leptospiiras têm sua composição semelhante à de outras bactérias gram-negativas, porém têm menor atividade endotóxica (Faine e cols., 1974; Isogai e cols., 1986; Vinh e cols., 1986; Shimizu e cols., 1987). Leptospiiras são aeróbios obrigatórios com crescimento ótimo à temperatura de 8 a 30°C, produzem catalase e oxidase, crescem em meio simples

enriquecido com vitaminas (Vitaminas B2 e B12 são fatores de crescimento) e utilizam ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono (Holt e cols., 1994).

Métodos de cultura

O crescimento de leptospiras pode ocorrer em meios contendo soro ou albumina, ou em meios sintéticos livre de proteínas (Turner, 1970). Vários meios líquidos contendo soro de coelho foram descritos (Fletcher, 1928; Korthof, 1932, Stuart, 1946). O meio EMJH com albumina e ácido oleico é muito usado na rotina laboratorial (Ellinghausen & McCullough, 1965; Johnson & Harris, 1967). Este meio está disponível comercialmente, preparado por vários fabricantes e contém Tween 80 e albumina bovina. Algumas cepas são de crescimento mais difícil e requerem a adição de piruvato (Johnson e cols., 1973) ou soro de coelho para seu isolamento. O crescimento de contaminantes em espécies clínicas pode ser inibido pela adição de 5-fluorouracil ao meio (Johnson & Rogers, 1964). Outros antibióticos são adicionados ao meio para o cultivo de amostras em veterinária onde a contaminação é mais provável de acontecer (Adler e cols., 1986). Um meio livre de proteínas foi desenvolvido para a produção de vacinas (Bey & Johnson, 1978).

O crescimento de leptospiras é frequentemente vagaroso no primeiro isolamento, sendo as culturas retidas por mais de 13 semanas antes de serem descartadas, mas subculturas puras em meio líquido crescem normalmente entre 10 a 14 dias. Ágar pode ser adicionado em baixas concentrações (0,1 a 0,2%). Em meio semi-sólido, o crescimento alcança a densidade máxima em uma zona abaixo da superfície do meio, que se torna progressivamente mais turvo à medida que a incubação procede.

Este crescimento está relacionado com a tensão ótima de oxigênio e é conhecido como anel ou disco de Dinger. Culturas de leptospiros podem ser mantidas por repetidas subculturas ou estocadas, preferencialmente em ágar semi-sólido contendo hemoglobina. Estoques de longa duração são obtidos por liofilização (Annear, 1974) ou congelados a -70°C (Alexander e cols., 1972; Palit e cols., 1986).

Taxonomia e Classificação

Classificação sorológica Antes de 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies, a *L. interrogans*, compreendendo todas as cepas patogênicas e *L. biflexa*, contendo todas as cepas saprófitas isoladas do ambiente. *L. biflexa* era diferenciada da *L. interrogans* pelo crescimento da primeira a 13°C e na presença de 8-azaguanina ($225\text{ }\mu\text{g/mL}$) e pela incapacidade da *L. biflexa* em formar células esféricas em NaCl 1M. (Faine, 1982; Levett, 2001)

Sorovares de leptospiros A composição antigênica das cepas de *Leptospira* é usada para fins taxonômicos. A base taxonômica é o sorovar. O método clássico para caracterizar o sorovar é o teste com absorção de aglutininas utilizando antígenos e anti-soros fornecidos pelos centros de referência da Organização Mundial da Saúde. Deste modo, se mais de 10% do título homólogo permanecer em pelo menos um dos dois anti-soros do teste em duplicata, então as duas cepas pertencem a diferentes sorovares. Mais de 60 sorovares foram registrados na *L. biflexa*. Na espécie *L. interrogans* mais de 200 sorovares são reconhecidos. Novos sorovares foram isolados, mas ainda não tiveram sua validade documentada. Sorovares que são antigênicamente relacionados foram tradicionalmente agrupados em sorogrupos. Embora os sorogrupos não tenham reputação

taxonômica, eles são úteis na compreensão da epidemiologia (Holt e cols., 1994).

Classificação genotípica

A classificação fenotípica das leptospiros tem sido substituída pela genotípica, onde espécies incluem todos os sorovares de *L. interrogans* e *L. biflexa*. A heterogeneidade genética entre elas foi demonstrada algum tempo atrás por Yasuda e cols., 1987, e, estudos de hibridização de DNA conduziram à definição de 16 espécies (genomoespécies) de *Leptospira*. A hibridização do DNA veio confirmar o status taxonômico do gênero monoespecífico *Leptonema* (Levett, 2001)

As “genomoespécies” de leptospiros não correspondem às duas espécies anteriores (*L. interrogans* e *L. biflexa*), sendo que sorovares patogênicos e não-patogênicos ocorrem dentro da mesma espécie. Então, nem sorogrupo nem sorovar prediz a espécie de *Leptospira*. Características fenotípicas anteriormente usadas para diferenciar *L. interrogans* de *L. biflexa* não são capazes de diferenciar “genomoespécies” (Levett, 2001).

A reclassificação das leptospiros por genotipagem é taxonomicamente correta e fornece um bom fundamento para uma nova classificação. No entanto, a classificação molecular é problemática para o microbiologista clínico, porque é incompatível com o sistema de sorogrupos utilizados pelos clínicos e epidemiologistas por muitos anos. Até que um método de identificação simples baseado em DNA esteja desenvolvido e validado será necessário que o laboratório clínico retenha a classificação sorológica das leptospiros patogênicas.

Biologia molecular

Leptospiras são filogeneticamente relacionadas a outras espiroquetas (Paster e cols., 1991). O genoma das leptospiras apresenta cerca de 5 milhões de pares de bases, as unidades químicas que constituem o código genético (Baril & Saint Girons, 1990). Este abrange um cromossoma de cerca de 4,4 milhões de pares de bases e um menor de aproximadamente 350 mil pares de bases. Não há outros plasmídeos descritos.

Inúmeros genes de leptospiras foram clonados e analisados, incluindo os responsáveis por sínteses de aminoácidos (Richaud e cols., 1990), rRNA (Fukunaga e cols., 1990), RNA polimerase (Renesto e cols., 2000), proteína de “heat shock” (Park e cols., 1999), proteínas flagelares (Lin e cols., 1999) e lipopolissacárides (LPS) (Mitchison e cols. 1997; Peña- Moctezuma e cols., 1999; Bulach e cols., 2000). Foram descritos genes que codificam proteínas da membrana externa da *Leptospira* (Haake e cols., 1993), mas o papel dessas proteínas na imunidade não foi elucidado.

Recentemente foi demonstrado haver heterogeneidade entre os sorovares (Brenner e cols., 1999) indicando a necessidade de novos estudos.

Em nosso meio, pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan em colaboração com colegas da filial baiana da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) envolvidos no Projeto “Desenvolvimento de Vacina contra leptospirose” determinaram o sequenciamento integral do genoma de *L interrogans* sorovar Copenhageni, responsável pela maioria dos

casos humanos da doença no Brasil³. Esse grupo utilizando dados do genoma e de genes de leptospiros depositados no National Center for Biotechnology Information, (NCBI, National Institute Health, NIH, Bethesda, Maryland, EUA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) juntamente com ferramentas de bioinformática, como por exemplo, as disponibilizadas por SMART e PSORT (<http://smart.embl-heidelberg.de/>, <http://psort.nibb.ac.jp/form.html>) determinaram genes que codificam proteínas de membrana, que podem ser alvos vacinais para reconhecimento do microorganismo no momento da infecção. Na verdade, o grupo brasileiro foi mais longe e, utilizando ferramentas de Biologia Molecular para clonagem, expressão e purificação das proteínas de interesse, tem feito o reconhecimento dessas proteínas por anticorpos induzidos experimentalmente ou presentes em soros de animais e humanos expostos ao patógeno, afim de determinar os melhores antígenos para produção de uma vacina. Entre esses grupos de proteínas, destacou-se um conjunto de 174 lipoproteínas que podem ter um maior envolvimento no processo de infecção causado pela bactéria. (Pivetta, 2003 e comunicação pessoal da Dra Elisabeth A Leme Martins, do Butantan, colaboradora no projeto)

---

³ Genoma da *Leptospira interrogans* sorovar Lai depositado por chineses
<http://www.chgc.sh.cn/gn/>

Epidemiologia

A ocorrência da leptospirose é significativamente maior em países de clima quente do que nos de clima temperado, devido principalmente à longa sobrevivência das leptospirosas em ambientes quentes e úmidos. A doença é sazonal, com incidência de pico ocorrendo no verão ou no outono nas regiões de clima temperado e durante as estações de chuva nas regiões quentes. A incidência documentada é influenciada pela disponibilidade da região de realizar o diagnóstico laboratorial e pelos índices clínicos de suspeita. A morbidade e a mortalidade diminuem com a implementação de técnicas diagnósticas rápidas que possibilitem o precoce e amplo reconhecimento da doença e conseqüentemente a instituição de medidas terapêuticas, reduzindo também a severidade e a duração dos sintomas. No Brasil a leptospirose é uma doença de notificação compulsória desde 1982. A definição de caso de leptospirose, para o Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual da Saúde, é de um paciente que apresente sintomas sugestivos e que tenha um teste específico de sangue fígado, no rim ou envolvimento vascular ao lado de exposição a fatores de risco para a leptospirose. Muitas regiões do Brasil não dispõem de laboratórios de saúde pública ou têm dificuldade para enviar amostras biológicas ao laboratório de referência. Os critérios, preconizados pelo Ministério da Saúde, para confirmação de casos suspeitos são os seguintes: isolamento da bactéria em material biológico (sangue, urina ou líquido); prova de soroprecipitação microscópica (SAM) com soroprecipitação em 2 ou 3 amostras séricas coletadas com intervalos de 15 dias e o aumento dos títulos de quatro ou mais vezes. Quando não houver disponibilidade de duas ou mais amostras, um título igual ou superior a 1:800 na SAM confirma um diagnóstico. Títulos

menores, entre 1:100 e 1:800, devem ser considerados de acordo com a situação epidemiológica local. A prova de soroaglutinação macroscópica (SAT) ou o teste de ELISA para detecção de imunoglobulinas da classe M (ELISA- IgM) positivos confirmam o caso, quando não for possível a realização da SAM (Silva & Camargo, 2001). Os casos suspeitos que evoluem para óbito, sem confirmação laboratorial, poderão ser confirmados pela técnica imuno-histoquímica em amostras de tecido (Alves e cols., 1986; Uip, 1990).

A tabela 1 mostra a distribuição dos casos de leptospirose segundo o critério diagnóstico no Estado de São Paulo. A tabela 2 mostra o número de casos, coeficiente de incidência, óbitos e letalidade por leptospirose no Estado de São Paulo. Estes dados

Tabela 1- Distribuição dos casos** de leptospirose segundo o critério diagnóstico no Estado de São Paulo.

CRITÉRIO	Laboratorial	Clínico Epidemiológico	Clínico	Ignorado
ANO (n°) ***				
1998 (874)	66,8%	22,4%	6,1%	4,7%
1999 (846)	59,1%	30,5%	6,7%	3,7%
2000 (670)	74,6%	18,1%	4,2%	3,1%

** Dados provisórios divulgados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (CVE*, 2003)

*** Número total de casos confirmados.

Tabela 2- Casos, coeficiente de incidência, óbitos e letalidade por leptospirose no Estado de São Paulo **

Ano	1998	1999	2000	2001
Nº casos	892	872	698	779
População	35 267 562	35 782 957	36 351 316	37 630 105
Coeficiente de incidência***	2,52	2,43	1,92	2,07
Óbitos	119	133	85	123
Taxa de letalidade****	13,34	15,25	12,18	15,79

** Dados provisórios. Fonte CVE, 2003.

***Coeficiente de incidência = $\frac{n^\circ \text{ de casos confirmados}}{\text{População da área}} \times 100.000$

****Taxa de letalidade (%) = $\frac{n^\circ \text{ de óbitos}}{n^\circ \text{ de casos confirmados}} \times 100$

Obs Os coeficientes de incidência são maiores no período de janeiro a abril. A área incluída nesta região: aproximadamente 248.256 Km².

foram divulgados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE*, 2003), da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo.

Tratamento e Prevenção

A droga de escolha para o tratamento desta doença continua sendo a penicilina. Nos casos em que ela seja contra-indicada, a opção terapêutica é a ampicilina, a doxiciclina ou a tetraciclina (Silva & Camargo, 2001). Medidas preventivas gerais incluem vacinação de animais nas granjas e fazendas bem como de cachorros de estimação. Alguns animais imunizados adequadamente podem, ainda, excretar leptospiros na urina, resultando em transmissão ocasional do microrganismo ao homem. Outras medidas de prevenção incluem uso de roupas protetoras, medidas ambientais e controle dos roedores (Farr, 1995).

---

* CVE entra nas referências bibliográficas como SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”

1.2 Diagnóstico Laboratorial

Os exames laboratoriais na leptospirose são de grande importância na elucidação diagnóstica, uma vez que as manifestações clínicas são polimórficas, dificultando a confirmação diagnóstica. Para a solicitação dos exames laboratoriais é preciso considerar que a doença apresenta comportamento bifásico. Na fase inicial, septicêmica, as leptospirosas podem ser encontradas no sangue, líquido, e na maioria dos tecidos. Na segunda fase, a imunológica, há o aparecimento dos anticorpos séricos específicos e a eliminação das leptospirosas na urina. Para a escolha dos exames e validação dos resultados, deve-se observar em qual das duas fases o paciente se encontra e direcionar adequadamente a solicitação dos exames (Silva & Camargo, 2001).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose está normalmente baseado no exame de microscopia de campo escuro, cultura e /ou sorologia. A visualização das leptospirosas no campo escuro é uma técnica relativamente insensível e requer microrganismos intactos e preferivelmente viáveis (Adler e cols., 1982; Champagne, 1991). Vários materiais celulares podem ser confundidos com leptospirosas, sendo preciso muito cuidado para a confirmação da leptospirose por esse método (Palmer, 1988). Métodos que utilizam a prata para **demonstração direta das leptospirosas** em tecidos dão muitos resultados falso-positivos (Alves e cols., 1986). Os procedimentos de isolamento são trabalhosos, demorados e inconsistentes, requerendo amostras frescas. Hemoculturas

devem ser colhidas em meio de Fletcher, Stuart ou EMJH. Estas culturas

precisam ser incubadas e examinadas por pelo menos 2 meses antes de serem descartadas como negativas.

Técnicas imunológicas, mais rápidas que os procedimentos de isolamento, foram desenvolvidas para a **detecção de antígenos** de leptospiras na ausência de microrganismos viáveis. Citam-se, por exemplo, técnicas que utilizam anticorpos fluorescentes, como a descrita por White & Ristic (1959) que, em última instância, dependem da alta qualidade dos anti-soros e da integridade estrutural e antigênica dos microrganismos.

A utilização de radioisótopos em radioimunoensaios (RIE), incluindo os enzimáticos, implica em pessoal qualificado e equipamentos especiais no laboratório (Bahaman e cols., 1986; Chappel e cols., 1984/85).

Alternativamente, pode ser utilizada a reação em cadeia pela polimerase (PCR), um método “in vitro” que amplifica, seletivamente, seqüências alvos de DNA para a pesquisa de leptospiras em material clínico. Mérien e cols. (1992) a utilizaram em líquido e urina de pacientes com leptospirose e Romero e cols. (1998) em líquido de pacientes com meningite asséptica. As limitações desse método estão, por exemplo, nos “primers” como os utilizados por Mérien e cols. (1992) que amplificavam um fragmento de 331pb do gene *rrs* (16S rRNA) tanto de leptospiras patogênicas como de não-patogênicas. Assim, numa eventual contaminação com leptospiras não-patogênicas, este teste pode produzir um resultado falso-positivo. E ainda, mesmo que a incapacidade da maioria dos testes de PCR em identificar o sorovar infectante não seja significativa na conduta clínica para com o paciente, a identidade do sorovar tem grande valor epidemiológico.

Das técnicas, hoje disponíveis para a **pesquisa de anticorpos**, a Soroaglutinação Microscópica (SAM) é, ainda, o

teste de referência preconizado pela Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico sorológico da leptospirose. O procedimento técnico complexo da prova de SAM impede o seu uso na maioria dos laboratórios clínicos devido à necessidade da utilização e manutenção de culturas vivas de cepas virulentas, do uso de microscópio para as determinações do ponto final da reação e do potencial de risco que representa para o laboratorista. A maior desvantagem do método é a insensibilidade do teste, já que títulos significantes de anticorpos não são detectados antes da segunda semana após o início dos sintomas. Os títulos máximos são alcançados durante a terceira semana (Turner, 1968). Para confirmar o diagnóstico clínico é necessário analisar uma segunda amostra de soro, colhida poucos dias depois da primeira, e demonstrar um aumento significativo nos títulos de anticorpos. A administração precoce de antibióticos, normalmente praticada, resulta no aparecimento de baixos títulos de aglutininas; entretanto, baixos títulos desses anticorpos também podem ser resultado de uma infecção antiga. A confirmação de leptospirose aguda requer uma segunda amostra de soro para se verificar há soroconversão ou elevação do título. Esta técnica também não fornece informação segura sobre o estado de portador ou de disseminador ("shedding") dos microrganismos por parte de animais ou indivíduos assintomáticos (Champagne, 1991).

Muitas preparações de antígenos foram usadas para a detecção de anticorpos (Cox e cols., 1957; Palit e cols., 1973; Terpstra e cols., 1980). Provas que utilizam como antígeno extratos de leptospiras sonicadas (Adler e cols. 1980; Silva e

cols., 1988, Cinco e cols., 1992; Brandão e cols., 1998), como a ELISA-IgM (ou ELISA clássico), sofrem críticas pela falta de uniformidade na

obtenção dos antígenos e, ainda, por utilizar extratos totais que incluem antígenos “comuns” a vários microrganismos e que são reconhecidos por alguns indivíduos normais ou com outras patologias.

A prova de aglutinação macroscópica, cujo kit é fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), também referida como SAT, Leptoteste-S ou Simples Teste para Leptospirose (Ribeiro e cols. 1996; Brandão e cols., 1998), tem boa sensibilidade e especificidade, pode ser adaptada a laboratórios menos equipados, porém a leitura visual do padrão de aglutinação gera, na prática, divergência de interpretações.

Provas como a fixação de complemento (Myers, 1979) e a imunofluorescência indireta (Torten e cols., 1966; Ribeiro e cols., 1981b; Appassakij e cols., 1995) foram desenvolvidas mas não foram incorporadas à rotina diagnóstica, a primeira por dificuldades técnicas e a segunda pela difícil visualização das leptospirosas.

A hemaglutinação passiva (HAP) para a leptospirose como as descritas por Myers, 1979; Chang & McComb, 1954; e Ribeiro e cols., 1984 e 1985, teve seu período de destaque em diversos laboratórios de análises clínicas na década de 80.

Nossa contribuição com relação à prova de HAP (Ribeiro e cols., 1981a, 1981b, 1984 e 1985) foi a verificação do valor diagnóstico desta prova no acompanhamento sorológico em

diferentes períodos da doença. Foram utilizados eritrócitos de carneiro sensibilizados com a fração F4 da leptospira (Faine e cols., 1974), fragmento de natureza polissacádrica, extraído do sorovar Patoc Patoc I. Os resultados das determinações dos níveis

de anticorpos IgM nas amostras séricas de pacientes com leptospirose comprovada clínica, epidemiológica ou laboratorialmente, foram comparados à prova de SAM. Quanto à sensibilidade da HAP, concluímos que o teste detectou corretamente 79,89% dos casos confirmados de leptospirose, valor esse muito próximo ao obtido na prova de SAM (80,42%). No intervalo do 6º ao 10º dia da infecção, a prova de HAP apresentou número de resultados positivos significativamente superior aos da SAM. No acompanhamento sorológico de 105 pacientes, a prova de HAP demonstrou títulos em manutenção ou declínio entre o 16º e o 35º dia da doença, enquanto nesse período os títulos da SAM tendiam a ascender. Concluiu-se, pois, que os resultados da prova de HAP, aliados aos aspectos clínicos, constituem melhor subsídio, comparativamente à SAM, no estabelecimento da fase evolutiva da doença leptospirótica. Observou-se, ainda nesse estudo, que 4% dos pacientes do grupo controle apresentavam prova de HAP positiva, isto é, com títulos ≥ 128 .

Adler & Faine (1978), mostraram em experimentos com hamsters, que os anticorpos contra a fração polissacarídica F4 pertenciam exclusivamente à classe IgM, mesmo após 10 meses de infecção, não aglutinavam as leptospiros e também não podiam ser correlacionados com a capacidade protetora dos soros. Por sua vez, os títulos de aglutininas IgM detectados na

prova de SAM, eram maiores que os títulos de aglutininas IgG, e proporcionavam proteção contra a infecção letal por leptospiros.

Inúmeros estudos foram conduzidos para se determinar quais os **antígenos envolvidos na resposta à infecção** por leptospiros. Vários autores (Nunes-Edwards e cols., 1985; Chapman e cols., 1987 e Niikura e cols., 1987) investigaram antígenos reconhecidos pelos anticorpos IgG em anti-soros hiperimunes de coelhos.

Chapman e cols. (1988), estudaram os antígenos reconhecidos pela resposta imune humana na infecção natural por *Leptospira interrogans* sorovar *hardjo*, mas não realizaram o “immunoblotting” contra a cepa isolada do próprio paciente.

Os antígenos envolvidos na resposta imune humana à infecção natural por *Leptospira interrogans* sorovar copenhageni M20 foram analisados por nós (Ribeiro e cols., 1992b) onde foram comparados os perfis de “immunoblotting” de anticorpos IgM e IgG, contra antígenos de leptospiros recém isoladas, obtidos tanto com soros de pacientes com leptospirose, do 8º dia até 4 meses após o início dos sintomas, como com soros de indivíduos normais. Todos os pacientes com leptospirose desenvolveram anticorpos IgM reagindo com uma banda difusa de PM entre 14,8 e 22 kDa. Esta banda, com uma mancha de coloração característica, era semelhante à descrita para LPS de outras bactérias (Linko-Kettunen e cols., 1984), incluía antígenos resistentes à digestão com proteinase-K e era corada

pelo método de prata que permite uma resolução adequada do LPS. O perfil de anticorpos IgG nos pacientes confirmou o que já era bem estabelecido na leptospirose humana, i. é, que esta resposta é muito variável entre os pacientes, podendo não aparecer nem mesmo nos estágios mais avançados da doença. Os indivíduos normais, por sua vez, não apresentavam anticorpos contra essa banda difusa entre 14,8 e 22 kDa, mas possuíam IgM contra uma banda dupla de aproximadamente 65 kDa, semelhante à descrita por Ballard e cols. (1990), cujos antígenos são compartilhados por um amplo espectro de microrganismos. Nesta investigação mostrou-se que os componentes antigênicos compreendidos entre 14,8 e 22 kDa provocam resposta imune com formação precoce de anticorpos que reagem cruzadamente com antígenos de diferentes cepas de leptospirosas, sugerindo serem estes possíveis marcadores para a investigação de leptospirose nos pacientes suspeitos.

Chapman e cols, (1990), encontraram no “immunoblotting” de soros de todos os voluntários vacinados com uma vacina bivalente contendo os sorovares hardjo e pomona, anticorpos IgM reagindo com uma banda difusa de PM de 14,4 a 27kDa.

Visando obter uma fração pura e mais específica de leptospirosas, para ser utilizada como antígeno teste e assim diminuir o “background” do grupo controle, Ribeiro e cols (1994) purificaram os antígenos imunodominantes proteinase K-resistentes e desenvolveram uma prova de ELISA, o “IgM-PK-ELISA”, ou simplesmente “PK-ELISA”, que foi utilizada para a detecção de anticorpos IgM antileptospirosas. O potencial deste teste como ferramenta diagnóstica foi comparado aos das provas de SAM e de SAT (Ribeiro e cols., 1996). Esta prova mostrou-se

adequada ao diagnóstico precoce, principal interesse na rotina diagnóstica da leptospirose humana, segundo Adler e cols. (1984) pois detecta a IgM específica que aparece precocemente e persiste por longo tempo, sendo que alguns pacientes nunca chegam a produzir a IgG específica. O antígeno resistente à proteinase K, obtido da cepa *L. copenhageni* M20, foi utilizado para detectar anticorpos específicos em soros de pacientes com leptospirose infectados com diferentes sorovares. O resultado geral foi comparável ao obtido com a prova de SAM. No entanto, o PK-ELISA foi capaz de detectar anticorpos em 38% dos casos na fase aguda em que a prova de SAM ainda era negativa. Observamos também que o teste apresenta baixa sensibilidade na detecção do sorogrupo *australis*, fato este que já havia sido descrito em outros testes ELISA (Cinco e cols., 1992).

Blackmore e cols. (1984) detectaram anticorpos aglutinantes até 20 anos após a infecção, com uma variação acentuada entre os títulos máximos de um indivíduo para outro. Estes autores indicaram que não é possível, a partir de um único resultado de SAM, estimar retrospectivamente o tempo no qual a infecção ocorreu. Com o teste PK-ELISA (Ribeiro e cols., 1994) também foram detectados anticorpos que persistem no soro por muito tempo após a soroconversão. Amostras seriadas de soros de pacientes com síndrome de Weil com seguimento por até 4-8 meses tiveram níveis de anticorpos significantes detectados pelo PK-ELISA, a partir do 5º dia da doença e que permaneceram até o 8º mês da doença, quando seus níveis estavam aproximadamente quatro vezes menores. No entanto, nossa observação de que 52,4% dos pacientes com soroconversão na prova de SAM apresentaram elevadas densidades ópticas (D.O.)

no PK-ELISA ($D.O. \geq .0,800$), levou à sugestão de que níveis altos de anticorpos nesta prova, em uma única amostra de soro, poderia ser indicativa de infecção recente. Importante aplicação imediata desta interpretação, seria a elucidação diagnóstica dos casos fatais em que não se pode obter

amostras subsequentes de soro. Assim, um resultado de SAM negativo associado a um PK-ELISA com D.O. de 1,091 na amostra de soro de um indivíduo, cuja morte foi atribuída à leptospirose somente com base em dados clínicos e epidemiológicos, é indicativo de uma infecção recente.

Soros de indivíduos normais mostraram uma proporção de reações positivas de 5,2% e 2,6% nas provas de SAM e de PK-ELISA, respectivamente (Ribeiro e cols, 1994). Como a leptospirose é amplamente disseminada no Brasil, é possível que algumas dessas reações sejam devidas à infecção oligossintomáticas recente ou pregressa com leptospiras.

Quando da comparação dos resultados do PK-ELISA e do teste de aglutinação macroscópica (SAT) utilizando-se a SAM como prova de referência (Ribeiro e cols. 1996), ambos os testes diferiram estatisticamente da prova de SAM, em termos de positividade dos soros na fase aguda da doença, tendo 38% dos pacientes a leptospirose identificada pelo PK-ELISA e pela SAT antes da SAM tornar-se positiva.

O amplo espectro de sorovares detectados pelo teste de PK-ELISA autorizava seu emprego, como teste de triagem

confiável para o diagnóstico da leptospirose, incluindo as formas atípicas ou semelhantes à influenza, que freqüentemente escapam ao diagnóstico e permanecem como febre de origem desconhecida.

Num levantamento de casos subclínicos entre 2.368 doadores de um banco de sangue localizado em São Paulo, Capital, as amostras de soro foram triadas com o teste PK-ELISA e as que apresentaram alguma reatividade nesta prova foram submetidos à SAM e à SAT (Ribeiro e cols., 1997).

Os casos que apresentaram resultados positivos ou suspeitos, em pelo menos dois dos testes, foram então analisados no “immunoblotting” contra antígenos de leptospiros separados em eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil sódico a 12,5% (SDS.-PAGE). O perfil do anticorpo IgM foi definido de acordo com o seguinte critério: soros reativos na banda difusa de peso molecular entre 14,8 e 22 kDa foram considerados positivos para leptospirose; soros que não são reativos nesta banda foram considerados negativos. Encontramos uma prevalência de 1,01% (24 casos) de positividade na amostragem analisada.

Uma nova prova, para detectar IgM anti-leptospiros, que utiliza a suspensão de antígenos resistentes à proteinase K, o “PK-Dot-ELISA”, foi desenvolvida e comparada à prova de SAM por Ribeiro e cols. (1995). Após a conclusão diagnóstica das amostras de soro de pacientes com leptospirose como do grupo controle, o teste PK-Dot-ELISA foi estatisticamente semelhante à prova de SAM quanto à sensibilidade e à especificidade, e foi

capaz de detectar precocemente 43% dos casos com leptospirose na fase aguda quando ainda eram negativos na prova de SAM.

Testes que utilizam antígenos resistentes à proteinase K são especialmente convenientes para laboratórios que não podem

manter continuamente culturas de leptospiros, pois esta suspensão antigênica é estável por mais de 6 anos, quando guardada seca à temperatura ambiente, mas têm como restrição o uso de reagentes importados no preparo de seus reagentes que se denaturam facilmente.

Estudos clínicos e anátomo-patológicos sugerem que as lesões ou as disfunções orgânicas da leptospirose possam ser causadas pela ação direta das leptospiros ou por toxinas elaboradas por essas bactérias ou liberadas durante a sua lise (Arean, 1962; De Brito e cols., 1966; Sitprija e cols., 1980; Alves e cols., 1987). Tentativas de isolamento e caracterização de possíveis fatores tóxicos, foram feitas por Knight e cols. (1973), Faine e cols. (1974) e Vinh e cols. (1986b).

Tendo em vista novos **subsídios à compreensão da patogenia da leptospirose**, em nosso estudo subsequente foi feito o isolamento dos anticorpos humanos específicos para os antígenos PK-resistentes, a partir de soros de pacientes com a leptospirose.

Utilizando-se esses anticorpos em técnicas imuno-histoquímicas, avaliamos a presença destes antígenos em tecidos de cobaias infectadas experimentalmente.* (Ribeiro e cols, 1999a , b, c)

Antígenos PK-resistentes predominantemente ligados à membrana dos hepatócitos, em fígado de cobaia, no 6º dia da infecção, foram evidenciados por anticorpos humanos policlonais**, produzidos na vigência de uma infecção natural. Com isso, formulamos a hipótese da associação desses antígenos com as alterações morfológicas e o papel relevante destes na patogenia da doença.

Desde a descrição por Kohler & Milstein, 1975, da metodologia para a produção de **anticorpos monoclonais**, várias aplicações para esses anticorpos têm sido descritas, incluindo a purificação e/ou detecção de antígenos específicos. Os anticorpos monoclonais, que reconhecem determinantes antigênicos únicos, podem ser selecionados para uma especificidade desejada, produzidos em grandes quantidades com boa qualidade e podem ser usados no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos, mais rápidos e fáceis.

---

* Detalhes da metodologia deste estudo: A extração do antígeno imunodominante, ou antígeno PK-resistente, do sorovar icterohaemorrhagiae RGA foi feita segundo o procedimento descrito por Cambiaso e cols. (1992). Amostras de soro de pacientes com leptospirose tiveram seus anticorpos específicos adsorvidos em membranas de nitrocelulose, previamente embebidas em antígeno PK-resistente, e bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em tampão tris, pH 7,4. A dessorção dos anticorpos específicos foi realizada com tampão glicina, pH 2,8, seguida de neutralização imediata com tampão tris, pH 12. A técnica de imuno-histoquímica utilizando esses anticorpos empregou fragmentos de fígado de cobaias, infectadas experimentalmente com o sorovar icterohaemorrhagiae, do sexto dia de infecção, conforme descrito em Alves e cols, 1992.

** E também com anticorpos policlonais de carneiros imunizados experimentalmente (Ribeiro e cols, 1999 **d e e**)

Na leptospirose, os anticorpos monoclonais já foram empregados para as seguintes finalidades: identificação dos sorovares (Terpstra e cols., 1985); utilização como sonda imunológica para discriminar leptospiras patogênicas de não-patogênicas (Cinco, 1990); identificação de antígenos gênero e espécie-específicos (Adler e Faine, 1983b); diagnóstico rápido da leptospirose humana quando utilizados em testes como o Dot-ELISA (Saengjaruk e cols., 2002).

A identificação de isolados de leptospiras (Terpstra e cols., 1985), por meio de um painel de anticorpos monoclonais permite, aos poucos laboratórios que podem realizar a prova de aglutinação microscópica, a identificação dos isolados com relativa rapidez.

Cinco (1990) avaliou o anticorpo monoclonal F9-4, produzido por Jost e cols. (1988) como sonda imunológica para discriminar leptospiras patogênicas das não-patogênicas, e concluiu que este método não era absoluto. Este monoclonal F9-4 reconhecia um epítipo presente nas proteínas do envelope externo com peso molecular de 35 kDa e em outras frações com pesos moleculares mais altos.

A detecção de antígenos de leptospiras na urina, pelo grupo de Saengjaruk e cols. (2002), por meio de um teste de Dot-ELISA utilizando o monoclonal LD5, específico para um epítipo presente em componentes de peso molecular de 35 kDa de todos os sorogrupos da espécie patogênica da *Leptospira*, mostrou alto potencial para um diagnóstico rápido e específico da leptospirose.

1.3 Justificativa para novas investigações

De um modo geral, a leptospirose vem sendo diagnosticada em hospitais, como o Instituto de infectologia Emilio Ribas de São Paulo, com base na definição de caso adotado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual da Saúde, qual seja, o paciente que apresente sintomas sugestivos como os descritos nos casos suspeitos e com um teste sorológico específico confirmando a doença ou que apresente testes laboratoriais mostrando danos no fígado e/ou no rim e/ou envolvimento vascular ao lado de exposição a fatores de risco para a leptospirose.

Mas para os laboratórios de análises clínicas que recebem os soros de indivíduos suspeitos, e que não são os da população de risco, fica difícil afirmar que se trata de um indivíduo com leptospirose, com um único teste positivo, como o ELISA, por exemplo, que emprega antígeno sonicado de leptospiros, pois como se sabe, estes testes podem dar resultados falso-positivos.

Além disso, a leptospirose pode apresentar-se nas formas mais leves, cujo quadro clínico se confunde com uma simples gripe.

A necessidade de um novo procedimento rápido, sensível e confiável, que possa ser usado na rotina diagnóstica laboratorial para detectar casos de leptospirose é grande, tanto em áreas de alta como de baixa endemicidade.

O único antígeno alvo conhecido tanto para os anticorpos aglutinantes como para os opsonizantes é o lipopolissacáride (LPS) ou “LPS-like”, como é referido por alguns autores, uma vez que ele lembra, bioquímica e sorologicamente, um LPS típico

de bactérias gram-negativas mas, no entanto, tem atividade endotóxica muito reduzida (Faine e cols., 1974, Isogai e cols., 1986, Vinh e cols. , 1986).

A despeito do papel crítico do LPS de leptospira na imunidade, quase nada é conhecido de sua estrutura detalhada (Mitchison e cols., 1997). Tentativas de análise imunoquímica e fisicoquímica convencional não tiveram sucesso por não se poder obter quantidade suficiente de material devido à dificuldade e custo do cultivo de grande número de leptospiras.

Anticorpos monoclonais reagindo com epítomos do LPS são aglutinantes (Adler & Faine, 1983), opsonizantes (Farrely e cols., 1987), e protetores (Jost e cols., 1986; Schoone e cols., 1989) e a imunização ativa com o LPS, ou com o polissacáride derivado deste, pode proteger hamsters e camundongos contra a infecção (Jost e cols., 1989; Midwinter e cols., 1990).

Por sua vez, frações antigênicas de leptospiras resistentes à proteinase-K, contendo antígenos imunodominantes importantes como o LPS, quando aplicadas em placas de ELISA, como no PK-ELISA, podem ser a base para a seleção de novos anticorpos monoclonais específicos, que possam ser utilizados como ferramentas importantes tanto para o imunodiagnóstico como para o estudo das leptospiras.

A presente investigação relata os resultados obtidos nos protocolos de ELISA que utilizam anticorpos monoclonais ou os produtos isolados com o auxílio destes, oriundos de um “Acordo de Pesquisa Cooperativa” entre o Instituto Adolfo Lutz e o Laboratório Fleury S. A., estabelecido em julho de 1998, para a

—

produção de novos anticorpos monoclonais e a introdução de novos testes diagnósticos a partir destes.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

1) Produzir anticorpos monoclonais contra antígenos específicos das leptospiros.

2) Padronizar ensaios diagnósticos, para a detecção de anticorpos em amostras de soro humano, utilizando esses anticorpos monoclonais obtidos ou os antígenos purificados a partir destes.

3) Avaliar os resultados obtidos comparando-os aos de testes utilizados na rotina diagnóstica em nosso meio

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Soros positivos para leptospirose: Amostras séricas de 52 pacientes com leptospirose, internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, nos anos de 1999 e 2000, constituíram respectivamente o grupo 1 (n=32) e o grupo 2 (n=20) de pacientes. As informações a respeito da comprovação clínica, epidemiológica ou laboratorial da infecção destes pacientes foram obtidas no Centro de Informações de Saúde do Estado de São Paulo. Duas amostras foram utilizadas na análise da evolução dos títulos. A soroaglutinação microscópica (SAM) foi negativa na primeira amostra em todos os pacientes, sendo pedido novo material (NM). A soroconversão⁴ na 2ª amostra[#], dos 52 pacientes, na prova de SAM, comprovou laboratorialmente que se tratava de casos de leptospirose. Portanto, os 2 grupos não diferem sorologicamente nem epidemiologicamente e estão separados apenas por uma questão de terem resultados de exames diagnósticos adicionais distintos, como pode ser visto mais adiante.

Amostras seriadas obtidas de 12 pacientes com leptospirose (Síndrome de Weil) acompanhados por um período de até 4 a 8 meses, constituiu o grupo 3 de pacientes.

---

⁴ Soroconversão – resultado com diferença de duas ou mais diluições entre duas amostras seriadas.

[#] Dias após o início dos sintomas em que foram colhidas estas 2ª amostras: de 11 a 28 dias, média aproximada de 16 dias.

Soros do grupo controle (n=125) incluiu soros de pacientes com Malária, Febre tifóide, Sífilis, Hepatite e de doadores de banco de sangue clinicamente saudáveis.

Soros positivos para Malária (n=20 casos). Treze casos com título de anticorpos altos. Demais casos com parasitemia e sintomáticos.

Soros reagentes para Febre tifóide (n=5 casos), com prova de Widal positiva para antígenos TH e TO.

Soros reagentes para a Sífilis (n= 20 casos), com reação de VDRL positiva e FTA positivo.

Soros reagentes para Hepatite A e B (n= 12 casos), 5 casos de hepatite B, com antígeno Hbs positivo e IgM anti-HBc positivo; e 7 casos de hepatite A, com IgM anti HAV positivo.

Soros humanos normais (SHN) obtidos de 68 indivíduos saudáveis sem antecedentes históricos ou epidemiológicos para leptospirose.

3.2 Preparo de extratos antigênicos

3.2.1 Extratos antigênicos de *Leptospira interrogans* tratada com Proteinase-K* segundo Cambiaso e cols., 1992.

Cepas de *Leptospira interrogans* sorovar *copenhageni* foram isoladas de culturas de sangue humano e identificadas pelo método de tipagem sorológico segundo Kmety e cols., 1970.

O crescimento das leptospiros foi obtido por cultivo em meio de Korthoff ou EMJH (Difco Laboratories, EUA).

---

* *Proteinase K, (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) extraída do fungo *Tritirachium album* Limber segundo Ebeling e cols, 1974. É uma endopeptidase estável que cliva ligações peptídicas principalmente após o grupo carboxila dos aminoácidos aromáticos e alifáticos. Essa protease serina de ~18,5 kDa promove a digestão proteolítica do lisado de bactéria solubilizando as macromoléculas de LPS presentes, e é inativada pelo PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

Antes do tratamento as leptospiiras íntegras foram lavadas 3 vezes em salina (0,15M NaCl) para remover as proteínas aderentes presentes no meio e a seguir foram liofilizadas. Aproximadamente 110mg de peso bruto, ressuspensos em 1mL de H₂O destilada, foram congelados e descongelados três vezes. Após três ciclos de tratamento, por três minutos cada, com ultrassom (MSE Sifam Electrical Instrument Co. Ltd., Inglaterra), 20Khz., a 0,8mA, a 4° C, foram determinadas as concentrações de proteínas pelo Método de Lowry. Concentrações protéicas de 2mg/mL, foram misturadas, v/v, com Proteinase K, 0,2mg/mL em tampão tris HCl 0,1M pH 7,5 com CaCl₂ 20mM e mantidas de 2 a 18 horas a 37°C. A reação foi bloqueada com solução de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 1mM, por 2 horas a 37°C. Após centrifugação a baixa rotação, alíquotas de 50µl da suspensão antigênica foram distribuídas em tubos de diluição e foram deixadas em estufa a 37°C, ou em dessecadores a vácuo, até a evaporação completa do sobrenadante. A seguir foi feito o tratamento com a DNase, ressuspensando-se cada tubo de diluição em 30µl de H₂O destilada e agitando-se bem num banho-maria a 37°C. Subseqüentemente foram adicionados 25µl de tampão acetato de sódio 1M, pH 5,0, e 12,5µl de MgSO₄ 0,1M, obtendo-se um volume final de antígeno de 67,5µl, ao qual foram adicionados 34µl de DNase a 80 Kunitz (vide apêndice) sendo a mistura então mantida a 25°C por 18 horas. Após a inativação a 65°C por 1 hora, passou-se ao tratamento com RNase pancreática, usada na concentração de 50µg por mL de suspensão antigênica, por 18 horas, a 37°C. Após o tratamento, inativou-se a 65°C por 1 hora. A quantidade de carboidrato (CH₂O) foi determinada pelo Método de Dubois (Dubois e cols., 1956) e o cálculo da diluição em etanol para cada nova extração foi feito comparando-se com

extrações anteriores, isto é, $\sim 0,110\mu\text{g CH}_2\text{O/alvéolo}$ das microplacas do ELISA. O armazenamento foi à temperatura ambiente (18 a 25°C) sendo a validade maior que 5 anos. Na hora de usar no teste ELISA, ressuspendeu-se o antígeno em etanol, agitando-se em ultrassom e alternando com alguns minutos em banho-maria a 37°C, para melhor dissolver as micelas que possam existir em suspensão; a solução de antígeno foi, a seguir, distribuída em microplacas de poliestireno (Corning, Nova York, EUA, com 96 alvéolos, fundo chato)(Ribeiro e cols., 1994). Assim, no lote usado no presente estudo, tubos com 30 μl da suspensão antigênica seca foram ressuspensos em 3,4mL de etanol absoluto e distribuídos 25 μl por alvéolo. As microplacas foram secas em estufa a 37° C.

3.2.2 Solubilização de *Leptospira interrogans* obtida por extração com detergente zwittergent 3-12 conforme descrito em Alderate e cols. (1985). Leptospiras obtidas de cultivos em 90mL de meio EMJH (Difco Laboratories, EUA) foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,4, e ressuspensas em 500 μl de PBS, pH 7,4, contendo phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) a 1mM (Sigma Chemicals Corporation , St Louis, EUA) . Após a adição de 50 μl de zwittergent 3-12 a 10% (Calbiochem-Behring Chemical Corp., La Jolla, Califórnia), a preparação foi homogeneizada gentilmente e adicionada de mais 375 μl de PBS pH 7,2 com PMSF a 1mM. Após 20 min, o extrato de leptospira foi separado dos debrís insolúveis, por centrifugação a 23000 X g (15745rpm, centrífuga Biofuge, Haeraeus Instruments) a 4°C por 30 min. Repetiu-se mais uma vez o procedimento, pois a eficiência não é de 100%. O sedimento foi desprezado, e o sobrenadante foi dialisado em tubo de diálise (Sigma Chemicals, St Louis, EUA) que retém PM>2000, contra 3 trocas de PBS pH

7,2 (cerca de 1L cada) a 4°C. Pequenos volumes do extrato foram armazenados, em tubos eppendorff, a -70°C. O conteúdo protéico foi determinado conforme metodologia descrita por Lowry e cols., 1951.

3.2.3 Outros extratos antigênicos

Extrato de *T. pallidum*, fornecido gentilmente pela Biolab Mérieux S.A. de São Paulo, foi obtido por extração com detergente zwittergent (Calbiochem-Behring Chemical Corp., La Jolla, Califórnia), segundo Alderate e cols., 1985. O extrato continha ~0,5µg/mL de proteínas totais, conforme determinado pelo Método de Lowry e cols., 1951.

Extrato antigênico de *P. falciparum*, fornecido gentilmente pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, foi isolado da paciente A.D.A., procedente de Rondônia, e foi obtido por extração com detergente zwittergent (Calbiochem-Behring Chemical Corp., La Jolla, Califórnia), conforme descrito em Alderate e cols. (1985). A cepa foi mantida no Laboratório de Malária do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em cultivo “in vitro”, assincrônico em hemácias humanas tipo O, e meio de cultura de RPMI e soro humano. Quando a parasitemia atingiu cerca de 10% com formas predominantes de esquizontes, as hemácias foram lisadas e então procedeu-se à extração do antígeno com zwittergent. Após a centrifugação, o sobrenadante teve suas proteínas dosadas pelo Método de Lowry (1951), e foi armazenado em nitrogênio líquido. O lote utilizado no presente

estudo continha 3605µg/mL de proteínas totais. Para uso no teste ELISA a microplaca foi revestida com 100µl/alvéolo do extrato antigênico, na concentração de 5µl/mL em PBS 0,01M, pH 7,4.

3.3 Técnicas sorológicas

3.3.1 Soroaglutinação microscópica (SAM) Conforme o procedimento descrito por Sulzer & Jones (1976). Culturas vivas de cepas dos seguintes 22 sorovares foram usadas como antígeno: 1. icterohaemorrhagiae RGA; 2. copenhageni M20; 3. grippotyphosa Moskva V; 4. canícola Hond Utrecht IV; 5. pomona Pomona; 6. bataviae van Tienen; 7. australis Ballico; 8. pyrogenes Salinem; 9. tarassovi Miti Johnson; 10. andamana CH11; 11. autumnalis Akiyami A; 12. shermani LT- 821; 13. wolfii 3705; 14. javanica Veldrat Bataviae 46; 15. panama CZ-214 k; 16. hebdomadis Hebdomadis; 17. celledoni celledoni; 18. castelonis Castellon 3; 19. patoc Patoc I; 20. butembo Butembo; 21. cynopteri 3522; 22. djasiman Djasiman (OBS: hardjo, braziliensis e castelonis Ballum não estão na bateria de rotina). Estes sorovares representavam todos os sorogrupos conhecidos como prevalentes em São Paulo, Brasil (Sakata e cols. 1992). Os mais freqüentes, segundo um levantamento feito em 1996 (comunicação verbal) foram os seguintes sorovares: RGA (25%), M20 (14,7%), autumnalis (7,6%), canicola (6%), cynopteri (3,9%), hebdomadis (2,5%) e grippotyphosa (1,2%). A aglutinação a uma diluição de 1:100 foi considerada positiva.

3.3.2 Aglutinação macroscópica da Fiocruz (também conhecida como SAT) Teste realizado de acordo com o fabricante, i. e., 10 µl de amostra sérica não diluída foi colocada em lâmina de vidro. Uma gota, de aproximadamente 55µl, de suspensão antigênica homogeneizada foi dispensada próxima a cada gota de soro. Sem demora, usando palitos misturadores, os reagentes foram gentilmente misturados com a amostra teste. A mistura foi colocada num agitador de lâmina, ajustado para 120 rpm por 6 minutos. A reação positiva foi indicada pelo desenvolvimento de uma aglutinação visível. Esta prova foi realizada apenas no grupo 1 de pacientes com leptospirose, como um teste diagnóstico adicional disponível em nosso meio, pelo Dr Rui Vadik Abrão, da Fundação Oswaldo Cruz, Biomanguinhos, Rio de Janeiro.

3.3.3 Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (SDS-PAGE) e “immunoblotting” conforme técnicas descritas em Zingales (1984). Leptospiras lavadas foram suspensas no tampão de solubilização da amostra (v/v) contendo 2,5% de sulfato dodecil sódico (SDS), 2,5% de 2- mercaptoetanol, 10% de glicerol, tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e azul de bromofenol. A suspensão foi aquecida por 3 min em banho de água fervente. Lisados de células íntegras, padronizados pelo conteúdo protéico pelo método de Lowry e cols. (1951), foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5%, de 1 mm de espessura, com o sistema de tampão descontínuo de Laemmli (1970) e Studier (1973). Depois da eletroforese o gel ou foi corado com Coomassie Brilliant Blue (CBB) (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA) a 0,2% (w/v) em água/ metanol/

ácido acético na proporção de 40:50:10 (v/v), ou foi transferido para membranas de nitrocelulose (poro de 0,45µm, Bio-rad Richmond, EUA) numa cuba de transferência, a 50 V por 24 horas, usando tampão de Towbin e cols. (1979) diluído a 1:2. Na técnica de “**immunoblotting**”, as membranas de nitrocelulose foram submetidas à coloração reversível com Ponceau S (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA), bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% (Johnson e cols., 1984) em tampão Tris pH 7,4, por 2 horas e incubadas com soros humanos. Para isso, soros humanos e soros de cabra anti-cadeia µ humana (IgM) ou anti -cadeia γ humana (IgG) (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA) conjugados com peroxidase foram diluídos, 1 para 100 e 1 para 200 respectivamente, em tampão bloqueador, e consecutivamente incubados com as fitas de “blotting” por 18 horas a 4° C (soro humano) e 2 horas a 37° C (conjugado). As fitas foram lavadas com quatro trocas de tampão Tris depois de cada incubação, e reveladas com 4-cloro-naftol (4 -CIN) (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA) na proporção de 600µl 4-CIN, na concentração de 3 mg/mL em metanol (Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil), para 5,4mL de tampão Tris (Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil), pH 7,5, e 60µl de H₂O₂. Os pesos moleculares (PM) das bandas visualizadas foram determinados por comparação com PM padrões obtidos da Pharmacia A B (Uppsala, Suécia).

Na análise das frações reconhecidas pelos anticorpos monoclonais no “immunoblotting” foram feitas incubações com os anticorpos biotinilados e não-biotinilados, seguidas das etapas de revelação adequadas a cada caso.

Foi incluída nos ensaios de “immunoblotting” uma fita, obtida a partir do mesmo gel de corrida, que foi incubada com soro de paciente com leptospirose para que o perfil da banda de antígenos “PK-resistentes” ou “LPS-like”, reconhecida pelos anticorpos IgM de todos os pacientes com leptospirose, pudesse ser comparado ao perfil de reconhecimento dos antígenos pelos monoclonais.

3.3.4 ELISA clássico (ELISAc, enzyme-linked immunosorbent assay, ou, ELISA-IgM) Método clássico, utilizando microplacas (Corning, Nova York, EUA) sensibilizadas com leptospirosas ultrasonificadas como antígeno, para a pesquisa de anticorpos IgM, conforme descrito por Silva e cols. (1988). Anticorpos de coelho anti- cadeia μ humana (IgM) e anti cadeia γ humana (IgG), marcados com fosfatase alcalina foram obtidos da Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA. A densidade ótica (D.O.) em cada alvéolo foi medida utilizando-se um leitor de ELISA (Titertek Multiskan, MCC, Flow Lab., EUA) no comprimento de onda (λ) de 409 nm. Nos casos em que foram comparados o ELISA IgM clássico com os métodos que utilizam os monoclonais purificados, o “pool” de leptospirosas sonicadas incluiu os seguintes sorovares de leptospirosas: *braziliensis*, *cynopteri*, *icterohaemorrhagiae*, *canícola* e *hebdomadis*. O “cutoff” foi dado pela D.O. média de 8 soros controles (4 soros humanos normais e 4 soros de portadores de outras patologias) mais 3 vezes o desvio padrão.

3.3.5 PK-ELISA Microplacas de poliestireno (Corning, Nova York, EUA) foram sensibilizadas com extrato de leptospiras tratadas com proteinase K, conforme descrito em Ribeiro e cols. (1994). Antes do uso, as microplacas sensibilizadas com o antígeno foram lavadas 3 x com PBS 0,01M, pH 7,2, sem Tween 20 e a seguir foram incubadas, por 1 hora a 37°C, com 100µl dos soros diluídos a 1/400 em PBS contendo leite em pó desnatado a 1%. Após 3 novas lavagens das microplacas, os anticorpos IgM foram revelados com 100 µl de conjugado anti-IgM humano marcado com peroxidase (IgG de cabra anti-IgM humana específica para cadeia μ , obtido da Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA), diluído a 1: 2000, conforme titulação prévia. Após incubação por 1 hora a 37° C, as microplacas foram lavadas (3 X) novamente, como descrito acima, e 50µl de substrato (0,4 mg mL⁻¹ de o-phenilenediamino (OPD), da Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA, em tampão fosfato citrato pH 5,0 e 0,012% de H₂O₂) foram adicionados em cada alvéolo. Depois de 10 min à temperatura ambiente, 50 µl de H₂SO₄ 1M contendo 0,5% de sulfito de sódio foram adicionados a cada alvéolo para interromper a reação. A intensidade da cor amarela resultante foi medida em um espectrofotômetro (Titertek Multiskan, MCC Flow Labs, Inc, Finlândia) em comprimento de onda (λ) de 492 nm. O ponto de corte (“cutoff”) foi determinado pela média da densidade ótica (D.O.) de três soros negativos incluídos em cada microplaca mais três desvios padrões, e esse valor foi considerado como correspondente ao mais baixo nível no qual a IgM específica está presente em um soro positivo.

Para a prova de PK-ELISA utilizada na seleção dos clones para a produção dos monoclonais, após 10 dias da fusão,

incluiu-se um bloqueio prévio das microplacas com PBS, pH 7,2, contendo 0,5% de BSA, por 1 h a 37°C e foi feita a incubação, por 2 horas, com 50µl do sobrenadante dos alvéolos, a 37° C. Prosseguiu-se com a adição de 50µl de anti-imunoglobulina de camundongo marcado com biotina (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA), 1/2000 em PBS-BSA 0,5%, e incubação a 37° C por 1 hora, seguida pela adição de avidina marcada com peroxidase (HRPO) (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA), 1/1000 em PBS-BSA 0,5%, e incubação por 1 hora a 37° C.

3.3.6 ELISA com extratos de zwittergent Uma das provas utilizadas na caracterização dos hibridomas, em que 110µl de extratos antigênicos de zwittergent, de sorovares de leptospiros bem como do *T. pallidum* e do *P. falciparum*, foram colocados nas cavidades da microplaca de poliestireno (Corning, Nova York, EUA) em tampão carbonato pH 9,6, na concentração de 5µg proteínas/mL (cavidades com antígeno). Nas cavidades sem antígeno foram colocados apenas 110µl de tampão carbonato, pH 9,6. As placas foram deixadas a 4° C, por 18 horas. Em seguida foram feitas 2 lavagens dessas placas com PBS, pH 7,4, e procedeu-se ao bloqueio com 180µl de PBS, pH 7,4, contendo BSA a 0,5 g% (PBS-BSA 0,5g%), por 1 hora a 37°C. Lavou-se mais duas vezes com PBS, pH 7,4. A seguir foram adicionados 50µl do sobrenadante dos hibridomas, diluídos 1/10, 1/20 e 1/50 em PBS, pH 7,4, sendo então as placas incubadas, por 2 horas, a 37°C, após o que foram lavadas 4 vezes com PBS, pH 7,4. Foram adicionados, subseqüentemente, 50µl por cavidade de anti-imunoglobulina de camundongo marcado com biotina (ou, em alguns testes, conjugado à peroxidase), diluído conforme

titulação prévia em PBS-BSA 0,5%, sendo as placas incubadas por 1 hora a 37°C. Foram efetuadas mais 4 lavagens destas com PBS, pH 7,4. E após a adição de estreptoavidina acoplada à peroxidase, diluída em PBS-BSA 0,5g%, as mesmas foram incubadas por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas mais 4 vezes e reveladas com OPD por 30 minutos. A reação foi bloqueada com a adição de 10µl de H₂SO₄ 1N por cavidade. A leitura das D.O. foi efetuada no comprimento de onda de 492nm. O “cutoff” foi estabelecido como sendo 2,1 vezes a D.O. da cavidade sem antígeno. Este valor arbitrário foi anteriormente adotado por Fields & Maynard, 1982⁵ e Ribeiro e cols., 1992^a. Assim, quando a D.O. da cavidade com antígeno era maior ou igual ao “cutoff”, o hibridoma foi considerado reativo.

3.4 Outras técnicas

3.4.1 Dosagem de proteínas segundo o método de Lowry e cols., 1951. Reagentes obtidos da Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil.

---

⁵ Fields & Maynard , 1982, no manual da OPAS utilizado no “Workshop on Enzyme-Linked Immunoassay tests” , realizado no Rio de Janeiro, de 16 a 28 de agosto de 1982.

3.4.2 Técnica de Biotinilação segundo Kendall e cols., 1983. Após o preparo de N-hidroxisuccinimida biotina (NHS-biotina ,

Piera Illinois, EUA, CAT 20217) 0,1 M (3,4mg/100µl dimetilformamida, Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil), dialisou-se a fração gamaglobulina (2mg/mL) contra tampão bicarbonato de sódio 0,1M, por 18 horas, a 4 °C. A seguir foram adicionados 12µg de NHS-biotina 0,1M em dimetilformamida. Incubou-se por 4 h à temperatura ambiente com agitação constante. Dialisou-se contra PBS, pH 7,4, fazendo pelo menos duas trocas. Centrifugou-se a preparação a 2500 rpm (centrífuga Haeraeus Instruments, Biofuge Stratos, Alemanha) por 15 minutos, e diluiu-se com igual volume de glicerina (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA). A preparação foi mantida a -20°C, protegida da luz, para evitar a inativação.

3.5 Produção dos anticorpos monoclonais

Desenvolvido no Setor de Desenvolvimento do Laboratório Fleury, num “Acordo de Pesquisa Cooperativa” com o Instituto Adolfo Lutz, seguindo metodologia descrita por Farrelly e cols. (1987) e Vieira e cols. (1988, 1990 e 1994), com pequenas modificações.

Resumidamente, a obtenção dos monoclonais incluiu as etapas de imunização de camundongos Balb/c e o procedimento de fusão baseado no método de Goding (1980) (células da linhagem de mieloma murino SP2/O na presença de polietileno glicol (PEG) 4000 com células esplênicas de camundongos

imunizados). Após a fusão as células foram diluídas em HAT (hypoxantina, aminopterina e timidina) e distribuídas em microplacas de culturas de 96 alvéolos, previamente preparadas, contendo macrófagos obtidos de lavagem peritoneal de camundongos. Cerca de 10 dias, em média, após o processo de fusão, procedeu-se à verificação da presença de clones produtores de anticorpos específicos. Os monoclonais obtidos foram selecionados e caracterizados quanto à especificidade em provas de SAM, ELISA e “imunoblotting”. As linhagens selecionadas foram clonadas por técnica de diluição, cultivadas e amplificadas na forma de ascite em camundongos Balb/c.

PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Descrição detalhada das etapas do protocolo da produção dos monoclonais,

a) Imunização

Oito camundongos da linhagem BalB/c foram imunizados com *L. icterohaemorrhagiae* RGA íntegra e não viável após processo de congelamento e descongelamento por três vezes. Foram dadas três doses de 0,2mL por via subcutânea, com intervalos de 21 dias entre elas, da emulsão contendo $6,3 \times 10^8$ leptospiras (30µg de leptospiras secas correspondem a 10^8 leptospiras, segundo Adler e cols., 1982) obtidas em meio de EMJH, com adjuvante completo de Freund (v/v), preparadas na hora do uso. Após 10 dias da última inoculação fez-se a sangria para os testes iniciais (vide abaixo, seleção dos camundongos).

Uma dose de reforço com 0,2mL do antígeno também contendo $6,3 \times 10^8$ leptospiras, sem adjuvante, foi injetada 3 dias antes da fusão nos 2 camundongos com melhor resposta.

b) Seleção de camundongos

Após 10 dias da 3ª dose, foram feitas sangrias dos camundongos imunizados para os testes, a fim de identificar os animais que apresentaram melhor título de anticorpos. Para tanto, retirou-se uma pequena quantidade de sangue por punção do plexo orbital com pipeta Pasteur de vidro e colocou-se em tubo eppendorff de 1,5 mL. Após cerca de 2 horas à temperatura ambiente para retração do coágulo, separou-se o soro que foi armazenado em freezer a -20 °C.

c) Teste dos soros dos camundongos imunizados

com um ensaio imunoenzimático contendo o antígeno adsorvido a uma fase sólida. A prova de PK-ELISA, já padronizada (Ribeiro e cols., 1994), que utiliza a fração antigênica relevante à resposta imune, foi o teste de escolha, para a primeira fusão

d) “Feed- layer” de macrófagos

Camundongos normais foram sacrificados com éter, e mergulhados em álcool comercial por alguns segundos. Uma pequena incisão foi feita na pele na região abdominal e a cavidade peritoneal foi exposta. Todas as etapas posteriores foram realizadas em condições estéreis, em fluxo laminar. Injetou-se 5,0mL de sacarose 0,34M gelada (2 a 8°C) com uma seringa de 5,0mL na cavidade abdominal. Com a mesma seringa, aspirou-se todo o volume possível, transferindo a suspensão rica em macrófagos para um tubo coletor mantido em banho de gelo. Como foram sacrificados vários animais, fez-se um “pool” de todo o material. Após a centrifugação a 1200 rpm em centrífuga refrigerada (cerca de 4°C) por aproximadamente 10 min, desprezou-se o sobrenadante removendo-se o excedente com gaze estéril. As células foram ressuspensas em 5,0 mL de meio RPMI completo e mantidas em banho de gelo.

Procedeu-se a contagem de células: 0,1mL de suspensão de células foram removidas, misturadas com 1,9mL de RPMI completo e a seguir foram contadas em câmara de Neubauer.

As células foram cultivadas em meio RPMI-HAT completo em estufa (35 a 37°C) contendo 5% de CO₂, em placa de Petri (para uso na expansão de SP2/O ou do hibridoma, ou em microplaca de 96 alvéolos (usada no processo de fusão).

OBS: Quando o “feed layer” foi preparado para o descongelamento das células SP2/O, usou-se o meio RPMI

completo com 20% de soro fetal bovino, sem hipoxantina ou aminopterina.

e) Descongelamento e expansão de SP2/O* ou do hibridoma

A ampola contendo as células foi removida do nitrogênio líquido e imediatamente imersa em banho-maria (35-37°C) para descongelamento das mesmas. Foi adicionado à ampola 1,0mL de meio RPMI-completo lentamente, no tempo de 5 min, e esta foi mantida em repouso por 10 min à temperatura ambiente (18-25°C).

A suspensão de células foi transferida cuidadosamente para um tubo coletor.

Três mL de meio RPMI-completo foram adicionados à suspensão de células, lentamente, no tempo de 5 min, que foi mantida em repouso por 10 min à temperatura ambiente (18-25°C)

Após centrifugação a 1200 rpm, por cerca de 10 min à temperatura ambiente (18-25°C), as células foram lavadas com 10mL de meio RPMI-completo e submetidas à nova centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células foi transferido para uma placa de Petri contendo o “feed-layer” de macrófagos preparado previamente (ver item **d** acima). Nova incubação em estufa de CO₂ a 35-37°C. Quando as células atingiram a confluência, procedeu-se aos repiques sucessivos até obter a quantidade de células necessárias à fusão. As células, nessa etapa, puderam ser novamente congeladas como

---

* SP2/O células da linhagem de mieloma murino originalmente obtidas da Cardiac Unit do Massachusetts General Hospital, Boston, MA, EUA.

descrito no item **Congelamento das células**, descrito mais adiante.

f) Fusão

Separação das células para a fusão

Três dias antes da fusão, foram injetados 0,2mL da suspensão contendo $6,3 \times 10^8$ leptospiras íntegras, sem adjuvante, em salina estéril, por via intra-peritoneal nos 2 camundongos cujos soros apresentaram melhor título. Os camundongos foram sacrificados com éter, e em condições assépticas para a retirada do baço, que foi colocado em 5,0mL de meio RPMI completo em placa de Petri. O baço foi transferido para outra placa de Petri, contendo 10mL de meio RPMI completo e, com o auxílio de agulhas, macerou-se o baço transferindo toda a suspensão para um tubo coletor sendo ela mantida à temperatura ambiente (18- 25°C) por cerca de 5 min para sedimentar o material de maior volume. A suspensão de células foi retirada e transferida para um outro tubo coletor. Após centrifugação a 1200 rpm, por aproximadamente 6 min, procedeu-se às lavagens (três vezes) das células do baço com meio RPMI completo.

Fusão propriamente dita

As células do baço foram ressuspensas em 10mL de meio RPMI completo e contadas após diluição de 0,1mL da suspensão em 4,0mL de Solução de Turk.

As células SP2/O após terem sido expandidas, como descrito no item **e**, foram quantificadas e separados os volumes contendo o número necessário de células. Foram efetuadas três

lavagens destas com meio RPMI-completo, para se retirar completamente o soro fetal bovino.

Para a fusão, foram necessárias $3,5 \times 10^6$ células de SP2/O para $10,5 \times 10^6$ de esplenócitos para obter a relação de SP2/O: esplenócitos de 1: 3

As células SP2/O e os esplenócitos foram adicionados a um tubo de 50mL e a mistura centrifugada a 1200 rpm, por aproximadamente 6 min, após o que retirou-se todo o sobrenadante e adicionou-se 1,0 mL de PEG 50% previamente aquecido ($35-37^{\circ}\text{C}$) em 0,5 min sendo o tubo agitado cuidadosamente durante 1,5 min. Em seguida, foram colocados 5mL de meio RPMI completo no tempo de 3 min, 15mL de meio RPMI completo no tempo de 1 min, e 30mL de meio RPMI completo rapidamente, sendo a mistura subsequente submetida à centrifugação a 120 rpm, por aproximadamente 6 min. Aspirou-se o sobrenadante e lentamente as células foram ressuspensas em meio RPMI-HAT completo previamente aquecido ($35-37^{\circ}\text{C}$), sendo a suspensão deixada por cerca de 30 min entre 35 e 37°C e a seguir distribuída nas microplacas de 96 alvéolos ($100\mu\text{l}/\text{alvéolo}$) contendo macrófagos, preparadas previamente, como descrito no item **d**, e numeradas de 1 a 10. A cada três dias foram feitas trocas do meio nos alvéolos, retirando-se aproximadamente $100\mu\text{l}$ do sobrenadante com pipeta Pasteur e adicionando-se $100\mu\text{l}$ de meio RPMI-HAT completo.

g) Seleção de clones

Após 10 dias de fusão, foi feita uma seleção dos alvéolos para identificar aqueles em que havia linfócitos produzindo anticorpos específicos para o antígeno

Para tanto, os sobrenadantes de cada alvéolo, foram avaliados quanto à presença de anticorpos através de um ensaio imunoenzimático com o antígeno PK-resistente adsorvido a uma microplaca de poliestireno (Corning, Nova York, EUA) (PK-ELISA, Ribeiro e cols., 1994).

Foram escolhidos os alvéolos positivos de maior título. As células de seis alvéolos foram então clonadas.

h) Clonagem

As células foram clonadas pela técnica de diluição limitante, garantindo-se desta forma a monoclonalidade. Fez-se a contagem das células de cada alvéolo escolhido, em câmara de Neubauer, e procedeu-se à diluição necessária, em meio RPMI-HAT completo, de forma a ter-se uma célula por alvéolo em uma microplaca de 96 alvéolos (preparada como descrito no item **d**). Nesta etapa os clones receberam uma identificação de acordo com a posição em que eles se encontravam nas microplacas (item **f**), por exemplo: B6P4 (alvéolo B6 da microplaca 4).

Após 10 dias de crescimento, os alvéolos foram avaliados novamente por meio da prova de PK-ELISA, quanto à produção de anticorpos, sendo selecionados os alvéolos positivos

Clone 1- H7P1 (D0- 0,829) *

Clone 2- G11P4 (D0- 0,538)

Clone 3- B9P8 (D.O.- 0,634)

Clone 4- E1P8 (D.O.- 0,746)

Clone 5- E7P9 (D.O.- 1,109) Clonado 2 X com concentrações diferentes de células (1 célula/alvéolo e 3 células/alvéolo)

Clone 6- H10P10 (D.O.- 0,514)

* D.O. obtida com o sobrenadante no teste de PK-ELISA

i) Expansão das células

As células presentes nos alvéolos selecionados foram transferidas para uma placa de Petri e cultivadas em meio RPMI-HAT completo. Nesta etapa as células poderiam ser congeladas como descrito no item **j** ou utilizadas para a produção de ascite como descrito no item **k**. Os clones que cresceram em 12-18% dos alvéolos da placa foram considerados clonados.

O crescimento dos clones obtidos foi de:

Clone 1- 12%

Clone 2- 18%

Clone 3- 12%

Os clones 4, 5 e 6 ou não cresceram ou reagiram com a microplaca sem antígenos.

j) Congelamento dos clones

Ao atingirem o número necessário para o congelamento (cerca de 2×10^6 células/ ampola) os clones foram congelados e armazenados em nitrogênio líquido.

O congelamento das células foi feito da seguinte forma: as células viáveis foram contadas, em câmara de Neubauer, misturando-se 0,1mL da suspensão de células com 0,1mL de Azul de Tripán. Calculou-se o volume necessário para o congelamento (geralmente $1,0 \times 10^6$ células viáveis/ ampola) e centrifugou-se a 1200 rpm por aproximadamente 6 min. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se duas vezes o “pellet” de células com meio de RPMI-simples. Ressuspendeu-se o “pellet” de células em 0,5 mL de soro fetal bovino e manteve-se as células entre 2 e 8 °C por no mínimo 15 min. Adicionou-se solução criopreservante às células (v/v) lentamente. Deixou-se entre -65 e -75°C e transferiu-se para o nitrogênio líquido após cerca de 24 horas. Quando necessário essas células foram descongeladas como descrito no item e, e foram utilizadas para a produção de ascite como descrito no item **k**, e novamente congeladas como descrito neste item.

k) Produção em camundongos, coleta e armazenamento de ascite.

Injetou-se Nujol comercial (0,5mL/animal) na cavidade peritoneal de camundongos Balb/c adultos (mínimo de 6 semanas de idade) cerca de 10 dias previamente à injeção de células. Foram injetadas aproximadamente $0,8 \times 10^6$ células por camundongo para a produção de ascite.

Centrifugou-se a suspensão destas sendo o “pellet” de células lavado duas vezes com 10mL de meio RPMI-completo. Ressuspendeu-se as células em meio RPMI-completo e injetou-se nos camundongos (via intraperitoneal) previamente injetados com Nujol. Após cerca de 10 dias, os camundongos começaram a

produzir a ascite, que foi coletada e armazenada entre -18 e -23°C.

I) Purificação dos anticorpos monoclonais

Para a purificação dos anticorpos monoclonais das ascites estes foram precipitados pela técnica do ácido caprílico (Steinbuch & Audran, 1969) e sulfato de amônio (Hardy, 1986) Foram adicionados dois volumes de tampão acetato de sódio 60mM, pH 4,0 a um volume da ascite previamente centrifugada. O pH foi determinado e ajustado para 4,0. Adicionou-se lentamente ácido caprílico (0,33mL para cada 10mL de ascite) e agitou-se a mistura por cerca de 30 min à temperatura ambiente (18- 25°C). Centrifugou-se a 9000 X *g* por cerca de 30 min em centrífuga (Haeraeus Instruments, Biofuge Stratos, Alemanha) a 4°C, e filtrou-se o sobrenadante obtido em papel de filtro e dialisou-se, por aproximadamente 16 horas entre 2 e 8°C, contra PBS. Precipitou-se o material com sulfato de amônio saturado v/v adicionado lentamente e agitou-se à temperatura ambiente (18-25°C), por cerca de 30 min. Centrifugou-se a 9000 X *g*, por cerca de 30 min a 4°C e ressuspendeu-se o precipitado em PBS pH 7,2. Dialisou-se, entre 2 e 8°C, contra PBS pH 7,2, por aproximadamente 16 horas, realizando-se duas trocas a cada 24 horas. Quantificou-se a preparação de anticorpo monoclonal pelo Método de Lowry.

m) Seleção e caracterização dos monoclonais

A seleção dos monoclonais baseou-se numa série de características: estabilidade da linhagem, facilidade de crescimento e especificidade. À medida em que o processo de produção dos monoclonais se desenvolvia as linhagens mais problemáticas foram abandonadas. Quanto à especificidade, foi estudada por meio de ensaios de “immunoblotting” contra os sorovares icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M20 e canícola Hond Utrecht IV; prova de soroaglutinação microscópica (SAM) contra as 22 sorovares utilizados na rotina diagnóstica; e ensaio de ELISA com extratos de zwittergent de 23 sorovares e também com extratos de zwittergent de *P. falciparum* e *T. pallidum*. Classes e subclasses dos monoclonais foram determinadas por meio de ensaio imunoenzimático utilizando conjugados anti-imunoglobulinas de camundongo (Boehringer Mannheim, Biochemicals, Indianópolis, EUA), conforme descrito pelo fabricante.

Foram utilizados, na primeira fusão, para a produção de ascites os clones 1, 2 e 3.

O Clone 2 (G11P4) não se caracterizou como um monoclonal posteriormente.

Logo, os resultados obtidos são relativos aos monoclonais 1 e 3, respectivamente, H7P1 e B9P8.

n) Segunda fusão Visto que na primeira fusão foram obtidos monoclonais específicos apenas para um sorogrupo, como poderá ser visto nos resultados, dois outros camundongos, remanescentes da primeira imunização, foram selecionados, quanto às melhores respostas em ensaio

imunoenzimático contra os diferentes antígenos extraídos com zwittergent dos sorovares de leptospiros icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M-20, grippothyphosa Moskva V, canícola Hond Utrecht IV e autumnalis Akiyami A, para a realização de uma segunda fusão. Uma dose de reforço de 40µg por camundongo, com a mistura de três antígenos, ou melhor, extratos antigênicos obtidos com o zwittergent dos sorovares icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M-20 e autumnalis Akiyami A, foi dada 3 dias antes da fusão. Os hibridomas selecionados foram os que continham anticorpos no sobrenadante que reagiram no teste ELISA com extratos de zwittergent de pelo menos 2 desses sorovares.

Após a segunda fusão, 6 monoclonais foram produzidos; suas reatividades no ELISA contra extratos com zwittergent dos sorovares icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M20 e autumnalis Akiyami A encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 Monoclonais obtidos na segunda fusão e suas reatividades* no ELISA contra extratos com zwittergent dos sorovares icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M20 e autumnalis Akiyami A.

No	Monoclonal	RGA*	M-20*	autumnalis*
1	B9P1	0,683	0,604	0,539
2	D10P1	0,936	0,992	1,426
3	A12P4	0,898	0,810	0,957
4	E10P3	0,382	0,274	0,424
5	F12P7	1,098	1,054	1,061
6	F12P5	0,898	0,780	0,879

* Reatividade avaliada pela D. O.

3.6 Análise imuno-histoquímica utilizando os monoclonais

Para avaliar a reatividade dos anticorpos monoclonais em cortes de tecido infectado com leptospiros, foi utilizada a reação imuno-histoquímica com amplificação pelo Sistema EnVision Peroxidase (Dako, EUA), a partir de cortes de fígado de cobaia, previamente inoculada por via intraperitoneal com *L. Interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae* RGA e sacrificada no sexto dia da infecção (Alves e cols. 1992), fixados em Bouin e formol respectivamente e incluídos em parafina. Os cortes histológicos, de 3 a 4 µm de espessura, foram distribuídos nas lâminas, previamente tratadas com aminopropyltriethoxysilane (APTS) (Rentrop e cols., 1986), e deixadas na estufa, a 60° por 24 horas, para melhor adesão do corte. Os cortes foram desparafinizados com xilol a 60°C por 15 minutos e xilol à temperatura ambiente por 15 minutos, e a seguir foram hidratados tratando-se consecutivamente com: etanol a 99,8%, 3 banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos cada, e lavados em água corrente e água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, com três trocas de 10 minutos cada. Os cortes foram lavados em água corrente e água destilada e a seguir em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10mM, pH 7,4, por 5 minutos. A reação efetuada, e descrita a seguir, seguiu os princípios propostos pelo sistema EnVision desenvolvido pela Dako (Vyberg e Nielsen, 1998) e foi adaptada às nossas condições laboratoriais. A incubação das lâminas com os anticorpos monoclonais anti-*Leptospira* diluídos a 1/500, 1/1000 e 1/2000, foi feita por um período de 16 a 18 horas, a 4°C. A seguir foram feitas lavagens com tampão PBS pH 7,4,

com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada. Após incubação com o Sistema EnVision-Peroxidase, que inclui um polímero acoplado ao anticorpo anti- imunoglobulina de camundongo e à enzima, por 30 minutos a 37°C, e as três lavagens com tampão PBS, pH 7,4, de 3 a 5 minutos cada, foi feita a revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06% e dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS pH 7,4, em banho a 37°C por 5 minutos, em câmara escura. O produto final desta reação apresenta coloração acastanhada na região da célula em que ocorre a ligação do antígeno com o anticorpo primário. Após contra-coloração com hematoxilina, por 1 minuto, os cortes foram desidratados e montados para análise. Os controles negativos utilizados incluíram: a) incubação com PBS pH 7,4. b) eliminação do anticorpo primário, sendo em ambos efetuados todos os demais procedimentos imunohistoquímicos. Foi também experimentada uma reação imunohistoquímica com o monoclonal H7P1 previamente biotinilado e diluído 1/50 em tampão PBS pH 7,4 com soro-albumina bovina (BSA, Sigma) a 1,0% e NaN₃ 0,1%, seguida de revelação com avidina-peroxidase disponível comercialmente.

3.7 Ensaios desenvolvidos utilizando os monoclonais H7P1 e A12P4 produzidos.

3.7.1 ELISA indireto modificado

Nesta técnica, que aqui foi denominada ELISA indireta modificada, os monoclonais foram colocados (110µl/alvéolo) em microplacas de poliestireno (Corning, Nova York, EUA), de fundo

chato, ou similar, em tampão carbonato pH 9.6, para a captura de antígenos de leptospiros e depois utilizados na triagem de pacientes e grupos controles quanto à presença de anticorpos IgM específicos. Desta maneira o ensaio tem sua especificidade garantida na captura dos antígenos reconhecidos por estes monoclonais. Nesta prova, os anticorpos foram utilizados na proporção de 2,33/ 1, isto é, 70% de A12P4 (7µg/mL) e 30% de H7P1 (3µg/mL), e incubados por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS pH 7.2 e o bloqueio por 90min a 37°C, com 180µl/alvéolo de PBS contendo leite em pó desnatado a 5g%, as microplacas foram incubadas, por 90 min a 37°C, com 100µl do “pool” de antígenos, obtido por extração com zwittergent dos sorovares de leptospiros: icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M20, canícola Hond Utrecht IV, autumnalis Akiyami A, cynopteri 3522 C, grippotyphosa Moskva V, pomona Pomona e braziliensis, na concentração de 3µg de proteína/mL cada. Após as lavagens, por duas vezes, com PBS pH 7.2, procedeu-se a uma aplicação de formalina (1:15), a 2% por 2 horas, à temperatura ambiente. Após nova lavagem as microplacas foram secas a 40°C, e guardadas em sacos plásticos vedados em freezer a -20°C até o momento do uso. As microplacas foram utilizadas em diferentes períodos de estoque, isto é, após 10, 22 e 30 dias, 3 e 8 meses. As amostras séricas a serem analisadas (20 casos do grupo 2 com leptospirose e 5 do grupo controle) foram diluídas (1/50) em PBS, pH 7.2, contendo leite em pó desnatado a 1%, e incubadas nas microplacas previamente lavadas e bloqueadas (100µl/alvéolo) por 1 hora a 37°C. Após as lavagens com PBS pH 7,2, procedeu-se à incubação, por 1 hora a 37°C, com o conjugado anti- cadeia µ humana (anti- IgM humano, Serotec) marcado com peroxidase, diluído a 1:2000, determinada numa titulação prévia. As microplacas foram

lavadas por três vezes e 50µl de substrato (0,4 mg mL⁻¹ de o-phenilenediamino (OPD), da Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA, em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,012% de H₂O₂) foram adicionados a cada alvéolo. Depois de 10 min à temperatura ambiente, 50µl de H₂SO₄ 1M contendo 0,5% de sulfito de sódio foram adicionados a cada alvéolo para interromper a reação. A intensidade da cor amarela resultante foi medida em espectrofotômetro (Titertek Multiskan, MCC Flow Labs, Inc, Finlândia) no comprimento de onda de 492 nm. O “cutoff” é dado pelo valor da D.O. 2,1 vezes maior do que a D.O. do alvéolo controle (sem antígeno) (Ribeiro e cols. 1992a), realizado no mesmo dia, sob as mesmas condições. Se o índice de reatividade de um soro, calculado pela D.O. do soro em análise no alvéolo com antígeno dividida pela D.O. do “cutoff” for $\geq 1,0$, é considerado como teste positivo quanto à presença de anticorpos específicos. Outro parâmetro adotado na interpretação dos resultados, no presente estudo, estabelece que se a D.O. do alvéolo com antígeno deduzida da D.O. do alvéolo sem antígeno for $\leq$ a 0,09, o índice de reatividade do soro em análise é considerado negativo.

3.7.2 ELISA com captura de IgM humano Às microplacas de poliestireno (Corning, Nova York, EUA), de fundo chato, ou similar, foram adicionados 110µl de soro de coelho anti-µ humano (Dakopatts) na diluição de 1/500 em tampão carbonato, pH 9.6, sendo as placas deixadas por 18 horas a 4°C. A seguir foram feitas

as lavagens e os bloqueios como descrito acima. As placas foram subsequentemente incubadas com 100µl de soros humanos (12 casos do grupo 2 com leptospirose, e 3 do grupo controle), diluídos a 1/100 e a 1/200 em PBS, pH 7,2, contendo leite em pó desnatado a 1%, por 90 minutos. Após a lavagem, foram adicionados 100µl/alvéolo da mistura de antígenos, resultante do tratamento com zwittergent de quantidades iguais das oito cepas de leptospirosas mais frequentes em nosso meio, RGA, M20, autumnalis, canicola, cynopteri, hebdomadis, grippotyphosa e pomona, na concentração protéica final de 40µg/mL, sendo então incubadas por 1 hora a 37°C. A seguir adicionou-se 100µl da mistura dos anticorpos monoclonais, contendo 70% de A12P4 e 30% de H7P1, na concentração protéica de 10µg/mL em PBS contendo leite em pó desnatado a 1%, seguindo-se nova incubação por 90 min a 37°C. Após as 3 lavagens com PBS, pH 7,2, foram adicionados 100µl de anti-gamaglobulina de camundongo, marcada com peroxidase, na diluição de 1/5000, conforme titulação prévia. Após 1 hora de incubação a 37°C, revelou-se com OPD e procedeu-se à leitura e interpretação conforme descrito acima para o ELISA indireto.

3.7.3 Cromatografia de afinidade para a purificação dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais (“AgMc”)

Este procedimento utilizou a Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (Pharmacia Biotech) onde foram imobilizados os monoclonais conforme instruções do fabricante, i é, na proporção de 5mg de proteínas dos anticorpos monoclonais por mL de resina. A mistura dos dois anticorpos monoclonais, A12P4 e H7P1, na proporção de 2,6 : 1, respectivamente,

continha uma concentração final de proteínas de 4,1mg/mL, totalizando 17,3mg de proteínas num volume de 4,22mL.

Uma mistura de antígenos obtidos por extrações com zwittergent, dos seguintes sorovares (concentração de proteínas): icterohaemorrhagiae RGA (1,09mg/mL), copenhageni M20 (2,46mg/mL), grippotyphosa Moskva V (1,45mg/mL), canícola Hond Utrecht IV (2,39mg/mL), pomona Pomona (1,71mg/mL), autumnalis Akiyami A (2,61mg/mL), cynopteri 3522 C (3,27mg/mL) e braziliensis (2,50mg/mL), foi previamente dializado contra PBS pH 7,2, por 24 horas em membrana de diálise benzoilata (Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA), com limite de exclusão de PM > 2000. Com concentração protéica inicial de 2,06mg/mL, 25mL da mistura de antígenos foram colocados em contato com 3,46mL da Sepharose 4B acoplada aos monoclonais por 18 horas, com agitação suave a 37°C. Após a centrifugação a 2500 rpm por 5 min para sedimentar a resina, guardou-se o sobrenadante com as proteínas não retidas pela coluna. Procedeu-se às lavagens da resina com PBS, pH 7,2, por centrifugação. Em seguida, a resina suspensa em PBS, pH 7,2, foi empacotada em uma coluna de vidro pequena. Passou-se subsequentemente uma solução de PBS, pH 7,2, para equilibrar até que a leitura no espectrofotômetro (Hach DR 4000, Hach Company, EUA) no comprimento de onda (λ) de 280 nm ficou zerada. A seguir, eluiu-se a coluna com tampão glicina, pH 2,8, coletando-se as frações em tubos de diluição (~1mL/tubo) e neutralizando-as, imediatamente, com tampão tris 1M, pH 9,0. As absorvâncias dos eluatos nos tubos foram medidas em espectrofotômetro ($\lambda=280$ nm) selecionando-se as frações que apresentaram maiores leituras de D.O. Os eluatos de interesse foram reunidos em um "pool" que foi concentrado 10 a 20 vezes em saco de diálise em

kitassato adaptado para a concentração a vácuo. Analisou-se o material purificado, mencionado no presente estudo como antígenos obtidos com os monoclonais “AgMc”, em testes de “immunoblotting” e em provas de ELISA. Recuperou-se a coluna, procedendo-se a lavagens, por duas vezes, alternadamente com tampão NaHCO₃ 0,1M, pH 8,3, contendo 0,5M NaCl e tampão acetato 0,1M, pH 4,0, com NaCl 0,5M e a seguir lavou-se com PBS pH 7,2. A resina foi guardada, em geladeira, em PBS, pH 7,2, com azida sódica para ser reutilizada.

Para uma segunda purificação desses antígenos foi preparado um novo volume de 19mL da resina Sepharose 4B acoplada aos monoclonais, que foi colocado em contato com 20mL de um “pool” de extratos de zwittergente dos sorovares descritos acima, cuja concentração protéica foi de 1,31mg/mL.

3.7.4 ELISA indireto 1, utilizando o antígeno “AgMc” adsorvido a microplacas de poliestireno com tampão carbonato pH 9,6, para a pesquisa de anticorpos IgM

Microplacas de poliestireno (Corning, Nova York, EUA) foram sensibilizadas com 110µl/alvéolo do antígeno “AgMc”, na concentração de 3,75µg de proteínas/mL de tampão carbonato pH 9,6. Para o teste controle, foram colocados 110µl de tampão carbonato sem antígeno. As microplacas foram mantidas a 4°C, por 18 horas. Após lavagem das microplacas com PBS, pH 7,2, por duas vezes, procedeu-se ao bloqueio com 180µl/ alvéolo de PBS, pH 7,2, contendo leite em pó desnatado a 5% por 2 horas a 37°C. Após duas lavagens com PBS pH 7,2, foram colocados 100µl de cada soro suspeito nos alvéolos com e sem antígeno, na diluição de 1:50 em PBS, pH 7,2, contendo leite em pó desnatado a 1% e incubadas, por 2 horas, a 37°C. As mesmas

foram lavadas mais três vezes com PBS, pH 7,2, e a seguir incubadas, por 90 min, com soro anti-cadeia μ humana (anti-IgM humano) marcado com peroxidase (Serotec), diluído a 1:2000 em PBS contendo leite em pó desnatado a 1%, conforme titulação prévia. A reatividade dos soros foi revelada com a adição de OPD, e procedendo-se à leitura e interpretação dos resultados conforme descrito acima na técnica de **ELISA indireto modificado**, ou seja, foram calculados os valores de T- C, isto é, a diferença entre o valor da absorbância média do alvéolo contendo o antígeno (teste = T) e do alvéolo sem antígeno (controle = C) para cada amostra de soro. Foram também determinados os valores de T/ C, isto é, a razão do valor da absorbância média do alvéolo com antígeno (T) e do alvéolo sem antígeno (C) para cada amostra de soro.

Para a interpretação dos resultados foram comparados os valores de T-C e de T/ C de cada soro teste, com os valores de “cutoff”. Os valores de “cutoff” fixados para o nosso teste foram os seguintes:

$$T-C = 0,09$$

e $T/ C = 2,1$, conforme preconizado em Ribeiro e cols., 1992a.

Assim, somente valores acima de ambos os “cutoff” foram considerados positivos (+) e valores menores que pelo menos um dos “cutoff” foram considerados negativos.

3.7.5 ELISA indireto 2, utilizando antígeno “AgMc” adsorvido com etanol a microplacas de poliestireno, para a pesquisa de anticorpos IgM

Microplacas de poliestireno (Corning, Nova York, EUA) foram sensibilizadas nas fileiras A, C, E e G, com 2µl de antígeno puro “AgMc”, na concentração de cerca de 150µg/mL em etanol, por alvéolo, sendo a seguir adicionados 29µl de etanol absoluto.

Nas fileiras B, D, F, H foram colocados 31µl de etanol absoluto. As microplacas foram deixadas em estufa a 37°C até a completa evaporação do etanol. Duas lavagens foram efetuadas com PBS, pH 7,4, antes do bloqueio com PBS contendo leite em pó desnatado a 5% por 90 min a 37°C. Após 3 lavagens com PBS pH 7,4, foram adicionadas amostras séricas diluídas 1/100 em PBS contendo leite em pó desnatado a 1% e incubadas por 90 min a 37°C. Procedeu-se a nova lavagem das microplacas, 3 vezes com PBS, pH 7,4. A seguir as placas foram incubadas com 100µl/alvéolo do soro anti-cadeia µ humana (anti-IgM humano) marcado com peroxidase (Serotec), diluído a 1/2000 em PBS contendo leite em pó desnatado a 1%, conforme titulação prévia, e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens com PBS, pH 7,4, procedeu-se à revelação com OPD e à interpretação dos resultados conforme descrito no **ELISA indireto modificado**. O “cutoff”, para cada amostra teste, foi calculado multiplicando-se a D.O. do alvéolo sem antígeno por 2,1 e o resultado expresso em índice de reatividade (IR), i. e., D.O. amostra no alvéolo com antígeno/ D.O. “cutoff”. Quando esta relação foi maior do que 1, a amostra foi considerada positiva para a leptospirose. Nesta prova também foram considerados soros negativos aqueles em que a D.O. do alvéolo

com antígeno subtraída da D.O. do alvéolo sem antígeno tenha dado $\leq 0,09$.

3.7.6 ELISA indireto 2, utilizando antígeno “AgMc” adsorvido com etanol a microplacas de poliestireno, para a pesquisa de anticorpos IgG

Para se verificar se as respostas com anticorpos IgG a esses antígenos eram relevantes foi feita uma placa de ELISA nos mesmos moldes do item 3.7.5 onde o conjugado adicionado foi uma anti- cadeia α humana (anti-IgG humano) marcada com peroxidase e utilizada conforme titulação prévia. O ELISA foi realizado em 12 amostras de soros de pacientes com leptospirose do grupo 3 e em 12 casos de soros humanos normais do grupo controle. As diluições dos soros, os tempos de incubação e a interpretação dos resultados seguiram o protocolo descrito para a pesquisa do anticorpo IgM do ELISA indireto 2.

3.8 Controle de qualidade dos testes ELISA:

Para garantir um bom desempenho nos testes todos os procedimentos descritos abaixo foram observados:

1- A diluição dos reagentes foi feita de maneira idêntica em todos os testes.

2- Os tempos e temperaturas de incubação foram rigorosamente obedecidos.

3- Os reagentes do teste foram manipulados na maneira prescrita, de modo a minimizar os efeitos de congelamento e

descongelamento e da contaminação bacteriana. Os reagentes foram aliquotados em pequenos volumes

4- Um alto sinal de background espalhado pelos alvéolos da microplaca indicava que a lavagem não havia sido eficiente. Procedeu-se à repetição do teste.

5- Alto background em toda a microplaca indicava diluição errada dos reagentes ou contaminação bacteriana dos reagentes. Repetiu-se o teste.

6- Para se monitorar o desempenho dos ensaios desenvolvidos incluiu-se controles positivos, isto é, amostras séricas de pacientes com leptospirose e negativos, soros de indivíduos do grupo controle, em duplicata em cada microplaca.

7- Um registro constante de todos os controles foi mantido para se monitorar mudanças no desempenho do teste. O termo reprodutibilidade do teste aqui utilizado refere-se aos resultados repetitivos das duplicatas e de resultados de dois a quatro ensaios para a mesma amostra sérica.

3.9 Estudo em termos relativos dos índices sorológicos

Para a determinação da eficiência relativa do novo teste introduzido neste estudo nos grupos de pacientes e no grupo controle, foram calculados os índices relativos de sensibilidade (Sr) especificidade (Er), valores preditivos positivos e negativos (Vp+, Vp-), concordância (c) e falsos positivos e negativos (F+ e F-), de acordo com os conceitos preconizados por Buck & Gart (1966), Galen & Gambino (1975), e Griner e cols (1981).

Segundo esses conceitos, pode-se definir:

Sensibilidade (S) como a capacidade de um teste de revelar casos positivos numa população de portadores da afecção, e sua limitação se traduz nos resultados falsos negativos (F-) observados nos doentes.

Especificidade (E) como a capacidade de um teste de fornecer resultados negativos em indivíduos não portadores da afecção a que se destina determinar, e sua limitação se traduz nos resultados falsos positivos (F+) observados nos não doentes.

Concordância (C) como a proporção de concordância global dos resultados positivos e negativos obtidos no teste, em relação aos soros de indivíduos comprovadamente doentes e não doentes.

Valor preditivo do resultado positivo ou negativo como a probabilidade de um resultado positivo corresponder realmente a um indivíduo doente e um negativo a um não doente.

Para a seleção inicial de um teste de triagem destinado ao diagnóstico de uma determinada afecção, as qualidades S e E devem ser necessariamente determinadas, o que requer o conhecimento prévio do diagnóstico verdadeiro.

O diagnóstico verdadeiro por ser prática geralmente difícil e onerosa, nem sempre é disponível. Em tais casos, quando é impossível se avaliar um teste de triagem frente ao diagnóstico verdadeiro, é válido seu julgamento frente a um teste de referência, tomando seus resultados como indicativo ou não da doença (Buck & Gart, 1966); onde S e E se mantêm estáveis mesmo com a coexistência de outros fatores, como a presença

de outras doenças. Dessa forma, os índices sorológicos do teste de triagem passam a ser “relativos” aos de referência.

Abaixo encontra-se esquematizado o modelo preconizado pelos autores Buck & Gart (1966), Galen & Gambino (1975) e Griner e cols (1981),

Teste de referência	Teste em estudo		
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	a	b	a + b
Não Reagente	c	d	c + d
	a + c	b + d	a + b + c + d

Onde,

$$Sr = a / a + b$$

$$Er = d / c + d$$

$$Vp + = a / a + c$$

$$Vp - = d / b + d$$

$$F + = c / c + d$$

$$F - = b / a + b$$

$$C = a + d / a + b + c + d$$

Estes cálculos foram aplicados aos resultados obtidos com o teste novo desenvolvido neste estudo e são relativos aos resultados obtidos com o teste de referência na leptospirose, a soroaglutinação microscópica (SAM)

3.10 Método estatístico:

Com a finalidade de verificar se a proporção de indivíduos diagnosticados como casos de leptospirose (reagentes) pelos ensaios diagnósticos era diferente da prova de SAM, completou-se a análise aplicando-se o teste de McNemar como descrito por Fleiss, 1981. O valor do X^2 crítico, com um grau de liberdade, para um nível de significância de $P \leq 0,05$ é de 3,84. Desde que o valor do X^2 obtido seja maior que 3,84, pode-se inferir que os testes diferem estatisticamente

4 RESULTADOS

Os anticorpos monoclonais, produzidos no presente estudo, foram analisados quanto às suas reatividades contra painéis de antígenos de diferentes sorovares de leptospiros por meio das provas de ELISA, com antígenos obtidos com extratos de zwittergent, do “immunoblotting” e da prova de SAM que estão discriminados no Quadro 1. Este quadro também mostra os sorovares presentes na composição das misturas antigênicas utilizadas em alguns ensaios que foram desenvolvidos ao longo deste estudo, no ELISA indireto modificado e na cromatografia de afinidade.

Quadro 1- Painei de diferentes sorovares de leptospiaras utilizados nos ensaios de ELISA com antígenos obtidos por extração com zwittergent (A), no “immunoblotting” (B), na prova de SAM (C) e no ELISA clássico (D), bem como os participantes de “pool” de antígenos empregados nos ensaios desenvolvidos como o ELISA indireto modificado (E) e na cromatografia de afinidade (F). √= sorovar incluído

Sorovares	A	B	C	D	E	F
1.Icterohaemorrhagiae RGA	√	√	√	√	√	√
2.Copenhageni M20	√	√	√		√	√
3. Grippotyphosa Moskva V	√		√		√	√
4. Canicola Hond Utrecht IV	√	√	√	√	√	√
5. pomona Pomona	√		√		√	√
6. bataviae van Tienen	√		√			
7. australis Ballico	√		√			
8. pyrogenes Salinem	√		√			
9. tarassovi Miti Johnson	√		√			
10. andamana CH11	√		√			
11. autumnalis Akiyami A	√		√		√	√
12. shermani LT- 821	√		√			
13. wolfii 3705	√		√			
14. javanica Veldrat Bataviae 46	√		√			
15. panama CZ-214 k	√		√			
16.hebdomadis Hebdomadis	√		√	√		
17.celledoni celledoni			√			
18. castelonis Castellon 3	√		√			
19. patoc Patoc I	√		√			
20. butembo Butembo	√		√			
21. cynopteri 3522	√		√	√	√	√
22. djasiman Djasiman	√		√			
23. Hardjo Pratino	√					
24. braziliensis	√			√	√	√

4.1. Reatividade dos monoclonais obtidos na primeira fusão: H7P1 e B9P8.

Os monoclonais H7P1 e B9P8 foram analisados nas provas de “immunoblotting” (IB), soroaglutinação microscópica (SAM) e no ELISA com os antígenos tratados com zwittergent (ELISA) contra os antígenos referidos no Quadro 1. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Reatividade dos monoclonais H7P1 e B9P8 nas provas de “immunoblotting” (IB), soroaglutinação microscópica (SAM) e no ELISA com antígenos tratados com zwittergent (ELISA)

Ensaio\Sorovar		RGA	copenhageni	canicola e outros
H7P1	IB (bandas*)	21,23,28,34,68,128	21,5- 22; 75- 82	nr
	SAM (título 1:)	102 400	100	nr
	ELISA** (D.O./C.O.)	0,940/ 0,043	nr	nr
B9P8	IB (bandas*)	18,22,28,128	nr	nr
	SAM 1:	51 200	3200	nr
	ELISA** (D.O/ C.O.)	0,326/0,043	nr	nr

nr= não reativo; * perfil difuso de inúmeros pesos moleculares (PM) incluindo-se as bandas de PM referidos, **Para a pesquisa de anticorpos IgM. D.O.=Densidade ótica e C.O.= “cutoff” .

Nesta primeira fusão, os anticorpos monoclonais obtidos mostraram reatividade com perfil semelhante, exclusivo para o sorogrupo icterohaemorrhagiae. O monoclonal H7P1, uma imunoglobulina classe IgG, mostrou ser o mais reativo em todas as provas sendo, portanto, escolhido para dar prosseguimento aos estudos.

4.2. Reatividade dos anticorpos monoclonais obtidos na segunda fusão: A12P4; B9P1; D10P1; E10P3; F12P5.e F12P7

Dos monoclonais obtidos na segunda fusão os monoclonais B9P1 e E10P3 reagiram inespecificamente contra a microplaca de poliestireno sem antígeno e o F12P5 não se caracterizou como anticorpo monoclonal após a precipitação com ácido caprílico sendo portanto excluídos deste estudo.

Os anticorpos D10P1, A12P4 e F12P7 foram negativos na prova de SAM contra todos os sorovares utilizados na rotina, até a diluição de 1: 638400, quando se excluiu o fenômeno de prozona. As reatividades desses monoclonais na prova de “immunoblotting” e no ELISA com extratos de zwittergent encontram-se nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 Frações antigênicas reconhecidas pelos monoclonais da segunda fusão nos “immunoblotting” contra os antígenos dos sorovares icterohaemorrhagiae RGA, copenhageni M20 e canícola Hond Utrecht IV.

Sorovares\Monoclonal	A12P4	D10P1	F12P7
Icterohaemorrhagiae RGA	16- 18 kDa (+)	16- 18 kDa (+)	16-18 kDa (<u>±</u>)
Copenhageni M-20	16-18 kDa	16- 18 kDa	
	75- 80 kDa (<u>±</u>)	75- 80 kDa(+)	
Canícola Hond Utrecht IV	77- 84 kDa (+)	79-84 kDa (+)	79-84 kDa (<u>±</u>)

Obs: Intensidade de reação das bandas : baixa(+), média (++) e fraca (±).

O estudo do monoclonal F12P7 foi abandonado nesta etapa, pois apresentou uma reatividade semelhante à do D10P1, contra os sorovares icterohaemorrhagiae e canícola, porém menos intensa, e não foi reativo com copenhageni.

Tabela 6- Reatividade dos monoclonais A12P4 e D10P1 contra extratos de zwittergent dos sorovares de leptospiros bem como de *P falciparum* e *T pallidum* na prova de ELISA.

Código N°	Sorovares/ agentes etiológicos	Monoclonal A12P4	Monoclonal D10P1
1	Icterohaemorrhagiae RGA	++	+
2	Copenhageni M20	++++	+++
3	Grippotyphosa MoskvaV	++++	++++
4	Canicola Hond Utrecht IV	+++	+
5	Pomona Pomona	+	Neg
6	Bataviae van Tienen	++	+
7	Australis Ballico	++	Neg
8	Pyrogenes Salinem	+	Neg
9	Tarassovi Miti Johnson	+	Neg
10	Andamana CH 11	Neg	Neg
11	Autumnalis Akiyami A	++++	+++
12	Shermani LT- 821	+	+
13	wolffi 3705	Neg	Neg
14	Javanica Veldrat Bataviae 46	Neg	Neg
15	Panama CZ-214 k	++	+
16	Hebdomadis Hebdomadis	++	+
18	Castelonis Castellon 3	Neg	Neg
19	patoc Patoc Patoc I I	Neg	Neg
20	Butembo Butembo	++	Neg
21	Cynopteri 3522 C	++++	++++
22	Djasiman Djasiman	Neg	Neg
23	Hardjo Pratino	Neg	Neg
24	Braziliensis	+	Neg
-	<i>P. falciparum</i>	Neg	Neg
-	<i>T. pallidum</i>	Neg	Neg

+, ++, +++ e ++++ = D.O amostra respectivamente de 4, 7, 10 e ≥ 14 vezes superior ao D.O. do "cutoff". (D.O. da cavidade com antígeno 2,1 X acima da D;O. da cavidade sem antígeno)

O monoclonal D10P1, caracterizado como uma IgM, foi preterido nesta etapa, por apresentar reatividade menos satisfatória do que o monoclonal A12P4.

Portanto, os anticorpos monoclonais escolhidos para continuar a pesquisa foram o H7P1, da primeira fusão e o A12P4, da segunda fusão.

O monoclonal H7P1 identificou um epítopo sorogrupo-específico, pois no ELISA, com antígenos obtidos de vários sorovares com tratamento com zwittergent, apresentou reatividade somente para RGA, e na prova de SAM, apresentou título positivo para RGA (título 1/102 400) e para M20 (título 1/100). Por sua vez, o monoclonal A12P4, uma IgG2b kappa, foi não-aglutinante contra os 22 sorovares hoje utilizados na bateria de rotina da SAM. Na prova de ELISA foi reativo contra extrações de zwittergent de 16 dos 23 sorovares utilizados (Tabela 6).

4.3 Reatividade dos antígenos “AgMc” purificados na coluna de cromatografia

Para verificar se os antígenos “AgMc”, i é, purificados a partir de Sepharose 4B ativada com CNBr ligada aos monoclonais H7P1 e A12P4, ainda apresentavam reatividade com anticorpos IgM de pacientes com leptospirose após o processo de purificação, foi feito o “immunoblotting” destes antígenos. Verificou-se uma reatividade baixa com a banda de peso molecular entre 15- 15,2 kDa próxima à banda de “LPS-like” de 15,5 a 18,5 kDa. Quando esses antígenos foram revelados com o monoclonal H7P1 foram observadas duas bandas: de 20,5 a 23 kDa e de 24,8 a 26 kDa (mais fraca). Com o monoclonal A12P4 não foi observada nenhuma banda.

Como os perfis de immunoblotting obtidos na prática apresentaram reatividade muito fraca optou-se por uma representação esquemática dos mesmos para melhor visualização dos resultados (**Figura 1**)

Figura 1. "Immunoblottings" esquemáticos dos extratos dos sorovares icterohaemorrhagiae RGA (fitas A, D e I); copenhageni M20 (fitas B e E) e canicola Hond Utrecht IV (Fitas C e F) com os anticorpos monoclonais: H7P1 (fitas A, B e C) e A12P4 (fitas D, E e F)

"Immunoblotting" do serovar icterohaemorrhagiae RGA com IgM de paciente com leptospirose (fita I)

"Immunoblotting" do antígeno purificado AgMc com o H7P1 (Fita G) e com IgM de paciente com leptospirose (Fita H)

A esquerda, o perfil dos pesos moleculares de referência da Pharmacia em kDa.

4.4. Análise imuno-histoquímica empregando-se os anticorpos monoclonais H7P1, B9P8 e A12P4.

Para se verificar se os epítomos reconhecidos pelos monoclonais podiam ser detectados nos tecidos hepáticos de cobaias infectadas com a leptospira, foram feitas análises imuno-histoquímicas. Verificou-se que antígenos foram evidenciados pelos anticorpos monoclonais obtidos na primeira fusão, H7P1 e B9P8, em fígado de cobaia no 6º dia da infecção, predominantemente ligados à membrana dos hepatócitos, com o mesmo padrão de reconhecimento, porém de forma mais tênue, ao obtido com os anticorpos humanos produzidos na vigência da infecção natural com leptospiros.(Ribeiro e cols, 1999 a, b e c) **(Figuras 2 e 3).**

Na tentativa de melhorar a sensibilidade da reação imuno-histoquímica, foi feito o tratamento prévio do monoclonal H7P1 com a biotina. Contudo, esse procedimento não tornou a técnica mais sensível na sua capacidade de evidenciar os antígenos.

O mesmo procedimento feito com o anticorpo monoclonal A12P4, obtido na segunda fusão, mostrou que esse monoclonal não é adequado para ser empregado em análises imuno-histoquímicas, pois muitas reações de fundo ficaram evidentes quando do uso deste.

Figura 2- Antígenos de leptospiros detectados por anticorpos IgM de pacientes com leptospirose no fígado de cobaia infectada experimentalmente empregando-se a técnica imunohistoquímica (SABP X 200)

Figura 3- Antígenos de leptospiros detectados por anticorpos IgM de paciente com leptospirose no fígado de cobaia infectada experimentalment empregando-se a técnica imunohistoquímica (SABP X 400)

4.5. Resultados dos ensaios padronizados a partir dos monoclonais produzidos neste estudo (H7P1 e A12P4) ou, com o uso dos produtos derivados destes (“AgMc”).

4.5.1 ELISA Indireto modificado. Nesta técnica uma mistura dos dois monoclonais, H7P1 e A12P4, foi colocada em microplacas de poliestireno para selecionar e capturar os antígenos específicos de um “pool” de extratos de zwittergent de vários sorovares.

Após essa sensibilização, o teste foi aplicado inicialmente nos 20 pacientes com leptospirose do grupo 2 (total de 40 amostras) e em 5 casos do grupo controle, para a pesquisa de anticorpos IgM específicos.

Os resultados obtidos a cada nova sensibilização não se reproduziam quando o “pool” de antígenos extraídos com o zwittergent era estocado por alguns dias a -20 °C. Para contornar esse problema, um tratamento com a formalina, logo após a captura do antígeno, foi experimentado para melhorar a estabilidade do reagente. Observou-se uma aparente melhora na estabilidade das microplacas que, desta forma, puderam ser estocadas por até 3 meses, sem modificação na sua reatividade. Este teste quando aplicado às 5 amostras do grupo controle forneceu resultados negativos, porém quando aplicado no grupo de pacientes os resultados foram inconsistentes em 11 de 40 amostras analisadas, sendo o teste ora positivo, ora negativo, nas duplicatas em até 4 repetições (**Tabela 7**). Um teste realizado após 8 meses de estoque mostrou que essas microplacas, mesmo com o tratamento com a formalina, tiveram as suas reatividades bastante prejudicadas.

4.5.2 ELISA de captura com anti-IgM humana. Nesta prova além do problema da constante necessidade do “pool” de antígenos de leptospirosas tratadas com zwittergent, havia a baixa sensibilidade do teste, i. e., somente 5 casos de leptospirose estariam sendo detectados dentre os 12 experimentados do grupo 2 (**Tabela 7**). Três amostras do grupo controle analisadas não apresentaram reatividade no teste.

4.5.3 ELISA indireto 1, utilizando o antígeno “AgMc” adsorvido com tampão carbonato pH 9,6, para a pesquisa de anticorpos IgM.

Quanto às provas de ELISA em que foram utilizados os antígenos purificados nas colunas de Sepharose acopladas aos monoclonais (“AgMc”), observou-se que quando estes foram fixados às placas com tampão carbonato pH 9,6 (**ELISA Indireto 1**) a resposta ficava no limiar de reatividade e era variável (#), i. é, com resultados ora positivo, ora negativo, em 6 de 40 amostras analisadas do grupo 2 de pacientes com leptospirose, resultado não apresentado nas Tabelas.

Suspeitando-se de baixa reatividade do “AgMc” experimentou-se novas interpretações mais abrangentes para o teste. Assim, adotou-se como positivo a amostra cuja D.O. do alvéolo com antígeno era de 1,5 vezes a D.O. do alvéolo sem antígeno.

Quando da análise do grupo controle, adotando-se a nova interpretação, os resultados não foram satisfatórios apresentando muitos falsos-positivos (13 casos de 22 casos analisados, dado não apresentado em Tabela).

4.5.4 ELISA indireto 2, utilizando o antígeno “AgMc” adsorvido com etanol, para a pesquisa de anticorpos IgM.

A fixação do antígeno “AgMc” às microplacas de poliestireno utilizando etanol como diluente, à semelhança do procedimento usado com os antígenos PK-resistentes (**ELISA Indireto 2**), apresentou-se como uma prova mais estável, com resultados mais promissores. Assim, somente esta técnica foi estudada comparativamente com os demais testes já disponíveis em nosso meio, com soros de pacientes com leptospirose e do grupo controle. Algumas amostras ainda apresentaram instabilidade de resposta (#) (4 de 40 amostras do grupo 2 de pacientes) como pode ser verificado nas **Tabelas 8, 9 e 10** onde se encontram os resultados obtidos com as amostras séricas dos pacientes com leptospirose, dos grupos 2, 1 e 3, respectivamente, e nas **Tabelas 11 e 12** onde são apresentados os resultados obtidos com os pacientes do grupo controle.

Anticorpos IgM contra os antígenos purificados “AgMc”, foram evidenciados a partir do 13º dia da doença até o dia 196º, após o início dos sintomas, nos casos dos pacientes com Doença de Weil (**Tabela 10**). Em alguns casos, porém, o resultado foi inconclusivo já no 33º dia. O índice de reatividade (D.O. amostra/ “cutoff”) observado no acompanhamento da infecção pode, algumas vezes, sofrer um leve aumento até o segundo mês após o início dos sintomas e tende a ficar negativo nos meses subsequentes.

No grupo controle, 16,8% (21/125) das amostras foram positivas no novo teste (ELISA indireto 2) com o antígeno purificado “AgMc” (**Tabelas 11 e 12**). Somente um caso foi

positivo também nas provas de PK-ELISA, ELISA clássico e SAM (**Tabela 11**).

Quando anticorpos IgG contra os antígenos “AgMc” foram determinados em 12 amostras dos pacientes do grupo 3 (**Tabela 10**) e em 12 amostras de casos do grupo controle (**Tabela 11**), verificou-se que esta resposta nem sempre estava presente, como costuma acontecer com o perfil de IgG, de uma maneira geral, na leptospirose.

A distribuição dos pacientes, segundo as conclusões diagnósticas, obtidas nas provas de ELISA com antígenos “AgMc” (ELISA indireto 2) comparados aos resultados obtidos com antígenos sonificados do ELISA clássico e com a prova de SAM, após o fechamento diagnóstico definitivo, encontra-se na **Tabela 13**. Os valores de sensibilidade e especificidade, obtidos no novo ensaio aqui produzido, foram de 86,54% e 83,20%, respectivamente. Já o ELISA clássico e a prova de SAM, aplicados aos mesmos grupos de pacientes e controles, apresentaram 92,30% e 86,40%, e 100% e 96%, de sensibilidade e especificidade, respectivamente. (**Tabela 13**)

Os índices sorológicos relativos ao teste de referência, a soroaglutinação microscópica (SAM), calculados para o novo teste de ELISA “AgMc” quando aplicado aos 52 pacientes dos grupos 1 e 2, e aos 125 casos do grupo controle, encontram-se na **Tabela 14**. Esses índices, descritos a seguir, podem ser comparados aos obtidos com a prova de ELISA clássico (valores entre parênteses) quando da análise das mesmas amostras

séricas. Sensibilidade relativa (Sr) de 80,70% (87,72%); Especificidade relativa (Er) de 83,33% (87,50%); Valor preditivo positivo (Vp+) de 69,70% (76,92%); Valor preditivo negativo (Vp-) de 90,10% (93,75%); Falsos positivos (F+) de 16,67% (12,50%); Falsos negativos (F-) de 19,30% (12,28%) Índice de concordância (C) de 82,49% (87,57%).

O cálculo estatístico do teste de McNemar mostrou haver discordância significativa entre os resultados obtidos com o novo teste ELISA "AgMc" e a prova de SAM quando do fechamento diagnóstico do grupo de pacientes com leptospirose (**Tabela 15**). O valor do X^2 obtido para o ELISA "AgMc" foi de 5,14, enquanto o X^2 crítico, para um grau de liberdade, a nível de $P < 0,05$, era de 3,84.

Quando se analisou o conjunto de resultados obtidos com a prova de ELISA clássico (ELISAc) em relação aos resultados da prova de referência SAM, o valor do $X^2 = 2,25$ não foi discordante, como mostra a Tabela 15, para o mesmo X^2 crítico.

Tabela 7 Resultados obtidos em amostras séricas pareadas de pacientes com leptospirose (Grupo 2) nas provas de ELISA indireto modificado (A) no ELISA de captura de IgM humano (B); no ELISA clássico (C) e na prova de Sorreglutinação Microscópica (SAM).

1a am	A*	B**	C***	SAM	2a am	A	B	C	SAM-2a amostra
1	1,6	neg	neg	NM	1	1,0 #	neg	4,51	11=1=1600,2=800,7=100
2	1,5 #		1,74	NM	2	1,2		5,69	1=6400,2=3200,11=1600,7=800,21=200, 4=17=100
3	1,4		227	NM	3	1,2		5,79	18=12800,1=21=400,16=800,4=200
4	1,6	neg	neg	NM	4	1,32 #	1	6,08	2=12800,1=6400,11=1600,7=400,16=21=100
5	1,1 #	neg	neg	NM	5	1,5 #	1	6,37	18=25600,4=3200,8=9=1600,1=400, 16=200
6	neg	neg	neg	NM	6	1,3	neg	4,36	2=12800,11=1600,1=800, 16=100
7	1,1 #		1,09	NM	7	1,1		3,7	13=1600,16=400
8	1,2 #		neg	NM	8	1,7		5,93	2=3200,11=1600,18=800,1=4=200,7=17=21=100
9	neg	neg	neg	NM	9	1,41	neg	5,9	11=3200,2=400,1=16=100
10	1,1		225	NM	10	1,56 #		5,13	21=6400,1=11=3200,2=1600
11	neg	1	neg	NM	11	1,1	neg	6,41	2=6400,1=1600,11=200
12	1,2 #		1,53	NM	12	1,2		6,14	11=25600,1=2=6400,7=1600,16=21=800, 4=200
13	1,04 #		neg	NM	13	1,6		5,87	1=2=800,11=16=200
14	1,4		neg	NM	14	1,33		6,25	8=18=6400,4=9=3200,17=21=100
15	1,1	neg	1,24	NM	15	neg	1,14	6,08	2=12800,11=1=6400,7=1600,16=400, 13=100
16	neg	neg	neg	NM	16	neg	neg	1,92	1=2=200, 11=100
17	neg	neg	neg	NM	17	1,04 #	neg	5,41	1=6400,2=1600,7=21=200,6=100
18	neg	neg	neg	NM	18	1,27	neg	4,77	2=800,4=16=18=400,1=200
19	neg	neg	neg	NM	19	1,5	1,2	5,28	2=6400,1=1600,7=11=800,16=100
20	neg	neg	neg	NM	20	1	neg	3,15	1=2=3200,4=1600,7=200,11=100

* ELISA de captura com 70% de H7P1 e 30% de A12P1. Cutoff=DO do alvéolo sem antígeno X 2,1. Resultado expresso em Índice de Realidade (IR)= DO do alvéolo com antígeno / DO do cutoff. Acima de 1,0 é considerado positivo. Soro teste diluído a 1/50

** Captura com soro de coelho anti-IgM humano. Resultado expresso em IR. Acima de 1,0 é positivo. Soro 1/200.

*** ELISA clássico, cutoff= média de 8 soros controles (4 normais e 4 outras patologias) + 3 desvios padrões. Resultado expresso em IR. Acima de 1,0 é considerado positivo

NM, amostra (am) com prova de SAM negativa e com solubilização de novo material.

SAM, título 1:100 é reagente para leptospirose. Resultado expresso com o número da cepa e o título de aglutinina correspondente

#, instabilidade de resposta, i é, resultados que ora deram positivo, ora negativo em pelo menos 4 repetições do teste.

Tabela 8 Resultados obtidos em amostras pareadas de 20 pacientes com leptospirose (Grupo 2) nas provas de ELISA com antígenos obtidos com os anticorpos monoclonais (AgMc), com antígenos pK-resistentes (PK-ELISA), com antígenos totais sonicados (ELISA clássico- ELISA c) e na prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM).

1a am	AgMc*	PK-ELISA**	ELISA c***	SAM	2a am	AgMc*	PK-ELISA**	ELISA c***	SAM – 2a amostra
1	neg	neg	neg	NM	1	neg	1,1	4,51	11=1=1600,2=800,7=100
2	1,02#	neg	1,74	NM	2	1,2	1,89	5,69	1=6400,2=3200,11=1600,7=800,21=200, 4=17=100
3	1,5	neg	2,27	NM	3	1,38#	3,64	5,79	18=12800,1=21=400,16=800,4=200
4	neg	neg	neg	NM	4	1,78	4,92	6,08	2=12800,1=6400,11=1600,7=400,16=21=100
5	neg	neg	neg	NM	5	1,63	9,15	6,37	18=25600,4=3200,8=9=1600,1=400, 16=200
6	neg	neg	neg	NM	6	1,13	5,02	4,36	2=12800,11=1600,1=800, 16=100
7	neg	neg	1,09	NM	7	1,31	1,55	3,7	13=1600,16=400
8	neg	neg	neg	NM	8	1,23	6,99	5,93	2=3200,11=1600,18=800,1=4=200,7=17=21=100
9	neg	neg	neg	NM	9	2,27	6,05	5,9	11=3200,2=400,1=16=100
10	1,04	3,71	2,25	NM	10	1,21	10,09	5,13	21=6400,1=11=3200,2=1600
11	neg	neg	neg	NM	11	neg	7,39	6,41	2=6400,1=1600,11=200
12	1,13	neg	1,53	NM	12	1,25	2,86	6,14	11=25600,1=2=6400,7=1600,16=21=800, 4=200
13	neg	neg	neg	NM	13	1,74	6,48	5,87	1=2=800,11=16=200
14	neg	neg	neg	NM	14	1,11	2,01	6,25	8=18=6400,4=9=3200,17=21=100
15	neg	neg	1,24	NM	15	1,52	5,89	6,08	2=12800,1=11=6400,7=1600,16=400, 13=100
16	neg	neg	neg	NM	16	neg	neg	1,92	1=2=200, 11=100
17	neg	neg	neg	NM	17	1,18#	7,59	5,41	1=6400,2=1600,7=21=200,6=100
18	neg	neg	neg	NM	18	1,3	4,24	4,77	2=800,4=16=18=400,1=200
19	neg	neg	neg	NM	19	1,48	8,22	5,28	2=6400,1=1600,7=11=800,16=100
20	neg	neg	neg	NM	20	1,35#	1,46	3,15	1=2=3200,4=1600,7=200,11=100

* ELISA com antígeno em etanol, cutoff =DO do alvéolo sem antígeno X 2,1. Resultado expresso em Índice de Reatividade (IR)= DO do alvéolo com antígeno/ DO do cutoff. IR > 1,0 é considerado positivo.

** PK ELISA, cutoff= média de 4 soros controles + 3 desvios padrões. Resultado expresso em IR. Acima de 1,0 é positivo

*** ELISA clássico, cutoff= média de 8 soros controles (4 normais e 4 outras patologias) + 3 desvios padrões. Resultado expresso em IR. IR > 1,0 é positivo

NM, amostra (am) com prova de SAM negativa e com solicitação de novo material.

SAM, título 1:100 é reagente para leptospirose. Resultado expresso com o número da cepa e o título de aglutinina correspondente

#, resultados que ora deram positivo, ora negativo em pelo menos quatro repetições do teste.

Tabela 9 Resultados obtidos em amostras pareadas de 32 pacientes com leptospirose (Grupo 1) nas provas de ELISA com antígenos obtidos com os anticorpos monoclonais (AgMc), na Aglutinação macroscópica (SAT), no ELISA clássico com antígenos sonicados (ELISA c) e na Soroaglutinação microscópica (SAM)

1a am	AgMc*	SAT	ELISA c**	SAM	2a am	AgMc	SAT	ELISA c	SAM –2a amostra
21	+	neg	+	NM	21	+	+	+	2=6400
22	+	+	+	NM	22	+	+	+	2=3200
23	neg	+	+	NM	23	+	+	+	1=2=3200
24	neg	+	neg	NM	24	+	+	+	11=12800
25	neg	neg	neg	NM	25	+	+	+	1=12800
26	neg	+	+	NM	26	neg	+	+	1=1600
27	neg	neg	neg	NM	27	+	+	+	1=25600
28	+	neg	neg	NM	28	+	+	+	2=12800
29	+	+	+	NM	29	+	+	+	3=800
30	+	neg	+	NM	30	+	+	+	1=2=25600
31	neg	neg	neg	NM	31	+	+	+	1=2=1600
32	+	+	+	NM	32	+	+	+	2=25600
33	neg	neg	neg	NM	33	neg	+	+	1=1600
34	neg	neg	neg	NM	34	+	+	+	1=12800
35	neg	neg	neg	NM	35	+	+	+	11=3200
36	neg	inc.	+	NM	36	neg	+	neg	inconclusivo (inc.) =800
37	+	+	+	NM	37	+	+	+	2=25600
38	neg	neg	neg	NM	38	+	+	+	2=12800
39	neg	+	+	NM	39	+	+	+	11=3200
40	neg	neg	neg	NM	40	+	+	+	1=1600
41	neg	neg	+	NM	41	+	+	+	2=3200
42	+	neg	neg	NM	42	+	+	+	2=12800
43	neg	neg	neg	NM	43	+	+	neg	1=2=800
44	+	+	+	NM	44	+	+	+	16=3200
45	+	neg	neg	NM	45	+	+	neg	1=51200
46	neg	neg	neg	NM	46	+	+	+	2=12800
47	+	neg	neg	NM	47	+	+	+	1=2=800
48	+	+	+	NM	48	+	+	+	1=800
49	+	+	neg	NM	49	+	+	neg	1=2=1600
50	neg	neg	neg	NM	50	neg	neg	neg	11=800
51	+	+	+	NM	51	+	+	+	1=400
52	+	neg	neg	NM	52	+	neg	+	11=6400

* ELISA Indireto 2, com antígeno AgMc fixado em etanol. Cutoff= DO do alvéolo sem antígeno X 2,1.

* + = Índice de reatividade, i é, DO do alvéolo com antígeno /DO cutoff, maior do que 1,0

** ELISA clássico, cutoff= média de 8 soros controles (4 normais e 4 outras patologias) + 3 desvios padrões

** + = positivo= Índice de reatividade maior do que 1,0; neg= negativo

NM= SAM negativa na amostra (am) com solicitação de novo material

SAM, amostra com título $\geq 1:100$ é reagente. Resultado com o código do serovar e a aglutinina correspondente

Tabela 10 Presença de anticorpos nas amostras séricas de pacientes com Doença de Weil (Leptospirose, grupo 3) nas provas de ELISA com antígenos AgMc, no imunoblotting, no PK-ELISA e na soroaglutinação microscópica (SAM) segundo o número de dias após o início dos sintomas da doença.

Paciente	Dia de doença	IgM anti-AgMc*	IgG anti-AgMc*	Imunoblotting**	PK - ELISA***	SAM****
caso 1	19o	1,87	nr	+	+	1=3200, 2=3200, 16=800
	38o	1,12	nr	+	+	1=6400, 2=12800, 4=200
	109o	neg	nr	+	+	1=1600, 2=1600
	150o	neg	nr	+	+	1=800, 2=800
	189o	neg	nr	+	+	1=400, 2=400
	239o	neg	nr	+	+	1=1600, 2=1600
caso 2	33o	1,02	nr	+	+	1=1600, 2=3200 4=800
	68o	neg	nr	+	+	1=1600, 2=1600, 4=400
caso 3	13o	1,54	nr	+	+	1=400, 2=200
	29o	1,59	nr	+	+	1=12800, 2=6400
	50o	1,62	nr	+	+	1=12800, 2=6400
	127o	1,01	nr	+	+	1=3200, 2=1600
caso 4	33o	1,13 e neg	nr	+	+	1=800, 2=800, 5=400
	96o	neg	nr	+	+	1=200, 5=200
	201o	neg	nr	+	+	1=200, 2=200, 5=100
caso 5	16o	1,69	nr	+	+	1=3200, 2=3200, 5=200
	45o	1,45	nr	+	+	1=1600, 2=3200, 4=200
caso 6	40o	1,27	nr	+	+	1=12800, 2=51200, 4=1600
	68o	2,00 e neg	nr	+	+	1=3200, 2=6400, 4=200
	108o	1,59	nr	+	+	1=3200, 2=1600
caso 7	25o	1,24	neg	+	+	1=100, 2=800, 4=200
	45o	1,22	neg	+	+	1=12800, 2=12800, 4=800
caso 8	35o	1,19	1,75	+	+	1=12800, 2=12800, 4=400
	63o	1,73	1,08	+	+	1=3200, 2=3200, 4=100
	98o	1,84	1,04	+	+	1=1600, 2=800
caso 9	22o	1,69	neg	+	+	1=25600, 2=3200, 4=3200
	42o	1,64	neg	+	+	1=25600, 2=52800, 4=3200
	77o	1,45	neg	+	+	1=6400, 2=12800, 4=3200
	105o	neg	nr	+	+	1=6400, 2=3200, 4=400
caso 10	13o	1,53	neg	+	+	1=6400, 2=12800, 4=200
	53o	2,06	neg	+	+	1=1600, 2=1600,
	75o	1,13	neg	+	+	1=1600, 2=1600
	119o	1,69	neg	+		1=400, 2=800
caso 11	63o	1,51	nr	+	+	1=3200, 2=1600, 4=400
	196o	2,39	nr	+	+	1=1600, 2=1600
caso 12	33o	1,53	nr	+	+	1=3200, 2=6400
	61o	1,3	nr	+	+	1=3200, 2=6400
	124o	neg	nr	+	+	1=400, 2=400

* Índice de reatividade (DO amostra/DO cutoff), quando maior que 1 é positivo

** Reatividade contra os componentes da banda de PM de 15 a 22kDa no perfil de imunoblotting com serovar copenhageni M20, conforme Ribeiro e cols 1997

*** IgM anti-pK antígenos

**** Código do serovar= título da aglutinina

nr = exame não realizado

Tabela 11- Resultados das provas de ELISA com antígenos AgMc, PK-ELISA (PK), ELISA clássico (ELISAc) e de Soroaglutinação microscópica (SAM) no grupo de soros humanos normais (SHN).

SHN n ^o	AgMc*	PK *	ELISA c*	SAM	SHN n ^o	AgMc*	PK*	ELISA c*	SAM
1	neg	neg	neg	neg	35	1,19 **	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	36	neg	neg	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	37	neg **	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	38	neg **	neg	1,74	neg
5	neg	1,25	1,01	neg	39	neg **	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	40	neg	1,08	1,63	neg
7	neg	neg	neg	neg	41	neg **	neg	1,04	neg
8	1,01	neg	neg	neg	42	neg	neg	neg	neg
9	neg	neg	neg	neg	43	neg **	neg	1,26	neg
10	neg	neg	neg	neg	44	neg **	neg	neg	neg
11	neg	neg	1,94	neg	45	neg	neg	neg	neg
12	neg	1,52	1,72	neg	46	neg	neg	neg	neg
13	neg	neg	neg	neg	47	neg	neg	neg	neg
14	neg	neg	neg	neg	48	1,35 **	neg	1,63	neg
15	neg	neg	neg	neg	49	neg	neg	neg	neg
16	neg	neg	neg	neg	50	neg **	neg	neg	neg
17	neg	neg	neg	neg	51	1,13 **	neg	neg	neg
18	neg	neg	2,2	neg	52	neg **	neg	neg	neg
19	neg	neg	neg	neg	53	neg	neg	neg	neg
20	neg	neg	neg	neg	54	neg **	neg	neg	neg
21	neg	neg	neg	neg	55	1,04	neg	neg	neg
22	neg	neg	neg	neg	56	1,53	neg	neg	neg
23	neg	neg	neg	neg	57	neg	neg	neg	neg
24	neg	neg	1,94	neg	58	neg	neg	neg	neg
25	neg	neg	neg	neg	59	neg	neg	neg	neg
26	neg	neg	neg	neg	60	neg	neg	neg	neg
27	neg	neg	neg	neg	61	1,06#	neg	neg	neg
28	neg	neg	neg	neg	62	neg	neg	neg	neg
29	neg	neg	neg	Pos 1	63	neg	neg	1,07	neg
30	1,32#	neg	neg	neg	64	1,46	neg	neg	neg
31	neg	neg	neg	neg	65	1,71	1,19	1,22	Pos 2
32	neg	neg	neg	neg	66	neg	neg	neg	neg
33	1,03	neg	neg	neg	67	1,2	neg	neg	neg
34	neg	neg	1,14	neg	68	neg	neg	1,28	neg

pos= positivo

neg= negativo

SAM pos 1 7=200

SAM pos 2 1= 200; 2= 100

* Pesquisa de anticorpos IgM. D.O. am/ cutoff, quando maior que 1= positivo

** Pesquisa de anticorpos IgG incluída e foi negativa nesta amostra.

= resultado ora positivo, ora negativo em pelo menos 4 repetições do teste

Tabela 12 Resultados obtidos no **grupo controle**, casos de sífilis, malária, febre tifóide e hepatite, nas provas de ELISA com antígeno AgMc, PK-ELISA (PK), ELISA clássico (ELISAc) e SAM.

Sífilis	VDRL ** 1:	AgMc*	PK	ELISA c *	SAM
1	4	-	-	-	-
2	2	-	-	-	-
3	4	-	-	-	-
4	4	-	-	-	-
5	2	1,05#	-	-	-
6	4	-	-	-	-
7	2	-	-	-	-
8	1	-	-	-	-
9	32	-	-	-	-
10	8	1,09#	-	-	-
11	16	-	-	-	-
12	32	-	-	-	-
13	6	-	-	-	-
14	16	-	-	-	-
15	16	-	-	-	-
16	64	-	-	-	-
17	12812 HAP + &	-	-	-	-
18	128 HAP +	-	-	-	-
19	32	-	-	-	-
20	8	-	-	-	-

Malária	IR ***	AgMc*	PK	ELISA c *	SAM
1	7,24	1,06#	-	-	-
2	6,11	-	-	-	-
3	3,15	-	-	-	-
4	2,63	-	-	-	-
5	8,03	-	-	-	-
6	3,43	-	-	-	-
7	7,74	-	-	-	-
8	3,28	-	-	2,54	Pos 3
9	4,37	-	-	-	-
10	4,64	-	-	-	-
11	1,62	-	-	-	-
12	5,91	1,16	-	-	-
13	4,34	-	-	-	-
14	5,35	-	-	-	-
15	5,06	-	-	-	-
16	6,88	-	-	-	Pos 4
17	8,01	-	-	-	-
18	4,42	1,1	-	-	-
19	4,89	-	-	-	Pos 5
20	3,89	-	-	-	-

Febre Tifóide	TH/ TO****	AgMc*	PK	ELISA c *	SAM
1	400/ 100	-	-	-	-
2	100/ 200	-	-	1,14	-
3	400/ 100	1,5	-	-	-
4	100/ 800	-	-	-	-
5	800/ 200	1,37#	-	-	-

* Reatividade (IR) = DO am/cutoff > 1,00= positivo (pos)
 ** VDRL Venereal Disease Research Laboratory
 *** Reação de flocculação com antígeno de cardiolipina
 **** ELISA com extrato de zwittergent de *P. falciparum*. IR> 1,00 = pos
 ***** Prova de Widal
 & HAP prova de hemaglutinação passiva
 # Resultado ora positivo, ora negativo (-) em pelo menos 4 repetições
 - Resultado negativo
 Pos 3 - 4= 800 ; 1,8,9,18= 100
 Pos 4 - 1,15 = 100
 Pos 5 - 7 = 200

Hepatite	Tipo	AgMc*	PK	ELISA c *	SAM
1	B	-	-	-	-
2	B	-	-	-	-
3	B	1,14	-	-	-
4	B	1,15	-	-	-
5	B	-	-	1,06	-
6	A	-	-	-	-
7	A	-	-	-	-
8	A	-	-	-	-
9	A	-	-	-	-
10	A	-	-	-	-
11	A	-	-	-	-
12	A	-	-	-	-

Tabela 13 Comparação dos resultados obtidos nas provas de ELISA com antígenos obtidos com os anticorpos monoclonais (AgMc), no ELISA clássico (ELISA c) e na prova de Soroaglutinação microscópica (SAM), após conclusão diagnóstica da leptospirose e suas respectivas sensibilidades e especificidades

	Ag Mc		ELISA c		S A M	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Pacientes*	45	7	48	4	52	0
Controles **	21	104	17	108	5***	120
Sensibilidade	45/52	86,54%	48/52	92,30%	52/52	100%
Especificidade	104/125	83,20%	108/125	86,40%	120/125	96%

*Grupo de leptospirose com 52 pacientes.

**Grupo controle (N= 125) incluiu soros de pacientes com febre tifóide (N= 5), malária (N= 20), sífilis (N=20), hepatite (N=12) e de doadores clinicamente saudáveis de banco de sangue (N=68)

*** Um caso do grupo controle deu positivo em todas as provas

Tabela 14 Cálculo da sensibilidade (Sr), especificidade (Er), valor preditivo positivo (Vp+) e negativo (Vp-), falsos positivos (F+) e falsos negativos (F-) e índice de concordância (C) do teste em estudo, ELISA com antígenos obtidos com os anticorpos monoclonais (ELISA AgMc), relativos ao teste de referência Soroaglutinação microscópica (SAM), no diagnóstico da leptospirose humana, após conclusão diagnóstica.

SAM *	ELISA AgMc*		Total
	Reagente	Não reagente	
Reagente**	46 ^a	11 ^b	57
Não reagente***	20 ^c	100 ^d	120
Total	66	111	177

*Inclui 52 pacientes com leptospirose (grupos 1 e 2) e 125 casos do grupo controle.

**Reagente= teste positivo ou duvidoso

*** Não reagente= teste negativo

**** Resultados do ELISA clássico, entre parêntese, obtidos nas mesmas amostras, para comparar

Sensibilidade (Sr) =	a / a+b	= 80,70% (87,72%)****
Especificidade (Er) =	d / c+d	= 83,33% (87,50%)
Valor preditivo + (Vp+) =	a / a+c	= 69,70% (76,92%)
Valor preditivo - (Vp-) =	d / b + d	= 90,10% (93,75%)
Falsos positivos (F+) =	c / c + d	= 16,67% (12,50%)
Falsos negativos (F-) =	b / a + b	= 19,30% (12,28%)
Índice de concordância (C) =	a+ d / a + b + c + d	= 82,49% (87,57%)

Tabela 15 Comparação entre a proporção de casos detectados como leptospirose (reagente) nos testes ELISA com antígenos obtidos com os anticorpos monoclonais (ELISA AgMc), ELISA clássico (ELISA c) e na prova de referência Soroaglutinação microscópica (SAM), após conclusão diagnóstica nos 52 casos com leptospirose (grupos 1 e 2)

SAM	ELISA AgMc*		ELISA c**	
	Reagente	Não reagente	Reagente	Não reagente
Reagente (52)	45	7	48	4
Não reagente (0)	0	0	0	0
Total	45	7	48	4

*O valor estatístico do teste de McNemar para o teste ELISA AgMc é $X^2 = 5,14$

**O valor estatístico do teste de McNemar para o teste ELISA c é $X^2 = 2,25$

O valor do X^2 crítico com um grau de liberdade a nível de $P < 0,05$ é 3,84

5 DISCUSSÃO

A etiologia e a epidemiologia das leptospiroses vêm sendo elucidadas há muitos anos, tendo esse conhecimento conduzido ao desenvolvimento de estratégias preventivas efetivas. Em países desenvolvidos, a leptospirose em animais domésticos continua sendo uma doença de considerável significado econômico, mas a maior carga da doença humana continua a ser nos países tropicais e subtropicais em desenvolvimento.

A frequência de surtos recentes de leptospirose, com amplo espectro de manifestações clínicas, pode ser atribuída a mudanças climáticas e à atividade do homem.

O desenvolvimento de vários caminhos promissores ao diagnóstico rápido tem se baseado amplamente no reconhecimento de que o início precoce da antibioticoterapia é importante na doença aguda. Entretanto, muitos desses avanços diagnósticos ficam indisponíveis àquelas populações para os quais eles seriam mais úteis.

A compreensão dos mecanismos de patogênese permanece incompleta, mas os recentes avanços da biologia molecular de leptospiroses sugerem a perspectiva de um mais rápido progresso no futuro.

O desenvolvimento de testes simples e rápidos para o diagnóstico também deverão basear-se em ensaios que possam ser utilizados em laboratórios menos dotados de recursos.

A dificuldade deste tipo de pesquisa está na definição do antígeno alvo a ser estudado, devido à complexidade antigênica e à falta, em muitos casos, de resposta imune aos determinantes antigênicos selecionados.

Deve-se lembrar que os resultados obtidos podem variar em função de uma série de fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro e com as variações antigênicas do patógeno. Estes fatores podem levar a falsos resultados positivos devido à possibilidade de: reações cruzadas contra determinantes antigênicos comuns presentes em diferentes patógenos ou, ainda, resposta exacerbada do hospedeiro pela ativação policlonal de células B; ou podem levar a falsos resultados negativos pela ausência de resposta imunológica contra os epítomos do patógeno.

Assim, a possibilidade de se encontrar uma fração ou um epítomo antigênico universalmente reconhecida(o) por todos os pacientes com leptospirose, durante todo o tempo da infecção é mínima.

É essencial conhecer exatamente a cinética da resposta imune para se elaborar testes com valores prognósticos da doença. (Vaz & Livramento, 2001). Atualmente, os testes imunológicos são de elevada sensibilidade, o que torna difícil a escolha de antígenos adequados e que possam ser obtidos em quantidades suficientes para garantir homogeneidade e controle de qualidade dos lotes antigênicos.

Todas as técnicas propostas apresentam vantagens e desvantagens quanto a custo, execução e interpretação de resultados, reprodutibilidade e obtenção de reagentes. No entanto, os critérios que devem prevalecer na escolha do método devem buscar a eficiência diagnóstica com elevada preditividade de seus resultados.

A despeito das inúmeras diferentes preparações antigênicas que foram extraídas das leptospiplas, pouca informação existe sobre as especificidades de cada antígeno individual.

A dificuldade na obtenção de preparações puras de antígenos únicos, tem também dificultado as interpretações a respeito de suas propriedades.

Além disso, muitos autores usaram a prova de aglutinação microscópica para medir a atividade de anticorpos, restringindo-se à detecção de antígenos de superfície; outros usaram técnicas pouco sensíveis como a imunodifusão para detectar outros antígenos.

A potencialidade do emprego de anticorpos monoclonais de especificidade muito bem definida em ensaios diagnósticos é enorme. Os novos ensaios são de uma sensibilidade e especificidade que eram consideradas quase impossíveis para algumas técnicas utilizadas anteriormente. Todavia, as próprias qualidades potenciais podem tornar-se defeitos potenciais se um estudo detalhado da forma molecular (ou, do antígeno) que está sendo quantificada(o) não for realizado. Com ensaios com especificidade restrita a uma única forma molecular, pode-se encontrar circunstâncias onde a principal forma circulante ou a de maior interesse naquela condição não estará sendo avaliada.

Estas considerações não implicam em aceitar a maior ou menor validade clínica dos antigos ensaios que utilizam anticorpos policlonais. Ao contrário, implica em aceitar que os novos métodos apresentam uma potencialidade ainda maior do que a inicialmente aceita, como pode ser demonstrado para, por exemplo, o hormônio

do crescimento, onde a definição exata da forma a ser medida já pode ser definida (Vieira e cols, 1992 e 1994).

Sobre a imunização e seleção dos anticorpos monoclonais contra leptospiros produzidos neste estudo

Para os anticorpos monoclonais serem relevantes no imunodiagnóstico da leptospirose é preciso que sejam dirigidos contra antígenos de leptospiros que são reconhecidos por todos os pacientes com leptospirose.

Conforme alguns relatos da literatura, Chapman e cols, 1988, e Ribeiro e cols, 1992 e 1994, frações antigênicas entre 14-22 Kda, no perfil da eletroforese em SDS-PAGE das leptospiros, incluem antígenos imunodominantes importantes como o lipopolissacáride (LPS), para os quais todos os pacientes desenvolvem anticorpos IgM.

O LPS e alguns de seus componentes mostram bom potencial como antígenos imunizantes, uma vez que têm atividade endotóxica muito reduzida (Faine e cols., 1974, Isogai e cols., 1986, Vinh e cols., 1986). A imunização com o LPS purificado pode proteger hamsters de infecção, e anticorpos monoclonais contra o LPS podem opsonizar leptospiros para a fagocitose e proteger passivamente animais em novos desafios ("challenge") experimentais letais.

Um procedimento simples para a purificação de LPS a partir de uma preparação multiantigênica é a extração dos antígenos resistentes à proteinase-K, como o que foi utilizado por Cambiaso e

cols. (1992) na toxoplasmose e por Ribeiro e cols. (1994) na padronização de um teste ELISA para a leptospirose, o IgM-PK-ELISA, ou simplesmente, PK-ELISA, como foi referido no presente estudo.

Assim, o PK-ELISA foi o teste de escolha para a seleção dos hibridomas na primeira fusão.

Por outro lado, como se sabe, o LPS é um componente externo das leptospiros; assim, optou-se por uma inoculação de leptospiros, não viáveis, íntegras no esquema de imunização dos camundongos para a obtenção dos monoclonais, pois desta forma seriam produzidos anticorpos dirigidos contra a face exposta destes componentes, da maneira como eles ocorrem na natureza.

Os clones obtidos na primeira fusão (H7P1 e B9P8), no entanto, reconheciam epítomos presentes somente no sorogrupo icterohaemorrhagiae.

Na segunda fusão, os hibridomas foram selecionados quando reativos contra pelo menos três sorovares distintos, utilizando-se como prova de triagem o ELISA com extratos de zwittergent das diferentes cepas.

Os anticorpos monoclonais produzidos neste estudo e escolhidos para dar prosseguimento ao nossos objetivos, o H7P1, da primeira fusão e o A12P4, da segunda fusão, apresentaram reatividades bem distintas tanto em termos de qualidade (o H7P1 é um anticorpo aglutinante enquanto o A12P4 não) como em termos de especificidade dos epítomos reconhecidos. Assim, o H7P1

reconhece um epítopo que pode ser encontrado em frações de pesos moleculares acima de 21 kDa apenas de um único sorogrupo de leptospiros, que inclui as cepas mais importantes em nosso meio, i é, a icterohaemorrhagiae RGA e a copenhageni M20 (Figura 1) enquanto o A12P4 reconhece um epítopo que parece pertencer à região de interesse do “LPS-like”, em frações de 16 a 18 kDa (Figura 1) e em frações entre 75 a 85 kDa presentes em 16 dos 23 sorovares experimentados no teste ELISA (Tabela 6).

Quanto à aplicação dos monoclonais nos testes imuno-histoquímicos

Os anticorpos monoclonais H7P1 e B9P8, obtidos na primeira fusão, apresentaram uma reatividade com antígenos de leptospiros acoplados à membrana dos hepatócitos, em fígado de cobaias infectadas com *L. icterohaemorrhagiae* RGA. Conseqüentemente, estes monoclonais poderão ser utilizados como importante ferramenta diagnóstica na elucidação de biópsias e autópsias humanas, submetidas ao exame histopatológico.

Uma vantagem da utilização dos monoclonais H7P1 e B9P8 é que estes identificam epítomos que ocorrem somente em sorovar infectante pertencente ao sorogrupo icterohaemorrhagiae que inclui os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni, os maiores responsáveis pela infecção humana em nosso meio, o que pode ter um valor epidemiológico significativo.

Pode parecer um detalhe determinar o sorovar de *L. interrogans* responsável por uma infecção. Entretanto, o conhecimento da variedade da bactéria que desencadeia a doença numa pessoa ajuda a prever a evolução da infecção, visto que há cepas mais e cepas menos agressivas, o que é de fundamental importância para a produção de uma vacina. Isso é ainda mais verdadeiro no caso desse patógeno. Há cerca de 250 sorovares conhecidos de *L. interrogans*, com graus variáveis de características comuns. Diferenciar um tipo do outro nem sempre é fácil. Do ponto de vista de sua morfologia, de sua aparência externa vista com o auxílio de um microscópio eletrônico, as variedades podem ser consideradas idênticas. Todas são finas e alongadas, em forma de espiral, sem parede celular rígida. O problema é que, se sua constituição física não muda de acordo com o sorovar, outros parâmetros estão longe de ser sempre iguais ou semelhantes nas diversas formas da bactéria. O grau de patogenicidade, local de ocorrência geográfica, hospedeiros mais comuns e vítimas preferenciais (homem ou outro animal, como o cão, boi ou roedores) podem variar muito em função da cepa da *L. interrogans*. Certas formas da bactéria, por exemplo, causam leptospirose apenas no homem, outras infectam somente animais e ainda existem as que atacam ambos. Os sorovares copenhageni e lai estão entre as variedades mais virulentas da *L. interrogans* que atacam o ser humano (Pivetta, 2003)

Para se obter um padrão de resposta mais fácil de visualizar na imuno-histoquímica, a sugestão é que se experimente uma

associação de 2 ou 3 monoclonais com perfis de reconhecimento de epítomos diferentes.

Em relação ao método imuno-histoquímico utilizado, a vantagem do Sistema EnVision Peroxidase, um sistema de polímero dextran conjugado a imunoglobulinas e enzima, quando comparado ao sistema avidina-biotina usado anteriormente na rotina, está na redução da reação de fundo inespecífica devida à presença da biotina endógena em grande quantidade no fígado. (Ribeiro e cols, 2001a)

Quanto ao valor diagnóstico dos ensaios desenvolvidos com o uso dos monoclonais

Testes de captura dos antígenos específicos com uma mistura dos dois monoclonais selecionados, ou seja o H7P1 e o A12P4, adsorvidos às placas de microtitulação, ou ainda, os protocolos com a captura dos anticorpos IgM de indivíduos infectados, apresentaram muitos resultados inconsistentes, isto é, respostas próximas ao “cutoff”, ora positiva ora negativa, nas repetições das análises das amostras.

Como alternativa, foi proposta a eliminação de várias etapas dos protocolos acima, procedendo-se à adsorção dos próprios antígenos reconhecidos pelos monoclonais (“AgMc”) às placas de poliestireno.

A purificação desses antígenos “AgMc” foi obtida por cromatografia de afinidade utilizando-se a Sepharose 4B ativada e acoplada aos monoclonais, H7P1 e A12P4.

A reatividade dos soros de paciente com leptospirose com os antígenos das bandas com pesos moleculares próximos a 15 kDa (Figura 1), mesmo que baixa, era um bom resultado para avançarmos na padronização de novos testes para a pesquisa de anticorpos IgM específicos. (Ribeiro e cols, 2001 b; 2002 a e b)

Primeiramente experimentou-se o ELISA com a adsorção desses antígenos às placas de poliestireno com tampão carbonato, pH 9,6. Como a reatividade apresentada pelos soros do grupo de portadores da leptospirose era muito baixa, adotou-se nova interpretação, mais abrangente para se considerar um soro reagente, mas o resultado não foi satisfatório, obtendo-se muitos casos falso-positivos.

Quando os antígenos foram fixados em etanol, o teste ELISA “AgMc” ficou mais estável, porém apresentou falhas diagnósticas constatadas nos índices sorológicos estimados em relação à prova de referência, a soroaglutinação microscópica (SAM), de sensibilidade relativa (Sr) de 80,70%; especificidade relativa (Er) de 83,33%; valor preditivo positivo (Vp+) de 69,70%; valor preditivo negativo (Vp-) de 90,10%; falsos positivos (F+) de 16,67%; falsos negativos (F-) de 19,30% e índice de concordância (C) de 82,49%.

Além disso, os resultados desta nova prova, após conclusão diagnóstica dos 52 pacientes com leptospirose foram significativamente distintos aos obtidos com a prova de SAM.

Uma possibilidade aventada foi a de que esses antígenos reconhecidos pelos monoclonais selecionados promovessem um “switch” precoce na resposta imunológica da produção de imunoglobulinas do indivíduo infectado e então a resposta com

produção de imunoglobulinas G é que seria um melhor marcador da infecção. Para testar essa hipótese, ensaios de ELISA “AgMc” foram então feitos onde os anticorpos IgG foram determinados. O padrão de resposta encontrado, porém, não comprovou essa hipótese.

De um modo geral, portanto, os resultados aqui apresentados mostram que esta nova prova ELISA “AgMc” não representa uma possibilidade diagnóstica importante quando comparada a outras provas hoje disponíveis em nosso meio.

Explicações para os resultados encontrados

Muitas hipóteses poderiam justificar os resultados encontrados, como por exemplo:

- os antígenos “AgMc” sofrem alguma forma de denaturação durante o processo de extração;

- ou talvez, esses antígenos uma vez extraídos assumam uma forma tridimensional diferente da forma original presente na leptospira íntegra;

- ou ainda, estes antígenos poderiam fazer parte de uma fração hidrofóbica que formam micelas invertidas em meio aquoso, justificando a melhor fixação destes com o uso do etanol;

- ou, os anticorpos produzidos contra esses epítomos são de baixa afinidade, o que explicaria também os repetidos testes que ora apresentavam reatividade positiva ora reatividade negativa nas mesmas amostras.

Mas a especificidade de apenas 83,33% e os 16,67% de falsos positivos trazem fortes indícios de que os monoclonais escolhidos selecionaram epítomos não tão específicos. Então onde estaria a nossa falha?

Fazendo uma retrospectiva das etapas seguidas temos pelo menos uma que pode ser questionada. A seleção dos clones n

a segunda fusão, por exemplo, deu-se com uma prova de ELISA que emprega extratos de zwittergent, que inclui muitos antígenos “comuns” a outras bactérias. O monoclonal A12P4, selecionado nesta fusão para dar continuidade ao estudo, reconhecia um epítomo presente nas frações antigênicas da região entre 16 e 18 kDa dos sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni e da região de 77 a 84 kDa do sorovar canicola.

Por sua vez, no immunoblotting dos antígenos purificados “AgMc” com anticorpos IgM de pacientes com leptospirose, também se identificou uma banda fraca em torno dos 15- 15,2 kDa.

Entretanto, não se conseguiu identificar antígenos de leptospirose quando se utilizou o monoclonal A12P4 na análise imunohistoquímica de tecidos de cobaias infectadas, observando-se uma significativa coloração de fundo inespecífica.

Precisávamos, então, saber se o epítomo reconhecido por este monoclonal pertencia realmente à região de interesse, entre 15 e 22 kDa, reconhecida por todos os pacientes com leptospirose. Para testar essa hipótese foi verificada, com a utilização do PK-ELISA, a reatividade deste monoclonal A12P4 contra os antígenos PK-resistentes. Não foi encontrada reatividade significativa nesta prova, o que nos levou a concluir

que o epítopo reconhecido por este monoclonal não pertence ao pool de antígenos imunodominantes, como supúnhamos.

Cenário ideal para o desenvolvimento de uma vacina

No caso da leptospirose, devido ao número elevado de sorovares da bactéria causadora da doença, a presença de anticorpos no soro de um indivíduo contra uma variedade de *L. interrogans* não confere necessariamente, a este, proteção contra as demais formas do patógeno. Num cenário ideal, a vacina perfeita contra a leptospirose deveria conferir proteção imunológica contra todas as formas da bactéria ou, pelo menos, as mais disseminadas. No entanto, o máximo que se obtém, em muitos casos, é um produto mais focado e específico, capaz de impedir a infecção provocada por um ou alguns tipos de sorovares e que se mostra inócuo para outras formas do patógeno. Os poucos países que pesquisam mais a fundo a leptospirose tendem a focar seus trabalhos nas variedades mais importantes localmente. Além de China e Brasil, que seqüenciaram sorovares distintos de *L. interrogans*, os australianos estudam o material genético de outra cepa dessa bactéria. Desse modo, fazer pesquisa com os sorovares importantes em nosso meio é essencial, pois nada garante que uma vacina desenvolvida no exterior, contra outra variedade da bactéria, também possa ser útil para nós. (Pivetta, 2003)

A meta é prosseguir obtendo monoclonais com especificidades complementares, de forma que uma mistura

estratégica destes possibilite a detecção de todos os sorovares de leptospiros importantes em nosso meio.

Como avanços futuros podemos esperar uma melhor definição dos antígenos relevantes à resposta imune na leptospirose, e sua importância fisiopatológica através de técnicas de biologia molecular e, conseqüentemente, a produção de anticorpos monoclonais mais bem definidos,

6 CONCLUSÕES

Esta foi a primeira tentativa de produção de anticorpos monoclonais contra epítomos comuns aos sorovares das leptospiros mais importantes em nosso meio, visando o desenvolvimento de novos ensaios diagnósticos.

Dois hibridomas foram selecionados para dar continuidade ao estudo, o primeiro secretando anticorpos monoclonais específicos para um epítomo comum a 16 de 23 sorovares do gênero leptospira (clone A12P4), e o outro específico a somente um sorogrupo patogênico icterohaemorrhagiae (clone H7P1)

O anticorpo monoclonal A12P4, uma imunoglobulina G2b (IgG2b), reconheceu um epítomo presente nos componentes de pesos moleculares (PM) de 16 a 18kDa dos lisados de leptospiros das cepas RGA e M-20, quando separados na eletroforese de gel de poliacrilamida e nos componentes de PM de 75 e 84 kDa dos sorovares copenhageni e canicola.

O anticorpo monoclonal H7P1, uma imunoglobulina G, reconheceu um epítomo comum a várias frações de pesos moleculares acima de 21 kDa da cepa RGA e com componentes de PM de 21-22 kDa e de 75-82 kDa da cepa M-20.

A produção de monoclonal específico para um sorogrupo prevalente em nosso meio, como o H7P1, encontra aplicabilidade imediata na imuno-histoquímica, importante ferramenta diagnóstica na elucidação de biópsias e autópsias humanas quando submetidas ao exame histopatológico, e na identificação

rápida de leptospiros como pertencentes ao sorogrupo icterohaemorrhagiae.

Os ensaios diagnósticos desenvolvidos no presente estudo com a utilização dos anticorpos monoclonais, A12P4 e H7P1, como o ELISA indireto modificado e ELISA de captura apresentaram muitos resultados inconsistentes nas repetições das amostras sorológicas.

O ELISA desenvolvido com a adsorção dos antígenos reconhecidos pelos monoclonais acima, o “ELISA AgMc”, apresentou índices sorológicos relativos à prova de referência SAM de 80,7% e 83,33% de sensibilidade e especificidade; 69,70% e 90,10% de valores preditivos positivos e negativos, respectivamente, e índice de concordância geral de 82,49%. Além disso, tomando-se a SAM como diagnóstico verdadeiro, os resultados obtidos no novo teste após a conclusão diagnóstica do grupo de pacientes com a leptospirose, mostraram uma discordância significativa.

Portanto, nenhum dos ensaios diagnósticos desenvolvidos no presente estudo parecem protocolos promissores uma vez que não preencheram os requisitos necessários para melhor eficiência diagnóstica na leptospirose humana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁶

- ADLER, B.; BALLARD, S.; FAINE, S. EIA test for leptospirosis. *Med. J. Aust.*, Glebe, v.141, p.685, 1984.
- ADLER, B.; CHAPPEL, R.J.; FAINE, S. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.252, p.405-413, 1982.
- ADLER, B.; FAINE, F. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.11, p.387-400, 1978.
- ADLER, B.; FAINE, S. A pomona serogroup-specific agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies. *Pathology*, Basingstoke, v.15, p.247-250, 1983.
- ADLER, B.; FAINE, S. Species-specific and genus-specific antigens in *Leptospira*, revealed by monoclonal-antibodies and enzyme-immunoassay. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.255, n.2/3, p.317-322, 1983b.
- ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W.L.; CHAPPEL, R.J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet Microbiol.*, Amsterdam, v.12, p.377-381, 1986. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.
- ADLER, B.; MURPHY, A.M.; LOCARNINI, A.S., FAINE, S. Detection of specific ant-leptospiral immunoglobulins M

---

⁶ De acordo com a norma NBR6023/00 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.11, p.452-457, 1980.

ALDERETE, J.F.; FREEMAN-SHADE, L.; BASEMAN, J.B. Immunodiagnostic test for the detection of serum antibody to *Treponema pallidum* (syphilis): fibronectin as a capture vehicle for treponemal adhesins. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.84, p.365-373, 1985.

ALEXANDER, A.D.; LESSEL, E.F.; EVANS, L.B.; FRANCK, E.; GREEN, S.S. Preservation of leptospiras by liquid-nitrogen refrigeration. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v.22, p.165-169, 1972.

ALVES, V.A.F.; GAYOTTO, L.C.C.; BRITO, T.; SANTOS, T.M.; WAKAMATSU, A.; VIANNA, M.R.; SAKATA, E.E. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage. *Exp. Toxicol. Pathol.*, Jena, v.44, p.425-434, 1992.

ALVES, V.A.F.; VIANNA, M.R.; YASUDA, P.H.; BRITO, T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J. Pathol.*, Bognor Regis, v.151, p.125-131, 1987.

ALVES, V.A.F.; YASUDA, P.H.; YAMASHIRO, E.H.; SANTOS, R.T.M.; YAMAMOTO, L.U.; BRITO, T. An immunohistochemic assay to localize leptospirae in tissue specimens. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.28, p.170-173, 1986.

ANNEAR, D.I. Recovery of leptospirae after dry storage for ten years. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v.24, p.399-

- 401, 1974. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.
- APPASSAKIJ, H.; SILPAPOJAKUL, K.; WANSIT, R.; WOODTAYAKORN, J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.52, p.340-343, 1995.
- AREAN, V.M. The pathogenic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v.40, p.393-423, 1962.
- BAHAMAN, A.R.; MARSHALL, R.B.; MORIARTY, K.M. Experimental trials on the use of radioimmunoassay for the detection of leptospiral antigens in urine. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v.12, p.161-167, 1986.
- BALLARD, S.A.; FAINE, S.; ADLER, B. Purification and characterization of a protein antigen from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, common to a wide range of bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v.136, p.1849-1857, 1990.
- BARIL, C.; SAINT-GIRONS, I. Sizing of the *Leptospira* genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.71, p.95-99, 1990. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.
- BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect. Immun.*, Washington, v.19, p.562-569, 1978.
- BIER, O. *Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene*. 16.ed. São Paulo: Melhoramentos, EDUSP, 1975. 1056p.

- BLACKMORE, D.K.; SCHOLLUM, L.M.; MORIARTY, K.M. The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *N. Z. Med. J.*, Wellington, v.97, p.83-86, 1984.
- BRANDÃO, A.P.; CAMARGO, E.D.; SILVA, E.O.; SILVA, M.V.; ABRÃO, R.V. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.36, p.3138-3142, 1998.
- BRANDLING-BENNETT, A.; PINHEIRO, F. Infectious diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing? *Emerging Infect. Dis.*, Atlanta, v.2, p.59-61, 1996.
- BRENNER, D.J.; KAUFMANN, A.F.; SULZER, K.R.; STEIGERWALT, A.G.; ROGERS, F.C.; WEYANT, R.S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovares in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v.49, p.839-858, 1999. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.
- BUCK, A.A. & GART, J.J. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Amer. J. Epidemiol.*, v. 83, p. 586-92, 1966.
- BULACH, D.M.; KALAMBAHETI, T.; PEÑA-MOCTEZUMA, A.; ADLER, B. Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo subtype hardjobovis. *Infect. Immun.*, Washington, v.68, p.3793-

3798, 2000. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

CAMBIASO, C.L.; GALANTI, L.M.; LEAUTAUD, P.; MASSON, P.L. Látex agglutination assay of human immunoglobulin M antitoxoplasma antibodies which uses enzymatically treated antigen-coated particles. *J. Clin. Microbiol.* Washington, v. 30, p. 882-8, 1992.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage – Nicaragua, 1995. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, Atlanta, v.44, p.841-843, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update: outbreak of acute febrile illness among athletes participating in the Eco-Challenge- Sabah 2000 - Borneo, Malaysia, 2000. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, Atlanta, v.50, p.21-24, 2001.

CHAMPAGNE, M.-J. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can. J. Vet. Res.*, Ottawa, v.55, p.239-245, 1991.

CHANG, R.S.; McCOMB, D.E. Erythrocyte sensitizing substances from five strains of leptospires. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.3, p.481-489, 1954.

CHAPMAN, A.; ADLER, B.; FAINE, S. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.25, p.269-278, 1988.

- CHAPMAN, A.; ADLER, B.; FAINE, S. Genus-specific antigens in *Leptospira* revealed by immunoblotting. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.246, p.279-293, 1987.
- CHAPMAN, A.J.; FAINE, S.; ADLER, B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalente hardjo/pomona leptospiral vaccine. *FEMS Microbiol. Immunol.*, Amsterdam, v.2, p.111-118, 1990.
- CHAPPEL, R.J.; ADLER, B.; BALLARD, S.A.; FAINE, S.; JONES, R.T.; MILLAR, B.D.; SWAINGER, J.A. Enzymatic radioimmunoassay for detecting *Leptospira interrogans* serovar pomona in the urine of experimentally-infected pigs. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v.10, p.279-286, 1984/85.
- CINCO, M. Evaluation of monoclonal antibody F9-4 as immunological probe for *Leptospira interrogans*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, p.2154-2155, 1990.
- CINCO, M.; BALANZINI, D.; BANFI, E. Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy. *Eur. J. Epidemiol.*, Dordrecht, v.8, p.677-682, 1992.
- CINCO, M.; BANFI, E.; SORANZO, M.R. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v.124, p.409-413, 1981.
- COX, C.D.; ALEXANDER, A.D.; MURPHY, L.C. Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.101, p.210-218, 1957.

- De BRITO, T.; FREYMULLER, E.; HISHINO, S.; PENNA, D.O. Pathology in the kidney and liver of experimental leptospirosis of guinea-pig. a light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, Berlin, v. 341, p. 64-78, 1966.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Columbus, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H.D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem* v. 47, p. 91-97, 1974.
- ELLINGHAUSEN, H.C.; McCULLOUGH, W.G. 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.*, Schaumburg, v.26, p.45-51, 1965. *Apud* FAINE, S., ed. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p. (WHO offset publication, n.67).
- ELLIS, W.A.; HOVIND-HOUGEN, K.; MOLLER, S.; BIRCH-ANDRESEN, A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.255, p.323-335, 1983.
- EVANS, M.; BARANTON, G. Leptospirosis outbreak in Eco Challenge 2000 participants. *Apud* Week's news – 21 september. *Eurosurveillance Weekly* 4: 000921. Disponível em: <http://www.eurosurv.org./2000/000921.htm>. Acesso em: 31 julho 2002.

- FAINE, S., ed. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p. (WHO offset publication, n.67).
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*, 2.ed. Melbourne: MediSci, 1999.
- FAINE, S.; ADLER, B.; PALIT, A. Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, Adelaide, v.52, p.311-319, 1974.
- FARR, R.W. Leptospirosis – state-of-art clinical article. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.21, p.1-8, 1995.
- FARRELY, H.E.; ADLER, B.; FAINE, S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J. Med. Microb.*, v.23, p.1-7, 1987.
- FLEISS, J.L. *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd edn. New York, John Wiley & Sons, 1981. p. 119-123.
- FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.21, p. 265-287, 1928. *Apud* FAINE, S., ed. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p. (WHO offset publication, n.67).
- FUKUNAGA, M.; HORIE, I.; OKUZAKO, N.; MIFUCHI, I. Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene for *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v.18, p.366, 1990. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

- GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R., *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis*. New York., Eds. John Wiley & Sons, 1975. 237p.
- GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. *J Immunol. Methods*, Amsterdam, v. 39, p. 285-308, 1980. [Review].
- GRINER, P.F., MAYEWSKI, R.J., MUSHLIN, A.I., GREENLAND, P. Selection and interpretation of diagnosis tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Intern. Med.* v. 94, p. 557-600, 1981.
- HAAKE, D.A.; CHAMPION, C.I.; MARTINICH, C.; SHANG, E.S.; BLANCO, D.R.; MILLER, J.N.; LOVETT, M.A. Molecular cloning and sequence analysis of gene encoding Omp11: a transmembrane outer protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J. Bacteriol.*, Washington, v.175, p.4225-4234, 1993.
- HARDY, R. R. Purification and characterization of monoclonal antibodies. In: WEIR, D.M., HERZENBERG, L.A., BLACKWELL, C., HERZENBERG, LEONORE A. *Handbook of experimental immunology: Immunochemistry*. 4ed. Palo Alto, California, EUA: Blackwell Scientific Publications, 1986. cap 13.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T., eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 754p.
- HÜBENER, E.A.; REITER, H. Beiträge zur aetiologic der weilschen krankheit. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, Stuttgart, v.41, p.1275-1277, 1915. *Apud* LEVETT, P.N.

Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J. Exp. Med.*, New York, v.26, p.341-353, 1917. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J. Exp. Med.*, New York, v.23, p.377-402, 1916. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; KUREBAYASHI, Y.; ITO, H. Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.261, p.53-64, 1986.

JOHNSON, D.A.; GAUSTSCH, J.W.; SPORTSMAN, J.R.; ELDER, J.H. Improved technique utilizing analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.*, New York, v.1, p.3-8, 1984.

JOHNSON, R.C.; HARRIS, V.G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. 1. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.*, Washington, v.94, p.27-31, 1967.

JOHNSON, R.C.; ROGERS, P. 5-fluorouracil as a selective agent for growth of *Leptospirae*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.87, p.422-426, 1964. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

- JOHNSON, R.C.; WALBY, J.; HENRY, R.A.; AURAN, N.E.
Cultivation of parasitic leptospires: effect of pyruvate.
Appl. Microbiol., Baltimore, v.26, p.118-119, 1973.
- JOST, B.H.; ADLER, B.; FAINE, S. Experimental immunization
of hamsters with lipopolysaccharide antigens of
Leptospira. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.29, p.115-
120, 1989.
- JOST, B.H.; ADLER, B.; FAINE, S. Reaction of monoclonal
antibodies with species specific determinants in *Leptospira*
interrogans outer envelope. *J. Med. Microbiol.*,
Hagerstown, v.27, p.51-57, 1988.
- JOST, B.H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal
antibody reacting with a determinant on leptospiral
lipopolysaccharide protects guinea-pig against
leptospirosis. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.22, p.269-
275, 1986.
- KENDALL, C.; IONESCU-MATIU, I.; DREESMAN, G.R.
Utilization of the biotin-avidin system to amplify the
sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay
(ELISA). *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.56, p.329-
339, 1983.
- KMETZ, E.; GALTON, M.M.; SULZER, C.R. Further
standardization of the agglutinin-absorption test in the
serology of leptospires. *Bull. W. H. O.*, Geneva, v.42,
p.733-738, 1970.
- KNIGHT, L.L.; MILLER, N.G.; WHITE, R.J. Cytotoxic factor in
the blood and plasma of animals during leptospirosis.
Infect. Immun., Washington, v.8, p.401-405, 1973.

- KO, A.I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C.M.; JOHNSON, W.D.; RILEY, L.W.; SALVADOR LEPTOSPIROSIS STUDY GROUP. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*, London, v.354, p.820-825, 1999.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, London, v.256, p.495-497, 1975.
- KORTHOF G. Experimentelles Schlammfieber beim Menschen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitol. Abt I Orig*, Stuttgart, v. 125, p.429-434 , 1932. *Apud* FAINE, S., ed. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p. (WHO offset publication, n.67).
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.229, p.680-685, 1970.
- LANDOUZY, L.T.J. Fièvre bilieuse ou hépatique. *Gaz. Hop.*, Bordeaux, v.56, p.809, 1883. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.
- LIN, M.; BUGHIO, N.; SURUJBALLI, O. Expression in *Escherichia coli* of *flaB*, the gene coding for a periplasmic flagellin of *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.48, p.977-982, 1999. *Apud*

LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

LINKO-KETTUNEN, L.; ARSTILA, P.; JALKANEN, M.; JOUSIMIES-SOMER, H.; LASSILA, O.; LEHTONEN, O.-P.; WEINTRAUB, A.; VILJANEN, M.K. Monoclonal antibodies to *Bacteriodes fragilis* lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.20, p.519-524, 1984.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

McGRATH, H.E.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospire by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Pathology*, Basingstoke, v.16, p.243-249, 1984.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.30, p.2219-2224, 1992.

MIDWINTER, A.C.; FAINE, S.; ADLER, B. Vaccination of mice with LPS and LPS-derived immunoconjugates from *Leptospira interrogans*. *J. Med. Microbiol.*, Hagerstown, v.33, p.199-204, 1990.

MITCHISON, M.; BULACH, D.M.; VINH, T.; RAJAKUMAR, K.; FAINE, S.; ADLER, B. Identification and characterization of the dTDP-rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related *rfb* locus in *Leptospira*

interrogans serovar copenhageni. *J. Bacteriol.*, Washington, v.179, p.1262-1267, 1997.

MYERS, D.M. Evaluación de antígenos de la envoltura externa da *Leptospira* en pruebas de fijación de complemento Y de hemaglutinación para la leptospirosis. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, Washington, v.87, p.141-151, 1979.

NIIKURA, M.; ONO, E.; YANAGAWA, R. Molecular comparison of antigens and proteins of virulent and avirulent clones of *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*, strain shibaura. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.266, p.453-462, 1987.

NOGUCHI, H. Spirochaeta icterohaemorrhagiae in American wild rats and its relation to Japanese and European strains. *J Exp. Med.*, New York, v. 25, p. 755, 1917. *Apud* BIER, O. *Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene*. 16.ed. São Paulo: Melhoramentos, EDUSP, 1975. 1056p.

NUNES-EDWARDS, P.L.; THIERMANN, A.B.; BASSFORD, P.J.; STAMM, L.V. Identification and characterization of protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Infect. Immun.*, Washington, v.48, p.492-497, 1985.

PALIT, A.; GULASEKHARAM, J. Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in the laboratory diagnosis. *J. Clin. Pathol.*, London, v.26, p.7-16, 1973.

PALIT, A.; HAYLOCK, L.M.; COX, J.C. Storage of pathogenic leptospire in liquid nitrogen. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.61, p.407-411, 1986.

PALMER, M.F. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Med. Lab. Sci.*, New York, v.45, p.174-178, 1988.

PARK, S.-H.; AHN, B.Y.; KIM, M.J. Expression and immunologic characterization of recombinant heat shock protein 58 of *Leptospira* species: a major target antigen of the humoral immune response. *DNA Cell. Biol.*, Larchmont, v.18, p.903-910, 1999. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; WEISBURG, W.G.; TORDOFF, L.A.; FRASER, G.J.; HESPELL, R.B.; STANTON, T.B.; ZABLEN, L.; MANDELCO, L.; WOESE, C.R. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.*, Washington, v.173, p.6101-6109, 1991.

PEÑA-MOCTEZUMA, A.; BULACH, D.M.; KALAMBAHETI, T.; ADLER, B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.177, n.2, p.319-326, 1999. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

PIVETTA, M. Na trilha da vacina. *Pesquisa Fapesp*, São Paulo, v. 88, p.42-45, 2003.

RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLON, K.; DRANCOURT, M.;
RAOULT, D. *rpoB* gene analysis as a novel strategy for
identification of spirochetes from the genera *Borrelia*,
Treponema, and *Leptospira*. *J. Clin. Microbiol.*,
Washington, v.38, p.2200-2203, 2000. *Apud* LEVETT, P.N.
Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14,
p.296-326, 2001.

RENTROP, M.; KNAPP, B.; WINTER, H.; SCHWEZER, J.
Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ
hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue section
under varying fixation and pretreatment conditions.
Histochem. J., Dordrecht, v.18, n.5, p.271-276, 1986.

RIBEIRO, M.A.; ASSIS, C.S.N.; ROMERO, E.C. Serodiagnosis
of human leptospirosis employing immunodominant
antigen. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.*, London, v.6,
p.140-144, 1994.

RIBEIRO, M.A.; BRANDÃO, A.P.; ROMERO, E.C. Evaluation
of diagnostic tests for human leptospirosis. *Braz. J. Med.*
Biol. Res., Ribeirão Preto, v.29, p.773-777, 1996.

RIBEIRO, M.A.; CAVALCANTE, Z.M.O.; LOPES, D.M.; PIRES,
R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; GODANO, A.;
KAWARABAYASHI, M.; VIANNA, T.H.S. Avaliação da
prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da
leptospirose humana em diversos períodos evolutivos da
doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.45, p.37-42,
1985.

RIBEIRO, M.A.; CLIQUET, M.G.; SANTOS, M.G.S.
Leptospirosis: a problem for transfusion medicine?

Serodiagn. Immunother. Infect. Dis., London, v.8, p.185-189, 1997.

RIBEIRO, M.A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R.B.R.; MELHEM, M.S.C.; VIANNA, T.H.S.; CAVALCANTE, Z.M.O. Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.44, p.35-40, 1984.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; TAKEDA, A.K. Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.41, p.127-133, 1981a.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.; TAKEDA, A.K.; CORRÊA, M.O.A. Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.41, p.135-143, 1981b.

RIBEIRO, M.A.; KIMURA, R.T.; IRULEGUI, I.; COLLETO, G.M.D.D.; RIBEIRO, C.E.; FARHAT, C.K. Cerebrospinal fluid levels of lysozyme, IgM and C-reactive protein in the identification of bacterial meningitis. *J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.95, p.87-94, 1992a.

RIBEIRO, M.A.; NISHIDA, S.K.; LOMBARDI, M. T.; VIEIRA, J.G.H.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; ROMERO, E.C.; BASTOS, L. T.; BELÉM, Z.R.; SANTOS, A.S. Monoclonal antibodies applied to leptospiral immunodiagnosis: preliminary results. *Rev. Inst. Adolfo*

Lutz, São Paulo, v.60, supl.1, p.124, res.IMU-12, 2001b
(Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 4, São Paulo, 2001).

RIBEIRO, M.A.; NISHIDA, S.K.; LOMBARDI, M.T.; VIEIRA, J.G.H.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; ROMERO, E.C.; BELÉM, Z.R.; SANTOS, A.S.; KANAMURA, H.Y. Monoclonal antibodies applied to leptospiral immunodiagnosis: preliminary results. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.38, supl.1, p.25, res.ACT46, 2002a. (Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 7, Seminário de Pós-Graduação, 17, Reunião de Iniciação Científica, 10, Semana Universitária Paulista de Farmácia–Bioquímica, 37, São Paulo, 2002).

RIBEIRO, M.A.; NISHIDA, S.K.; LOMBARDI, M.T.; VIEIRA, J.G.H.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; ROMERO, E.C.; BELÉM, Z.R.; SANTOS, A.S. Monoclonal antibodies applied to leptospiral immunodiagnosis: preliminary results. In: Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 27, International Symposium on Allergy and Clinical Immunology, 5, Salvador, 2002b. *Programas e resumos*. Salvador: Sociedade Brasileira de Imunologia, 2002. p.97, res.P-195.

RIBEIRO, M.A.; SAKATA, E.E.; SILVA, M.V.; CAMARGO, E.D.; VAZ, A.J.; BRITO, T. Antigens involved in the human antibody response to natural infections with *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.95, p.239-245, 1992b.

RIBEIRO, M.A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F.; DE BRITO, T. Demonstração de antígenos de leptospiros em amostras teciduais por anticorpos policlonais produzidos em

carneiro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.66, supl., p.1-14, res.21, 1999e. (Reunião Anual do Instituto Biológico, 12, São Paulo, 1999).

RIBEIRO, M.A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F.; DE BRITO, T. Leptospiral antigen in the liver sections detected in a new immunoperoxidase method. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.60, supl.1, p.124, res.IMU-11, 2001a (Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 4, São Paulo, 2001).

RIBEIRO, M.A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F.; DE BRITO, T. Presença de antígenos de leptospiros em fígado de cobaia infectada experimentalmente, evidenciados por anticorpos humanos produzidos durante a doença. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.32, supl.1, p.419, 1999a. (Congresso de Medicina Tropical, 35, Guarapari, 1999).

RIBEIRO, M.A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F.; DE BRITO, T. Presença de antígenos de leptospiros em fígado de cobaia infectada experimentalmente, evidenciados por anticorpos humanos produzidos durante a doença. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, Rio de Janeiro, v.31, n.2, supl., p.25, 1999b. (Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 26, Goiânia, 1999).

RIBEIRO, M.A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F.; DE BRITO, T. Presença de antígenos de leptospiros em fígado de cobaia infectada experimentalmente, evidenciados por anticorpos humanos produzidos durante a doença. In: Encontro Instituto Adolfo Lutz, 3, São Paulo, 1999c. *Programas e resumos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1999. p.221, res.IMU03

RIBEIRO, M.A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F.; LOMBARDI, M.T.; NISHIDA, S.K.; DE BRITO, T. Identificação das leptospirosas em amostras teciduais por anticorpos policlonais produzidos em carneiro. In: Encontro Instituto Adolfo Lutz, 3, São Paulo, 1999d. *Programas e resumos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1999. p.220, res.IMU04.

RIBEIRO, M.A.; SOUZA, C.C.; ALMEIDA, S.H.P. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. *J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.98, p.452-456, 1995.

RICHAUD, C.; MARGARITA, D.; BARANTON, G.; SAINT-GIRONS, I. Cloning of genes required for amino acid biosynthesis from *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v.136, p.651-656, 1990. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

ROMERO, E.C.; BILLERBECK, A.E.; LAUDO, V.S.; CAMARGO, E.D.; SOUZA, C.C.; YASUDA, P.H. Detection of *Lepstospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *J. Clin Microbiol.*, Washington, v.36, p.1453-1455, 1998.

SAENGJARUK, P.; CHAICUMPA, W.; WATT, G.; BUNYARAKSYOTIN, G.; WUTHIEKANUN, V.; TAPCHAI SRI, P.; SITTINONT, C.; PANAPHUT, T.; TOMANAKAN, K.; SAKOLVAREE, Y.; CHONGSA-NGUAN, M.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; KALAMBAHETI, T.; NAIGOWIT, P.; WAMBANGCO, M.A.; KURAZONO, H.; HAYASHI, H. Diagnosis of human leptospirosis by

monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.40, p.480-489, 2002.

SAKATA, E.E.; YASUDA, P.H.; ROMERO, E.C.; SILVA M.V.; LOMAR, A.V. Serovares of *Leptospira interrogans* isolated from human leptospirosis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.34, p.217-221, 1992.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof Alexandre Vranjac". *Leptospirose*. Disponível em: www.cve.saude.sp.gov.br. Acesso em: 7 de agosto de 2003.

SCHOONE, G.J.C.O.; EVERARD, C.O.; KORVER, H.; CARRINGTON, V.A.; INNISS, V.A.; BAULU, J.; TERPSTRA, W.J. An immunoprotective monoclonal antibody directed against *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v.135, p.73-78, 1989.

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, Y. Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v.31, p.727-735, 1987.

SILVA, M.V.; BATISTA, L.; CAMARGO, E.D.; LEITÃO, P.A.; SZALKAY, V.G.T.; ROSENTHAL, C.; VAZ, A.J.; SOUZA, A.M.C. Leptospirosis in patients with anti-HIV antibodies: report of 2 cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.23, p.229-231, 1990.

SILVA, M.V.; CAMARGO, E.D. Leptospirose humana. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico laboratorial*:

avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes: correlação clínico-laboratorial. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.17, p.195-201.

SILVA, M.V.; CAMARGO, E.D.; VAZ, A.J.; SOUZA, A.M.C.; UEDA, M.; SAKATA E.E. Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos da classe IgM na leptospirose humana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.30, p.95-100, 1988.

SITPRIJA, V.; PIPATANAGUL, V.; MERTOWIDJOJO, K.; BOONPUCKNAVIG, V.; BOONPUCKNAVIG, S. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. *Kidney Int.*, Malden, v.17, p.827-836, 1980.

STEINBUCH, M.& AUDRAN, R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.134,p.279-284, 1969.

STIMSON, A.M. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Rep.*, v.22, p.541, 1907. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

STUART, R.D. The preparation and use of a simple culture medium for leptospire. *J. Pathol. Bacteriol*, v.58, p. 343-349, 1946. *Apud* FAINE, S., ed. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p. (WHO offset publication, n.67).

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T, early RNAs and proteins on slabs gels. *J. Mol. Biol.*, Sidcup, v.79, p.237-248, 1973.

- SULZER, C.R.; JONES, W.L. In: *Leptospirosis: methods in laboratory diagnosis*. Atlanta: Center for Disease Control, 1976. (DHEW Publ. n. (CDC) 76: 8275).
- TERPSTRA, W.J.; LIGTHART, G.S.; SCHOONE, G.J. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.247, p.400-405, 1980.
- TERSPSTRA, W.J.; KORVER, H.; LEEUWEN, J.V.; KLATSER, P.R.; KOLK, H.J. The classification of Sejroe Group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., Ser. A*, Stuttgart, v.259, p.498-506, 1985.
- TORTEN, M.; SHENBERG, E.; VAN DER HOEDEN, J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.116, p.537-543, 1966.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.
- TRUEBA, G.A.; BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.174, p.4761-4768, 1992.
- TURNER, L.H. Leptospirosis II. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.62, p.880-899, 1968.

TURNER, L.H. Leptospirosis III: maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.64, p.623-646, 1970.

UHLENHUTH, P.; FROMME, W. Experimentelle untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). *Med. Klin.*, Muenchen, v.44, p.1202-1203, 1915. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

UIP, D.E. Diagnóstico precoce da leptospirose por biópsia de músculo da panturrilha. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.23, p.185, 1990. [Resumo de tese].

UIP, D.E.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M.S. Diagnóstico precoce da leptospirose por demonstração de antígenos através de exames imuno-histoquímico em músculo da panturrilha. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.34, p.375-381, 1992.

VAZ, A.J.; LIVRAMENTO, J.A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes: correlação clínico-laboratorial*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.317-322.

VIEIRA, J.G.H.; ANDO, M.H.K.; NISHIDA, S.K.; MACEDO, C.D.; ABUCHAM, J.Z. Clinical utility of a 22-kDa growth hormone- specific assay. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.25, p.243-245, 1992.

VIEIRA, J.G.H.; LOMBARDI, M.T.; NISHIDA, S.K. Anticorpos monoclonais contra hormônios glicoprotéicos: produção, características gerais e implicações metodológicas. *Arq.*

Bras. Endocrinol. Metabol., Rio de Janeiro, v.38, p.157-163, 1994.

VIEIRA, J.G.H.; LOMBARDI, M.T.; NISHIDA, S.K. Monoclonal antibody-based immunoenzymometric assay for serum human growth hormone. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.23, p.293-296, 1990.

VIEIRA, J.G.H.; NISHIDA, S.K.; SILVA, S.M.; FERRAZ, M.L.; GRANATO, C. Production of anti-HbsAg monoclonal antibodies. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.21, p.507-509, 1988.

VINETZ, J.M. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, London, v.14, p.527-538, 2001.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. Gen Microbiol.*, Reading, v.132, p.111-123, 1986b.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pathology*, Basingstoke, v.14, n.4, p.463-468, 1982.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. Gen Microbiol.*, Reading, v.132, p.103-109, 1986.

VYBERG, M.; NIELSEN, S. Dextran polymer conjugate two-step visualization system for immunohistochemistry: a comparison of EnVision+ with two three-step avidin-biotin techniques. *Appl. Immunohistochem.*, New York, v.6, n.1, p.3-10, 1998.

WEIL, A. Ueber eine eigentümliche, mit Miltumor, Icterus und Nephritis einhergehend akute. *Infektionskrankheit. Dtsch. Arch. Klin. Med.*, Leipzig, v.39, p.209-232, 1886. *Apud* LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

WHITE, F.H. & RISTIC, M. Detection of *Leptospira Pomona* in guinea pig and bovine urine with fluorescein-labeled antibody. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.105, p.118-123, 1959.

YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; BERNARD, G.; SATO, M.N.; SEGURO, A.C.; DUARTE, A.J.S. Cellular immune response analysis of patients with leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.45, p.138-145, 1991.

YASUDA, P.H.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R.; KAUFMANN, A.F.; ROGERS, F.; BRENNER, D.J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars, in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v.37, p.407-415, 1987.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: MOREL, C.M., ed. *Genes and antigens of parasites: a laboratory manual*. 2.ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p.357-363.

9 APÊNDICE

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4
(composição em g/l da solução 10 x concentrada: 80 NaCl; 2 KH_2PO_4 ; 21 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 KCl). Sais obtidos da Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil . PBS/ BSA 0,5% , trata-se do PBS acima adicionado de BSA na concentração de 0,5g%.

Solução salina tamponada com Tris (hidroximetil) -amino metano pH 7,5, sais obtidos da Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil. (composição em g/l da solução 5x concentrada: 12,10 Tris; 146,25 NaCl, q.s.p. 1000mL. Acertar o pH com HCl 2N)

Tampão glicina pH 2,8 , sais obtidos da Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA. Composição Solução A: glicina 1,0 M, NaCl 1.0 M, Solução B: HCl 1,0N.

Para o pH 2,8 são necessários 75,6mL da Sol A ajustando o pH com aproximadamente 24,4mL da Sol B, e H_2O qsp 1000mL

Tampão Tris-HCl pH 7,5 com NaCl a 0,9% - composição em g /l : 1,2 Tris (Merck S.A., Indústrias Químicas, RJ, Brasil , 9,0 NaCl.

Tampão Tris-HCl pH 7,5 com NaCl a 0,9% com CaCl_2 20mM
(composição: 0,7751g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 10mL de H_2O ultra pura, diluída a 1/25 no tampão Tris descrito acima, para ficar a 20 mM.).

Solução de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA) 1 mM. Diluída de uma solução estoque de PMSF a 50 mM (composição: 0,174g PMSF

em 20 mL de etanol). Distribuir em alíquotas de 0,5 mL. Armazenamento: -18 a -23°C. Validade: 2 anos.

Acetato de sódio 1 M pH 5,0 (composição: 82,04g acetato de sódio anidro (Mallinckrodt) em 900mL de H₂O ultra pura. Ajustar o pH a 5,0 com HCl 1N, e completar o volume a 1000 mL com H₂O ultra pura.

Sulfato de magnésio (MgSO₄) 0,1 M (composição: 2,4647g MgSO₄. 7 H₂O (Vetec) em 100 mL H₂O ultra pura

DNase obtida da Sigma Chemicals Corporation, St Louis, EUA código 0876 (DN-25), lote 67F- 9650, com 600 Kunitz/ mg proteína. Precisa ser diluída a 80 Kunitz/ mL, no momento do uso, em salina 0,15 M gelada pois perde a atividade em poucas horas. Definição de unidade: Uma Kunitz irá produzir a A₂₆₀ de 0,001 por minuto a pH 5,0 a 25° C usando o DNA como substrato.

Reagentes necessários na produção dos monoclonais:

Meio de RPMI (estoque)

RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato = 10,43g

HEPES 10 mM= 2,383g

Bicarbonato de sódio 24 mM= 2,016g

Qsp 1000 mL com água bi destilada (Mili Q- Ultra pura)

Preparo: Dissolver sob agitação o RPMI 1640, Hepes e bicarbonato em cerca de 900 mL de H₂O. Completar o volume para 1000mL. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em frascos de 150mL.

Armazenamento: 2 a 8 °C. Validade: 6 meses.

Meio RPMI-completo (usado durante os procedimentos)

Preparo: a 150 mL do meio RPMI estoque acrescentar:

Gentamicina (item 3.7, adiante) – 0,15 mL

Fungizone (item 3.8) – 0,15 mL

Glicose 30 % (item 3.5) – 1,5 mL

Piruvato de sódio 100 mM – 1,5 mL

Glutamina (item 3.6) – 1,5 mL

Armazenamento: 2 a 8 °C. Validade: 1 mês.

Meio RPMI simples

RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato = 10,47 g

qsp 1000 mL de H₂O ultra pura.

Preparo: dissolver sob agitação o RPMI- 1640 em cerca de 900 mL de H₂O ultra pura. A seguir completar o volume para 1000 mL. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm.

Armazenar em frascos de 150mL.

Armazenamento: 2 a 8 °C. Validade: 6 meses.

Meio RPMI – HAT completo

Meio RPMI-completo (item 3.2) – 120 mL

HT 100 x (item 10) – 1,5 mL

Aminopterina 100 x (item 3.9) – 1,5 mL

Soro fetal bovino (item 3.14) – 30 mL

Preparar na hora do uso.

Glicose 30 %

Preparo: Dissolver 30 g de glicose em cerca de 60 mL de H₂O ultra pura, e completar o volume para 100 mL. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em frascos de 3,5 mL

Armazenamento: 2 a 8 °C. Validade: 6 meses.

Glutamina 200 mM

Preparo: Dissolver 2,90 g de glutamina em 100 mL de H₂O ultra pura. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em frascos de 3,5 mL.

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 6 meses.

Gentamicina

Cada caixa contém 2 ampolas e cada ampola contém 2 mL (80 mg).

Preparo: Adicionar 6 mL de H₂O ultra pura estéril por ampola (10 mg/ mL). Fazer alíquotas de 0,4 mL e guardar protegido da luz.

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 2 anos.

Fungizone

Preparo: O frasco contendo 50 mg de fungizone é dissolvido em 50 mL de H₂O ultra pura estéril. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em alíquotas de 0,4 mL protegido da luz.

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 2 anos.

Solução de Aminopterina 100 x

Preparo: Dissolver 1,76 mg de aminopterina em cerca de 90 mL de H₂O ultra pura. Acrescentar 0,5 mL de hidróxido de sódio 1,0 N. Ajustar o volume para 100 mL e neutralizar pela adição de 0,5 mL de ácido clorídrico 1,0 N. Checar o pH (deve ficar entre 7,0 e 8,0). Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em alíquotas de 0,4 mL protegido da luz.

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 1 ano.

Solução de H T 100 x

Timidina – 19,4 mg

Hipoxantina – 68,0 mg

Qsp 50 mL de H₂O ultra pura

Preparo : Adicionar hipoxantina a cerca de 40 mL de H₂O ultra pura e aquecer em banho-maria (45 a 50 °C) durante aproximadamente 1 hora, agitando até dissolver completamente. A seguir adicionar a timidina já dissolvida à solução de hipoxantina e completar o volume para 50 mL. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em alíquotas de 1,0 mL. O congelamento das alíquotas deve ser rápido, para evitar a formação de precipitado.

Armazenamento: -18 a 23 °C. Validade: 1 ano.

Sacarose 0,34 M

Preparo: Dissolver 29,0 g de sacarose em 250 mL de H₂O ultra pura. Proceder a esterilização por filtração em filtro 0,22 µm. Armazenar em alíquotas de 5,0 mL.

Armazenamento: 2 a 8 °C. Validade: 6 meses.

Polietileno glicol (PEG) 50 %

Preparo: Dissolver 2,5 g de PEG 4000 (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 3,0 mL de RPMI simples em banho-maria (45-50 °C). Completar o volume para 5,0 mL e autoclavar.

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 1 ano.

Azul tripan

Azul tripan - 300 mg

Cloreto de sódio – 180 mg

H₂O ultra pura – 20 mL

Preparo: Dissolver o azul e o cloreto em H₂O e filtrar em papel de filtro.

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 1 ano.

Soro fetal bovino (SFB)

Armazenamento: -18 a -23 °C. Validade: 2 anos

Solução criopreservante (mantida entre 2 e 8 °C), contendo soro fetal bovino (2,5 mL), DMSO (Dimetil Sulfóxido) (1,0 mL) e Meio RPMI-simples (1,5 mL).

Preparou-se as ampolas devidamente identificadas e manteve-se entre -18 e -23 °C em caixa de isopor apropriada.