

Gabriela de Souza Nogueira

**Proteínas de leptospiras reconhecidas durante a resposta imunológica
humoral na leptospirose humana**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Caló Romero

São Paulo

2023

Gabriela de Souza Nogueira

**Proteínas de leptospiros reconhecidas durante a resposta imunológica
humoral na leptospirose humana**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Caló Romero

**Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.**

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Gabriela de Souza
Proteínas de leptospiros reconhecidas durante a
resposta imunológica humoral na leptospirose humana
/ Gabriela de Souza Nogueira. -- São Paulo, 2023.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Eliete Caló Romero.

Descritores: 1.Leptospirose 2.Leptospira
3.Antígenos 4.Proteínas 5.Testes sorológicos
6.Eletroforese em gel de poliacrilamida

USP/FM/DBD-001/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

APOIO FINANCEIRO

**Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Leptospirose do Centro de Bacteriologia do
Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.**

Apoio financeiro:

CAPES

DEDICATÓRIA

A toda minha família e meus amigos, mas especialmente minha mãe, por todo apoio em todos esses anos de estudo e por não me deixar desistir de nenhum dos meus sonhos.

Ao meu noivo, que posso contar em todos os momentos, pois além de dividirmos uma vida juntos, posso dividir a profissão também.

Em memória de meu avô e minha tia Valéria

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado sabedoria e ter me colocado próximo de pessoas incríveis e maravilhosas, em lugares que eu nunca imaginei estar.

À minha orientadora, Dr.^a Eliete Caló Romero, por toda paciência, ensinamento, conversas e conselhos ao longo desses anos. Me ensinou muito mais do que eu esperava aprender, e não apenas na área da pesquisa, mas na vida pessoal também. Obrigada pela confiança em realizar o trabalho e por toda dedicação que você teve comigo desde o começo, que mesmo no meio de uma pandemia você conseguiu me ensinar e me direcionar para que o trabalho fosse concluído sem prejuízos. Obrigada por ser essa pessoa incrível e inspiradora. Muito obrigada por tudo!

À todo o Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pela atenção e auxílio nos momentos em que eu não sabia muito onde procurar algum material ou como utilizar um equipamento. Agradecimento especial a Amanda e Ariadne, que foram minhas salvadoras por diversas vezes, e principalmente, queria agradecer a Elaine e a Roberta, por terem sido incríveis em ensinar e me ajudar sempre que eu precisasse. Obrigada a todos e a todas pelo carinho.

À Dr.^a Adriana e à Camila Mika, sem vocês não teria sido possível realizar essa pesquisa. Obrigada a Ca, por ter se deslocado no meio de uma pandemia com um neném em casa para me ensinar as técnicas em um tempo recorde e preparar todos os reagentes possíveis para que nada faltasse. Obrigada Dri, você sabe que é maravilhosa e com uma bondade sem igual, eu não tenho como te agradecer por toda a sua ajuda, tanto nos bastidores da pesquisa como na parte escrita também.

Aos meus amigos que fiz na FMUSP, obrigada por dividir comigo os momentos de angústia e alegria que tivemos durante a pós. Vocês sabem que já moram no meu coração.

À Priscilla, minha amiga, grande parceira de mestrado, parceira dos almoços, eu serei sempre grata a você por tudo, e você sabe disso. Eu não teria conseguido sem você. Você tornou tudo mais leve e divertido e foi incrível poder ver nossas evoluções de perto e poder dividir todas as emoções ao longo desses anos com você!

Ao Instituto Adolfo Lutz e a Faculdade de Medicina da USP, pela infraestrutura e por ter permitido que eu conseguisse realizar minha pesquisa e as aulas em um ambiente muito bom e amparado.

À CAPES, por ter financiado meus estudos e minha pesquisa ao longo desses anos. A bolsa foi primordial para que os experimentos e aprendizados fossem realizados com êxito e tempo hábil.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dr. Décio Diament, Dr. Amaro Nunes Duarte Neto e Dr.^a Adriana Pardini Vicentini, pela disposição de ler esse trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao meu companheiro, Alexandre, que teve muita paciência por diversos dias, esperando eu escrever, estudar, me esperando sair do laboratório. Obrigada pelo apoio, você sabe o quanto foi importante para mim ter alguém ao meu lado me incentivando e aplaudindo minha evolução.

À minha mãe, que teve um papel insubstituível em todos esses anos e que eu não consigo nem descrever em palavras o quanto eu sou grata por tudo o que você fez por mim, e ainda faz.

À minha família toda, obrigada por acreditar em mim e acreditar na ciência. Por incentivar meus estudos e por confiar que a ciência e a saúde sempre visam o bem-estar das pessoas.

Às minhas amigas de profissão, em especial quero agradecer a Isis, pela parceria no trabalho e na pesquisa também. Obrigada pela troca de conhecimentos e pelos bate papos também. Você é muito especial para mim!

Às minhas amigas de escola e faculdade, que me apoiaram e acreditaram em mim, e ainda acreditam. Obrigada pela confiança e carinho de sempre.

À todos que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, meu mais sincero muito obrigada!

RESUMO

Nogueira, G. S. Proteínas de leptospiras reconhecidas durante a resposta imunológica humoral na leptospirose humana. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A leptospirose é uma zoonose bacteriana causada por leptospiras, com surtos sazonais, principalmente em países tropicais e subtropicais. Apresenta sintomas inespecíficos dificultando o diagnóstico clínico e, portanto, o diagnóstico laboratorial da leptospirose é importante para a confirmação dos casos suspeitos e para o monitoramento da doença. As leptospiras apresentam uma vasta variedade antigênica com inúmeras proteínas em sua membrana externa. O conhecimento da resposta imunológica de pacientes com leptospirose contra essas proteínas será importante para auxiliar no desenvolvimento de metodologias para o diagnóstico e para utilização em vacinas humanas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil antigênico de 20 sorovares de leptospiras através da técnica de SDS-PAGE e avaliar a reatividade sorológica de amostras de soro de pacientes portadores de leptospirose através da metodologia de "Immunoblotting" frente a cepas patogênicas e saprófitas de leptospiras. Foram utilizados 20 sorovares de leptospiras e 19 soros reagentes de pacientes com leptospirose confirmados pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) para cada um dos sorovares exceto sorovar Pomona. Foram utilizados também quatro soros provenientes de casos de óbitos com títulos de 100 no MAT contra os sorovares Panama e Castellonis. Como controle negativo, foi utilizado 1 soro com resultado reagente para dengue e negativo para leptospirose. Através da técnica de SDS-PAGE, foi demonstrado que as frações antigênicas dos sorovares se concentraram, em sua maioria, em massa molecular entre 37-50 kDa. Também foi possível a visualização de frações entre 50-75 kDa. O "Immunoblotting" foi realizado com anticorpos anti-IgM humanos e os óbitos também com anti-IgG. O resultado da reatividade entre soros e antígenos possibilitou uma visualização de frações proteicas que variaram, em média, entre 10-15 kDa. Um caso de óbito apresentou reatividade com o sorovar Panama ao utilizar anti-IgG. Para cada antígeno de sorovar foi utilizado um soro reagente específico para esse antígeno e foi possível verificar reatividade em todos. Na membrana do

antígeno de sorovar Djasiman, o soro reagente para sorovar Cynopteri apresentou reatividade com frações proteicas de massa molecular entre 50-75 kDa. Na membrana do antígeno de sorovar Patoc, o soro reagente para sorovar Tarassovi apresentou reatividade com frações proteicas de massa molecular acima de 100 kDa. Nas membranas com antígeno dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, o soro reagente para sorovar Tarassovi também apresentou reatividade com massa molecular entre 35-50 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Sejroe, Hardjo e Wolffi, foram os que apresentaram maior reatividade entre todas as membranas dos antígenos, sendo possível visualizar mais de uma fração por massa molecular. Os resultados obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de testes para o diagnóstico sorológico da leptospirose humana e na produção de vacinas humanas, com um estudo mais aprofundado das proteínas.

Descritores: Leptospirose; *Leptospira* ssp.; Antígenos; Proteínas, Testes sorológicos; SDS-PAGE.

ABSTRACT

Nogueira, G. S. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response in human leptospirosis. [Dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2023

Leptospirosis is a bacterial zoonosis caused by leptospires, with seasonal outbreaks, mainly in tropical and subtropical countries. It presents nonspecific symptoms, making clinical diagnosis difficult and, therefore, the laboratory diagnosis of leptospirosis is important for the confirmation of suspected cases and for the monitoring of the disease. Leptospires present a wide antigenic variety with numerous proteins in their outer membrane. Knowledge of the immune response of patients with leptospirosis against these proteins will be important to the development of methodologies for diagnosis and for using in human vaccines. Thus, the objective of this work was to evaluate the antigenic profile of 20 serovars of leptospires through the SDS-PAGE technique and to evaluate the serological reactivity of serum samples from patients with leptospirosis through the immunoblotting methodology against pathogenic and saprophytes strains. Twenty serovars from leptospires and 19 sera from patients with laboratory-confirmed leptospirosis by the microscopic agglutination test (MAT) were used for each of the serovars except serovar Pomona. Four sera samples from death cases with MAT titers of 100 against the Panama and Castellonis serovars were also used. As a negative control, one serum with reactive result for dengue and negative result for leptospirosis was used. Through the SDS-PAGE technique, it was demonstrated that the antigenic fractions of the serovars were mostly concentrated in molecular weight between 37-50 kDa. It was also possible to visualize fractions between 50-75 kDa. The immunoblotting was performed with anti-human IgM antibodies and the deaths cases also with anti-IgG. The result of the reactivity between sera and antigens showed protein fractions that varied from 10 to 15 kDa. One death case showed reactivity with serovar Panama using anti-IgG. For each antigen, a specific reactive serum for that antigen was used and it was possible to verify the reactivity present in all of them. Protein fractions with molecular weight above 50 kDa were visualized on the membrane of the serovar Djasiman antigen

showed reactivity with the reagent serum for serovar Cynopteri, with fractions between 50-75 kDa. The membrane with antigen of serovar Patoc with the reactive serum for serovar Tarassovi showed reactivity with molecular weight above 100 kDa. The reactive serum for serovar Tarassovi also showed reactivity with molecular weight between 35-50 kDa on the membrane with antigen of serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni antigen. Reactive sera for serovars Sejroe, Hardjo and Wolffi showed the highest reactivity among all membranes of the antigens, with a visualization of more than one fraction by molecular weight. The results obtained should contribute to the development of tests for the serological diagnosis of human leptospirosis and to the production of vaccines for humans, in-depth study of proteins.

Keywords: Leptospirosis; *Leptospiral*; Antigens; Proteins; Serological tests; SDS-PAGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida	41
Figura 2 - Pente de 10 dentes para utilização no gel SDS-PAGE e formação de poços.....	41
Figura 3 - Pente de 1 dente utilizado no SDS-PAGE para formação de apenas 1 poço e distribuição igualitária de um antígeno	42
Figura 4 - Gel SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida do antígeno sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra redutor com concentrações em 5x e 1x e em volumes de 5, 10 e 15 µL.....	54
Figura 5 - Gel SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida do antígeno sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra redutor com concentrações em 1x e 5x e em volumes de 20, 30 e 40 µL.....	55
Figura 6 - Perfil de reatividade, por “immunoblotting”, do antígeno obtido do sorovar Copenhageni, cepa M20, solubilizado com tampão de amostra 5x redutor frente a amostras de soro de pacientes com leptospirose, na diluição 1:100.....	57
Figura 7 - Perfil de reatividade, por “immunoblotting”, do antígeno obtido do sorovar Copenhageni, cepa M20, solubilizado com tampão de amostra 1x redutor frente a amostras de soro de pacientes com leptospirose, na diluição 1:100	59

Figura 8 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com Comassie Blue, dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Sejroe, Autumnalis, Castellonis e Cynopter	61
Figura 9 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com Comassie Blue, dos sorovares Canicola, Autumnalis e Panama	63
Figura 10 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com Comassie Blue, dos sorovares Grippytyphosa, Pomona, Bataviae, Australis e Pyrogenes	64
Figura 11 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com Comassie Blue, dos sorovares Hardjo, Wolffi, Javanica, Hebdomadis, Djasiman e Patoc	66
Figura 12 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com Comassie Blue, dos sorovares Canicola e Panama.....	68
Figura 13 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Icterohaemorrhagiae e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	72
Figura 14 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Copenhageni e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	74
Figura 15 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Grippytyphosa e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	75

Figura 16 - . Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Canicola e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	77
Figura 17 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Pomona e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	78
Figura 18 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Bataviae e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100... ..	80
Figura 19 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Australis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	81
Figura 20 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Pyrogenes e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	83
Figura 21 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Tarassovi e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	84
Figura 22 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Sejroe e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	86

Figura 23 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Autumnalis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	88
Figura 24 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Hardjo e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	89
Figura 25 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Wolffi e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	91
Figura 26 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Javanica e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	92
Figura 27 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Panama e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	94
Figura 28 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Hebdomadis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	95
Figura 29 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Djasiman e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	97

Figura 30 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Castellonis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	98
Figura 31 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Patoc e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100	100
Figura 32 - Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Cynopteri e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100.....	102
Figura 33 - Reatividade dos anticorpos IgG anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Panama e soros de casos de óbito reagentes pelo MAT, na diluição 1:100.....	104
Figura 34 - Reatividade dos anticorpos IgG anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Castellonis e soros de casos de óbito reagentes pelo MAT, na diluição 1:100.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de soros reagentes para leptospirose pelo MAT, com sorovares de leptospiras	45
Tabela 2 - Soros reagentes para leptospirose pelo MAT, com sorovares de leptospiras.....	46
Tabela 3 - Reatividade de anticorpos IgM anti-leptospiras, por “immunoblotting”, do antígeno extraído do sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra 5x redutor, frente a amostras de soro de pacientes com resultado reagente e não reagente para leptospirose	58
Tabela 4 - Reatividade de anticorpos IgM anti-leptospiras, por “immunoblotting”, do antígeno extraído do sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra 1x redutor, frente a amostras de soro de pacientes com resultado reagente e não reagente para leptospirose	60
Tabela 5 - Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Sejroe, Autumnalis, Castellonis, Cynopteri em volume de 40 µL	61
Tabela 6 - Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola, Autumnalis e Panama em volumes de 30 e 40 µL.....	63
Tabela 7 - Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Grippotyphosa, Pomona, Bataviae, Australis e Pyrogenes em volume de 40 µL.....	65

Tabela 8 - Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Hardjo, Wolffi, Javanica, Hebdomadis, Djasiman e Patoc em volume de 40 µL..... **66**

Tabela 9 - Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola, Panama, Hebdomadis em um volume de 40 µL..... **68**

Tabela 10 - Reatividade entre as amostra de soro frente aos 20 sorovares..... **70**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies de leptospiros e sua classificação **29**

Quadro 2 - Cepas de leptospiros utilizadas no MAT **47**

LISTA DE ABREVIações

%	Por cento
°C	Graus Celsius
APS	Solução de Persulfato de Amônio
CAAT	“Cross-Adsorption Agglutination Test”
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CTC	Comissão Técnico-Científica
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsado
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilo Dalton
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeos
L	Litro
mL	Mililitros
MAT	Teste de Aglutinação Microscópica
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
MLVA	“Multiple-Locus VNTR Analysis”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
RPM	Rotações por minuto
RFLP	“Random Fragment Length Polymorphism”
SDS-PAGE	“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
TLR	Receptores “Toll-like”
V	Volts
WB	“Western Blotting”
OMS	Organização Mundial da Saúde

PPM Padrão de Peso Molecular

PCR Reação em cadeia pela polimerase

μL Microlitros

μm Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Histórico	27
1.2 Classificação das leptospiros	28
1.3 Leptospiros.....	30
1.4 Proteínas das leptospiros	32
1.5 Epidemiologia.....	33
1.6 Manifestações clínicas	35
1.7 Diagnóstico laboratorial	36
1.7.1. <i>Isolamento de leptospiros</i>	36
1.7.2 <i>Testes moleculares</i>	37
1.7.3 Métodos sorológicos	38
1.8 Métodos para separação e imunodeteção de proteínas.....	40
1.8.1 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE</i>	40
1.8.2. "Immunoblotting"	42
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo Geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Amostras de soros	44

3.2	Cepas de leptospiras.....	46
3.3	Obtenção dos antígenos	47
3.4	Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)	48
3.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	49
3.6	“Immunoblotting”	50
3.7	Padronizações.....	51
3.7.1	Cepa de leptospira	51
3.7.2	Determinação das condições para obtenção dos antígenos	52
3.7.3	Determinação do volume de antígeno para a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	52
3.7.4	Padronização do volume de antígeno na eletroforese em gel de poliacrimamida SDS-PGE para utilização no “immunoblotting”	52
3.8	Considerações Éticas.....	53
4.	RESULTADOS PADRONIZAÇÕES	54
4.1	Volume de antígeno na eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	54
4.2	Reconhecimento das frações antigênicas do antígeno obtido a partir do sorovar Copenhageni, por “immunoblotting”, solubilizado com tampão de amostra 5x redutor	56
4.3	Reconhecimento das frações antigênicas do antígeno obtido a partir do sorovar Copenhageni, por “immunoblotting”, solubilizado com tampão de amostra 1x redutor	58

5. RESULTADOS GEL SDS-PAGE.....	60
5.1 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Sejroe, Autumnalis, Castellonis e Cynopteri	60
5.2 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola, Autumnalis e Panama.....	62
5.3 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Grippotyphosa, Pomona, Bataviae, Australis, Pyrogenes e Tarassovi em volume de 40 µL.....	64
5.4 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Hardjo, Wolffi, Javanica, Hebdomadis, Djasiman e Patoc	65
5.5 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola e Panama	67
6. RESULTADOS “IMMUNOBLOTTING”	69
6.1 Resultados da imunoreatividade por “immunoblotting” das amostras de soros de pacientes com leptospirose frente a diferentes sorovares.....	69
6.1.1 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Icterohaemorrhagiae	72
6.1.2 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Copenhageni.....	73
6.1.3 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Grippotyphosa	75

6.1.4 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Canicola	76
6.1.5 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Pomona.....	78
6.1.6 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Bataviae	79
6.1.7 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Australis.....	89
6.1.8 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Pyrogenes	82
6.1.9 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Tarassovi.....	83
6.1.10 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Sejroe	85
6.1.11 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Autumnalis.....	87
6.1.12 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Hardjo.....	101
6.1.13 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Wolffi.....	90
6.1.14 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Javanica.....	92

6.1.15	Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Panama.....	93
6.1.16	Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Hebdomadis.....	95
6.1.17	Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Djasiman.....	96
6.1.18	Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Castellonis.....	98
6.1.19	Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Patoc.....	100
6.1.20	Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Cynopteri.....	101
6.2.	Imunoreatividade dos casos de óbito com IgG	103
6.2.1	Amostras de soro provenientes de casos de óbito frente ao antígeno de sorovar Panama e anticorpo anti-IgG.....	103
6.2.2	Amostras de soro provenientes de casos de óbitos frente ao antígeno do sorovar Castellonis e anticorpo anti-IgG	104
7.	DISCUSSÃO	116
8.	CONCLUSÃO	116
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
10.	APÊNDICE.....	128

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias conhecidas como leptospiras, mundialmente conhecida¹, com surtos sazonais, principalmente em países tropicais e subtropicais².

A doença foi descrita primeiramente pelo professor de medicina Adolf Weil, na cidade de Heidelberg, na Alemanha, em 1886 observando alguns casos que ocorreram entre 1882 e 1870, com sintomas graves, tais como icterícia e hemorragia pulmonar. Weil (1886)^{*1} apud Alston e Brown³, também observou que durante anos, esses sintomas graves, chamados de Síndrome de Weil, acometiam os pacientes, porém, ainda não se sabia ao certo o que causava a doença em si. Somente em 1907, foi realizado um estudo em rins e verificada as características da bactéria, como a presença de gancho e seu formato em espiral. Foi sugerido nomeá-las de *Spirocheta interrogans*⁴.

No Japão, em 1915, foi descoberto que a causa da Síndrome de Weil era causada por uma espiroqueta que fazia parte da espécie *S. interrogans*, a *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*⁵. Em 1917, percebeu-se que existia a forma de transmissão entre roedores e humanos, assim como a contaminação em cachorros⁶. Nessa época, Hideyo Noguchi ao observar o formato mais detalhadamente das bactérias, renomeou como leptospiras⁷.

Em Londres, 1934, houve um interesse maior na doença por aparecer diversos trabalhadores que começaram a se infectar. Achados sorológicos mostraram

¹ Weil A. Deutsches Arch. f. klin. Med., 39, 209, 1886.

que existiam casos que, mesmo após anos recuperados, os pacientes apresentavam aglutinação no sangue, o que poderia indicar que não haveria possibilidade para uma recontaminação⁸.

Cada vez mais a ciência conseguia avançar no descobrimento de mais informações sobre essas bactérias e como funcionava seu crescimento. As leptospiros foram divididas em duas espécies: as patogênicas foram classificadas como *Leptospira interrogans* e as saprófitas foram classificadas como *Leptospira biflexa*⁹.

Em relação ao crescimento das bactérias, notou-se que as patogênicas eram inibidas na presença do antimetabólico de purina 8-azaganina, ao contrário das saprófitas, que conseguiam crescer¹⁰.

1.2 Classificação das leptospiros

Leptospira spp. pertencem à ordem Spirochaetales, e à família Leptospiraceae, que compreende três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella*^{12,13}. Pela classificação sorológica o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que compreendem leptospiros patogênicas e *Leptospira biflexa*, que são saprófitas^{4,11,12}.

Atualmente, o gênero *Leptospira* também pode ser dividido em genomoespécies¹², que consistem em leptospiros patogênicas, não patogênicas e intermediárias¹⁴. As leptospiros conhecidas como intermediárias são aquelas que possuem patogenicidade não definida⁴. O quadro 1 mostra a classificação das genomoespécies das leptospiros.

Quadro 1. Espécies de leptospiros e sua classificação

Espécie	Característica
<i>L. interrogans</i>	Patogênica
<i>L. kirschneri</i>	Patogênica
<i>L. noguchii</i>	Patogênica
<i>L. borgpetersenii</i>	Patogênica
<i>L. weilii</i>	Patogênica
<i>L. santarosai</i>	Patogênica
<i>L. alexanderi</i>	Patogênica
<i>L. alstonii</i>	Patogênica
<i>L. kmetyi</i>	Patogênica
<i>L. mayottensis</i>	Patogênica
<i>L. wolffii</i>	Intermediária
<i>L. licerasiae</i>	Intermediária
<i>L. inadai</i>	Intermediária
<i>L. fainei</i>	Intermediária
<i>L. wolbachii</i>	Não patogênica
<i>L. meyeri</i>	Não patogênica
<i>L. biflexa</i>	Não patogênica
<i>L. vanthieli</i>	Não patogênica
<i>L. terpstrae</i>	Não patogênica
<i>L. yanagawae</i>	Não patogênica
<i>L. idonii</i>	Não patogênica

Fonte: Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol.* 2017;20(4):184–93.

A espécie *L. interrogans* compreende 24 sorogrupos⁴, sendo eles: Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Grippytyphosa, Canicola, Australis, Pomona, Javanica, Sejroe, Panama, Cynopteri, Djasiman, Sarmin, Mini, Tarassovi, Ballum, Celledoni, Louisiana, Ranarum, Manhao, Shermani, Hurstbridge¹², e mais de 300 sorovares^{4,15}, enquanto que *L. biflexa* compreende 38 sorogrupos com mais de 60 sorovares¹². Pela análise de sua constituição antigênica, por meio de reações de absorção cruzada de aglutininas (CAAT), as leptospiros são divididas em

um grande número de sorovares sendo que dois ou mais sorovares, antigenicamente relacionados, formam um sorogrupo¹².

1.3 Leptospiras

São bactérias em formato espiral com suas extremidades em forma de gancho, aeróbias medindo de 0,1µm até 20 µm (micrometro), e possuem dois flagelos periplasmáticos o que facilita a rotação e mobilidade^{12,13}.

Possuem dupla membrana^{12,16} e em sua camada externa conta com a presença de LPS (lipopolissacarídeos), que protege o conteúdo citoplasmático garantindo assim a sobrevivência das leptospiras¹⁷. Esse LPS, considerado um fator de virulência¹⁸ é característico de bactérias Gram-negativas, assim como a presença de lipídio A e polissacarídeo, sendo que o lipídio A das leptospiras possui composição bioquímica diferente das outras bactérias Gram-negativas, o que faz com que o sistema imune humano não as reconheça como componente do LPS¹⁹.

Essa complexidade das leptospiras faz com que o método de coloração de Gram não seja eficaz para visualização das bactérias, sendo necessário utilizar coloração com nitrato de prata, que consegue remover a camada protetora que se encontra na membrana externa das leptospiras¹².

A célula das leptospiras tem inúmeras proteínas em sua membrana externa, que agem diretamente no sistema imune do paciente²⁰. Os receptores “Toll-like” (TLR) estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, como LPS (TLR4), peptidoglicanos e lipoproteínas (TLR1, TLR-2 e TLR6), RNA viral (TLR3), nucleotídeos guanosina-citosina (G-

C) não-metilados bacterianos ou virais (TLR9)²¹. Quando esses receptores são estimulados, há expressão de citocinas, quimiocinas e proteínas celulares de membrana relacionadas à resposta inflamatória²².

O LPS das bactérias Gram negativas ativa o TLR4, resultando numa resposta pró-inflamatória dependente de quimiocinas e citocinas. Leptospiras, entretanto, possuem LPS com potencial endotóxico menor e ativam macrófagos humanos através de TLR2 ao invés de TLR4^{23,24}. Dessa forma, é possível que haja uma falha no reconhecimento do LPS fazendo com que os seres humanos sejam suscetíveis à infecção¹⁸.

As leptospiras crescem bem em meios artificiais. O meio mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), enriquecido com 10% de albumina bovina, que exerce função desintoxicante¹³. O crescimento ocorre de forma lenta, necessitando de incubação de, pelo menos 7 dias, em temperatura entre 28°C a 30°C¹². As leptospiras não fermentam açúcares, e por isso utilizam os ácidos graxos de cadeia longa, com mais de 15 carbonos como fonte de energia²⁵.

São resistentes ao 5-fluorouracil, que controlam possíveis contaminações por microrganismos, sem alterar o metabolismo das leptospiras, fazendo com que assim possa haver um crescimento puro. Em ambientes não propícios ou com falta de nutrientes, as leptospiras podem entrar em estresse e ter alteração no crescimento populacional e na morfologia²⁶.

1.4 Proteínas das leptospiras

As proteínas das leptospiras são conhecidas por apresentar uma vasta variedade antigênica de lipoproteínas e lipopolissacarídeo. A dupla membrana das leptospiras¹² e a camada de LPS faz com que o componente existente apenas no lipídio A das leptospiras reforce ainda mais sua estrutura e fortaleça o microrganismo contra a resposta de defesa do corpo humano, já que a resposta imune humana não consegue detectar esse lipídio A das leptospiras²⁰. A lipoproteína LipL32 é a proteína que está presente em todas as leptospiras^{27,28} sendo um antígeno imunodominante²⁹, com peso de 32 quilodalton (kDa)³⁰.

Através de testes de eletroforese unidimensional foi analisado que a membrana externa das leptospiras é formada por algumas proteínas²⁸, como por exemplo a LipL46²⁹, GroEL¹⁹, OmpL1 com peso de 30 kDa²⁸, DnaK¹⁹, e LipL36, que após entrar no corpo do hospedeiro, perde sua capacidade patogênica¹². O peso molecular das leptospiras quando relacionadas com antissoro de coelho podem variar de 17 kDa até 35,5 kDa^{20,30}. Lafetá⁽²⁰⁾, utilizando eletroforese em gel, encontrou as bandas proteicas do sorovar Hardjoprajitno, sendo a banda de peso molecular 63 kDa chamada de LipL63, a banda 47 kDa de LipL48, 26 a 30 kDa de LipL32, 22 kDa de LipL22, 34,41 kDa de PME34, 42,75 kDa de LipL41 e 58,59 kDa de LipL63. No estudo apenas das bandas proteicas do antígeno de leptospira na eletroforese, as frações encontradas foram em torno de 25 kDa até 95 kDa, e quando adicionado o soro no “immunoblotting” o perfil proteico reconhecido variou de 25 kDa até 42,7 kDa²⁰.

Assim como a vasta variedade antigênica das leptospiras dificulta no diagnóstico preciso, também influencia na produção de uma vacina humana eficaz e específica para a leptospirose^{12,31}. As vacinas para a leptospirose existentes são apenas para uso veterinário, e ainda assim possuem falta de imunidade a longo prazo, necessitando ser reaplicada anualmente¹². A resposta imune gerada pelas vacinas disponíveis se deve à fração LPS da membrana externa bacteriana. Como foram identificados mais de 300 sorovares de *Leptospira* spp., a eficácia dessas vacinas é limitada. Desse modo, têm-se tentado identificar novos alvos imunogênicos que induzam imunoproteção cruzada contra os sorovares patogênicos³².

A resposta imunológica, em pacientes com leptospirose contra as proteínas de leptospiras foram estudadas com poucos sorovares e poucas amostras de soro, e, portanto, se faz necessário estudar essa resposta imunológica com um número maior de sorovares para conhecer quais frações proteicas dos sorovares são reconhecidas por soros humanos. Esse conhecimento será importante para auxiliar no desenvolvimento de metodologias para o diagnóstico da leptospirose e para utilização em vacinas humanas.

1.5 Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose que acontece principalmente em regiões subtropicais e tropicais ao redor do mundo^{2,12}, de forma sazonal, em épocas chuvosas, principalmente pelo fato de que as leptospiras precisam de locais com temperaturas quentes¹² e também por conseguirem sobreviver no solo e água, principalmente em locais com saneamento básico precário³³.

O homem é um hospedeiro acidental e a transmissão pode ocorrer diretamente, através do contato com sangue, urina ou órgãos de animais infectados ou indiretamente através de água e solo úmido contaminados com urina de animais infectados. As leptospiras podem penetrar através de mucosas, lesões na pele ou pele íntegra quando imersa em água por um período de tempo longo¹².

A forma de transmissão mais comum em cidades urbanas é através do contato humano com a urina de ratos infectados com leptospiras. Além dos roedores, outros animais como cães, porcos, vacas^{12,13} podem ser reservatórios naturais³⁴ das leptospiras. Os roedores são considerados portadores “sãos” e apresentam leptospiúria prolongada, eliminando leptospiras vivas no ambiente e contaminando solos, água e alimentos³⁵. As leptospiras se instalam nos túbulos renais³⁶ dos hospedeiros e conseguem colonizar¹².

No ambiente natural, as leptospiras conseguem sobreviver em ambientes quentes e úmidos, seja na água, solo, ou qualquer outro meio onde possa haver crescimento favorável para elas¹³.

Os trabalhadores que estão expostos a ambientes contaminados como profissionais de laboratórios, esgoto, minas, agricultores, veterinários, açougueiros¹⁵, áreas de alagamento³⁴ ou atividades de recreação correm maior risco de adquirir a doença. Contaminação por mordidas de animais são extremamente raras¹².

No Brasil a leptospirose é endêmica, com ocorrência após enchentes e inundações e está diretamente relacionada à falta de saneamento básico e às altas infestações de roedores. A questão socioeconômica e sanitária¹³, de

idades brasileiras como São Paulo^{27,28} e Salvador³⁷, são fatores que contribuem para casos de leptospirose, com incidência de 0,53 por 100.00 habitantes dos anos de 1970 a 1996²⁸. De acordo com a revisão sistemática obtida por Costa et al. (2015), entre janeiro de 1970 até outubro de 2008, estima-se que anualmente o número de casos mundial foi de 1.03 milhões²⁹.

Os sorogrupos mais prevalentes em São Paulo são: Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani, Tarassovi³⁷.

1.6 Manifestações clínicas

Após ocorrer a transmissão, as leptospirosas possuem capacidade de migrar através do sangue para diversos órgãos e tecidos^{27,38}, além de se multiplicarem e aderirem aos túbulos renais³⁶, o que pode agravar a leptospirose humana³⁸, causando no paciente sintomas graves e até mesmo podendo ser fatal^{12,25}.

O período de incubação é de 1 a 30 dias, ocorrendo mais frequentemente entre o quinto e o décimo quarto dia^{13,29}. Os primeiros sintomas que ocorrem são muito semelhantes a outras doenças, como febre amarela, hepatites, dengue, conjuntivite hemorrágica, hemorragia pulmonar, influenza¹², entre muitos outros, o que pode prejudicar no diagnóstico e tratamento³⁹.

A leptospirose apresenta uma evolução bifásica que é dividida em fase precoce e fase tardia. A fase precoce, também chamada de anictérica¹² ou leptospirêmica⁴⁰, pode ser assintomática ou apresentar sintomas leves, e normalmente se apresentam nos primeiros dias de infecção, por volta do 3º dia

até uma semana¹³, e são similares a outras doenças como febre^{12,39} de 39° C¹³, dor de cabeça, calafrios, mialgia, entre outros sintomas¹². É nessa fase que as leptospiros podem ser encontradas na circulação sanguínea e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR)¹².

Já a fase tardia, também chamada de icterica¹² ou imune⁴⁰, apresenta os sintomas mais graves da doença¹². Alguns pacientes evoluem para quadros mais graves e apresentam sintomas mais severos, chamados de Síndrome de Weil^{3,12}, com características como presença de icterícia, hemorragia pulmonar, problemas renais e hepáticos, meningite, complicações oculares, insuficiência respiratória, miocardite e assim, pode levar o paciente ao óbito^{12,13}.

1.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é importante para a confirmação dos casos suspeitos e para o monitoramento da doença. Pode ser feito através do isolamento do agente etiológico, de técnicas moleculares para detecção do DNA e de métodos sorológicos.

1.7.1. Isolamento de leptospiros

O isolamento de leptospiros é de grande importância, uma vez que pode identificar os sorovares circulantes e confirmar casos suspeitos. Tem importância nas investigações epidemiológicas, sendo essencial para a identificação do sorovar envolvido em surtos ou epidemias. Esse conhecimento auxilia na elaboração de políticas para o controle da doença.

Devido ao crescimento lento de leptospiros, a cultura pode demorar até quatro meses para apresentar um resultado definitivo. A cultura é realizada com

materiais biológicos, como sangue, LCR e urina¹³, semeados em meios semissólidos, como Fletcher e EMJH. Como na primeira semana da doença as leptospiras encontram-se na corrente sanguínea¹² é nesse período que deve ser feita a coleta de sangue ou de LCR. A urina deve ser coletada a partir do décimo dia da doença, período em que as leptospiras estão nos rins e sendo excretadas de forma intermitente.

A identificação sorológica de leptospiras é feita pelo método CAAT (“Cross-Adsorption Agglutination Test”). Esse método é laborioso e caro, uma vez que os painéis de soro hiperimune não estão disponíveis comercialmente e devem ser produzidos e caracterizados pelos laboratórios de referência. Painéis de anticorpos monoclonais podem ser usados para a sorotipagem, mas sua produção também é técnica e financeiramente dispendiosa, limitando sua aplicabilidade^{12,13}.

A tipagem molecular de referência pode ser realizada pelos métodos de hibridização de DNA¹² e/ou sequenciamento completo do gene 16S rRNA. Outras técnicas moleculares tais como RFLP (“Random Fragment Length Polymorphism”)⁴¹, AP-PCR (“Arbitrarily Primed-PCR”)⁴², Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)⁴³, MLST (“Multilocus Sequence Typing”)⁴⁴, MLVA (“Multiple-Locus VNTR Analysis”)⁴⁵, já foram descritas. Porém, essas técnicas não são capazes de distinguir genótipos relacionados, mas classificados em diferentes sorovares.

1.7.2 Testes moleculares

Diversos métodos para a detecção do DNA bacteriano em materiais biológicos foram descritos. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional e

em tempo real é um método muito sensível e confiável¹³, porém necessita de infraestrutura laboratorial e equipamentos especializados, que encarecem o teste, além de não fornecer a identificação do sorovar infectante

1.7.3 Métodos sorológicos

Os anticorpos são detectáveis no sangue aproximadamente cinco a sete dias após o início dos sintomas. Portanto, técnicas sorológicas devem ser realizadas a partir desse período. Os métodos sorológicos podem ser gênero-específicos e sorogrupo-específicos¹². Entre os métodos gênero-específicos estão os testes ELISA IgM, testes tipo “Dipstick”⁴⁶, Imunocromatografia de Fluxo Lateral⁴⁷ e Contraímuno-eletoforese⁴⁸.

O teste de ELISA detecta anticorpos IgM ou IgG. No Brasil o teste utilizado como triagem é o teste ELISA IgM Panbio® *Leptospira* IgM ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Austrália), que é distribuído pela Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB).

O MAT, recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é um teste sorogrupo-específico e é considerado o teste padrão ouro para leptospirose^{12,13}. É um teste de aglutinação realizado em microscopia de campo escuro que confirma os casos de leptospirose e que fornece o provável sorogrupo infectante. Para confirmação de caso, é necessário que tenha variação de quatro vezes no título de anticorpos no MAT, em amostras pareadas colhidas com um intervalo de uma semana entre os dias de coleta, ou títulos maior ou igual a 800 em casos de apenas uma amostra¹². Quando não há variação nos títulos em amostras pareadas ou quando as amostras únicas apresentam títulos abaixo de 400 são considerados como casos

presuntivos. Considera-se como provável sorogrupo infectante o que apresentar maior título no teste. No caso de mais de um sorogrupo apresentar o maior título é considerado como inconclusivo.

É um teste complexo e trabalhoso realizado principalmente em laboratórios de referência por utilizar várias leptospiros patogênicas vivas representantes dos principais sorovares circulantes e necessitar de leitura da aglutinação em microscopia de campo escuro.

1.8 Métodos para separação e imunodeteção de proteínas

1.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é um método de separação que permite a quantificação de bandas em géis, fornecendo separação, alta resolução e quantificação, levando a resultados precisos e reprodutíveis. É uma técnica de fácil execução, rápida e de baixo custo. A PAGE com o desnaturante duodecil sulfato de sódio (SDS) é um método muito utilizado no estudo de proteínas para a determinação da massa molecular ou tamanho das proteínas e é capaz de separar essas moléculas de tamanhos moleculares entre 10 e 200 kDa⁴⁹. A concentração de acrilamida é o que determina o tamanho dos poros no gel. Quanto maior for a concentração de acrilamida, menores serão os poros. Um gel com concentração de 10% pode reconhecer frações proteicas entre 80 kDa a 200 kDa⁴⁹. A utilização de um agente redutor, como o β -mercaptoetanol que promove o rompimento das ligações dissulfeto das proteínas, facilita o acesso do SDS, conduzindo à normalização da carga e da forma das proteínas⁵⁰. Dessa forma, o elemento de distinção entre essas moléculas é a massa molecular.

A maioria das proteínas apresenta mobilidade em tampão contendo SDS e o uso desta técnica permite a determinação das massas moleculares de proteínas através da mobilidade eletroforética das mesmas. A identificação das proteínas separadas por SDS-PAGE pode ser realizada pela comparação da sua mobilidade no gel e da massa molar de proteínas padrão⁵¹.

A figura 1 mostra o esquema de separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A divisão de cada poço é formada através dos dentes do pente utilizado durante a polimerização do gel, podendo ser um pente de 10 dentes (figura 2) ou pente de apenas 1 dente (figura 3). O pente de 10 dentes é utilizado para que em cada poço possa ser adicionado um antígeno diferente no mesmo gel. O pente de 1 dente é utilizado para que um único antígeno se espalhe pelo gel de forma uniforme, para que possa ser transferido para uma membrana, no processo de “immunoblotting”.

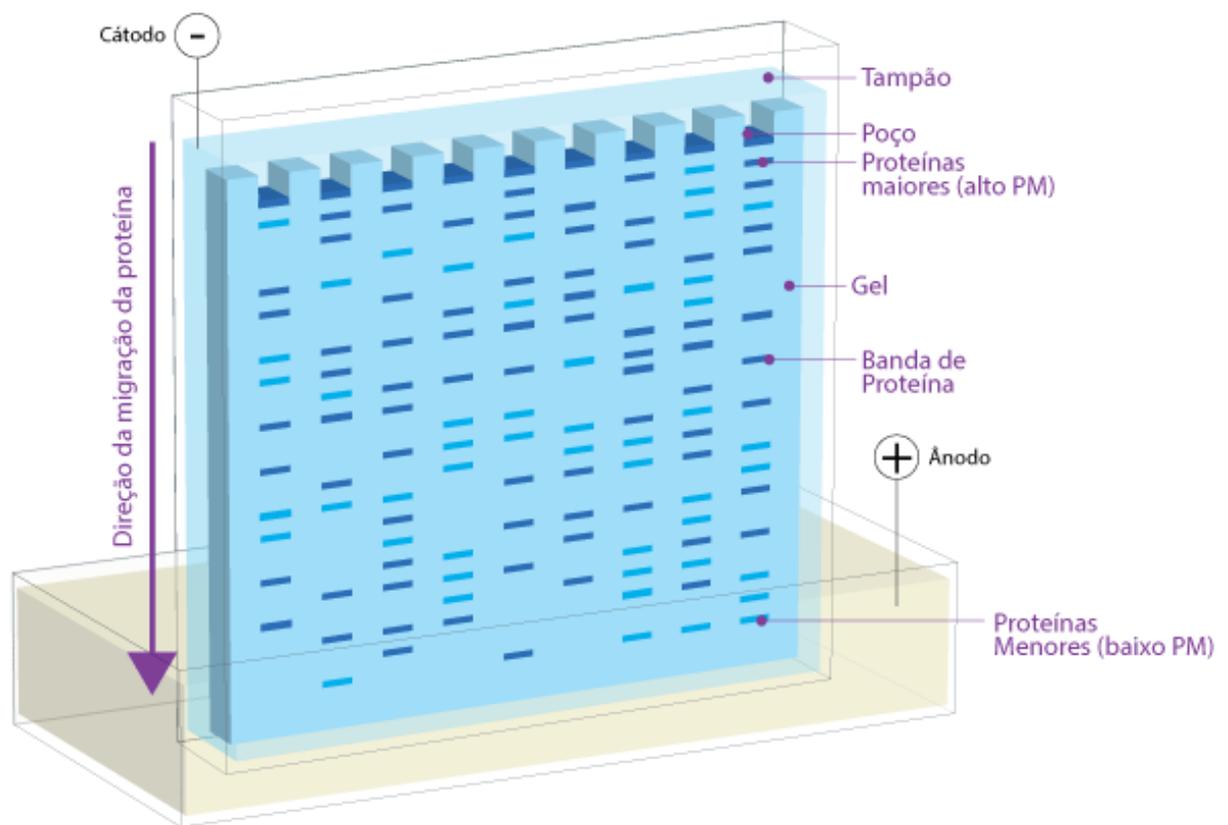


Figura 1. Esquema de separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Fonte: Kasvi - Produtos e Equipamentos para laboratórios [<https://kasvi.com.br/western-blotting-analise-proteinas>]

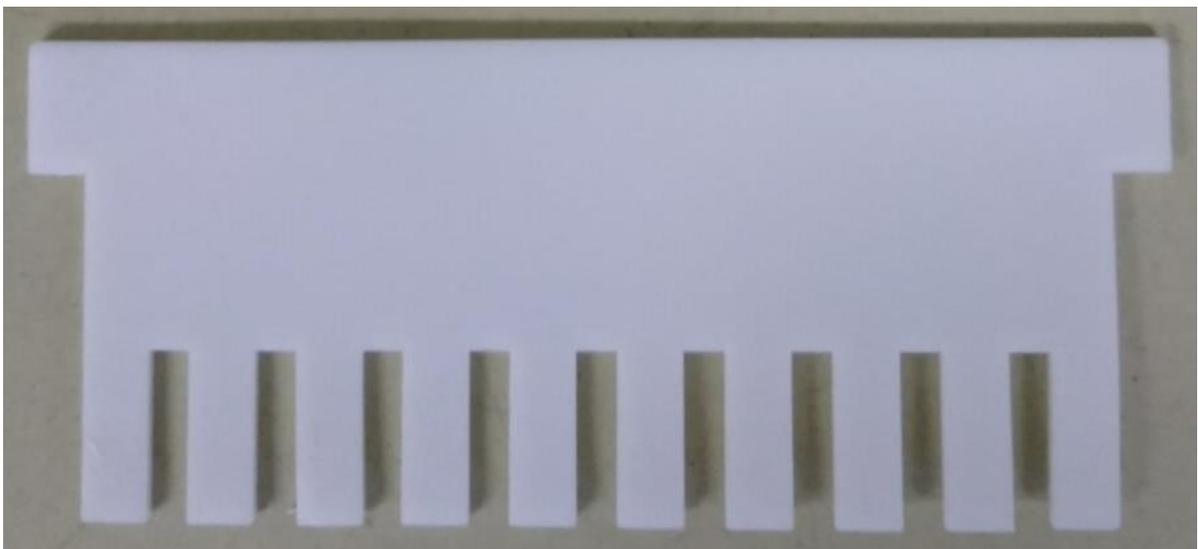


Figura 2. Pente de 10 dentes para utilização no gel SDS-PAGE e formação de poços. Fonte: Arquivo pessoal



Figura 3. Pente de 1 dente utilizado no SDS-PAGE para formação de apenas 1 poço e distribuição igualitária de um antígeno.
Fonte: Arquivo pessoal

1.8.2. "Immunoblotting"

"Immunoblotting" também conhecido como "Western Blotting" (WB) ou "protein blotting" é uma técnica utilizada para imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente. Este método permite detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente aquelas que estão em baixas quantidades. Este método é considerado altamente sensível e específico em estudos relacionados à detecção de anticorpos e proteínas de agentes infecciosos⁵². As membranas são de fácil manuseio por serem maleáveis, as proteínas imobilizadas na membrana são acessíveis a diferentes ligantes, a mesma proteína transferida pode ser usada para múltiplas análises sucessivas, com diferentes soros e conjugados. Além disso, uma pequena quantidade de reagentes é necessária para a análise de transferência, e o armazenamento pode ser prolongado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar através da metodologia de “Immunoblotting” o perfil de reatividade sorológica das amostras de soro de pacientes com leptospirose.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar as metodologias de SDS-PAGE e “Immunoblotting” visando avaliar a reatividade de pacientes com leptospirose frente a cepas patogênicas e saprófitas de leptospirosas;
- Avaliar, por SDS-PAGE, o perfil proteico de 20 sorovares de leptospirosas;
- Avaliar, por “Immunoblotting”, a capacidade das amostras de soro de pacientes com leptospirose em reconhecer diferentes frações proteicas de cepas patogênicas ou saprófitas de leptospirosas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no Instituto Adolfo Lutz Central, em São Paulo, no Laboratório de Leptospirose, do Centro de Bacteriologia.

3.1 Amostras de soros

Através do banco de soros do laboratório de leptospirose do Instituto Adolfo Lutz, foram selecionados, para a padronização do teste de “immunoblotting”, 6 casos de leptospirose com primeira amostra de soro não reagente e segunda amostra reagente para leptospirose pelo MAT. Como controle negativo, segundo critério estabelecido pelo Guia de Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico⁴⁰, foi utilizado um soro de paciente com resultados não reagentes para leptospirose pelos testes de ELISA IgM e MAT e como controle positivo um soro reagente para os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. A tabela 1 representa os 6 casos de leptospirose e a reatividade dos soros em relação aos sorovares.

Tabela 1. Casos de soros reagentes para leptospirose pelo MAT, com sorovares de leptospiras

Caso	Amostra	Resultado do MAT	Titulos
1	1a	Não reagente	-
1	2a	Copenhageni	1.600
2	1a	Não reagente	-
2	2a	Djasiman e Cynopteri	100
3	1a	Não reagente	-
3	2a	Copenhageni	6.400
4	1a	Não reagente	-
4	2a	Copenhageni	800
5	1a	Não reagente	-
5	2a	Cynopteri	200
6	1a	Não reagente	-
6	2a	Copenhageni	400
7	Controle positivo	Icterohaemorrhagiae e Copenhageni	1600
8	Controle negativo	Não reagente	-

(-) soro não reagente para leptospirose pelo MAT

Após padronização, foram selecionados 19 soros reagentes de pacientes com leptospirose, cada um reagente para cada uma das cepas utilizadas no MAT, com exceção do sorogrupo Pomona, por não ter soro reagente para esse sorovar no banco de soros do laboratório de leptospirose. Foram também selecionados quatro soros provenientes de óbitos com apenas uma amostra e títulos de 100 no MAT contra os sorovares Panama e Castellonis. Como controle negativo, foi utilizado 1 soro com resultado reagente para dengue e negativo para os testes ELISA IgM e MAT.

Tabela 2. Soros reagentes para leptospirose pelo MAT, com sorovares de leptospiras

Soro	Resultado do MAT	Titulos
1	Icterohaemorrhagiae	1.600
2	Copenhageni	3.200
3	Grippotyphosa	800
4	Canicola	12.800
5	Bataviae	3.200
6	Australis	800
7	Pyrogenes	6.400
8	Tarassovi	200
9	Sejroe	6.400
10	Autumnalis	1.600
11	Hardjo	6.400
12	Wolffi	1.600
13	Javanica	1.600
14	Panama	25.600
15	Hebdomadis	800
16	Djasiman	200
17	Castellonis	1.600
18	Patoc	200
19	Cynopteri	25.600
Óbito	Panama	100
Óbito	Castellonis	100
Controle negativo	Soro reagente para dengue	-

(-) soro não reagente para leptospirose pelo MAT

Todas as amostrass foram aliquotados em um volume de 500 µL retirados do tubo original e armazenados em temperatura de 4°C.

3.2 Cepas de leptospiras

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e o “Immunoblotting” foram utilizadas 20 cepas conforme quadro 2. Armazenadas a 30°C no laboratório durante 7 dias, com repiques feitos semanalmente em meio EMJH com 10% de enriquecimento EMJH (Difco). Dentre as 20, destacam-se as mais prevalentes em São Paulo^{34,37}: Icterohaemorrhagie cepa RGA, Copenhageni cepa M20, Canicola cepa Hond Utrecht, Sejroe cepa M84, Autumnalis cepa

Akiyami A, Castellonis cepa Castellon 3, Cynopteri cepa 3522 C, Panama cepa CZ 214 K, e Patoc cepa Patoc 1.

Quadro 2. Cepas de leptospiras utilizadas no MAT

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

3.3 Obtenção dos antígenos

O antígeno foi extraído com centrifugações e a solubilizado segundo Pope & Johnson (1991).

Para extração, cada cepa foi diluída até a turbidez atingir a escala 1 de Mac Farland. Em seguida, a cepa foi centrifugada a 10.000 rpm, a 4°C por 30 minutos, e então, o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuspendido em 1,0ml de água ultrapura tipo I e realizado o processo de centrifugação a

4.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente por 3 vezes. Finalizada esta etapa, o sobrenadante foi mais uma vez descartado e o pellet ressuspenso em 1,0 ml de PBS 7,4 1x, sendo centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente por 2 vezes. Em seguida, foi solubilizado com 100 µL de tampão de amostra redutor 1x e 5x. Foi aquecido a 100°C por 10 minutos e armazenados a 4°C⁵³.

3.4 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)

O MAT foi feito de acordo com o as recomendações da OMS³⁹, utilizando os sorovares representantes dos principais sorogrupos prevalentes no Estado de São Paulo (quadro 2). As cepas foram gentilmente cedidas pela coleção de leptospira (CLEP) do Centro de Referência Nacional em Leptospirose, Fiocruz-RJ, Brasil, e da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz mantidas no laboratório de leptospirose do Instituto Adolfo Lutz Central.

As amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de leptospirose foram diluídas na proporção de 1:50, em solução salina com tampão do tipo Sørensen. Em uma placa de Poliestireno com 96 poços de fundo chato, para microaglutinação, foram colocados 50 µL de cada soro diluído frente a 50 µL de cada uma das cepas utilizadas, obtendo-se uma diluição de 1:100. As placas foram incubadas a 30°C durante 2 horas. Em seguida, foi realizada a leitura utilizando microscópio munido de dispositivo para campo escuro (Olympus BX 51). O grau de aglutinação foi avaliado através da escala de cruces, de 1 cruz até 4, sendo 1 cruz quando 25% da leptospiros aglutinaram, 2 cruces quando 50% aglutinaram, 3 cruces quando 75% aglutinaram e 4 cruces quando houve 100% de aglutinação. Aglutinações de 2 cruces ou mais foram consideradas

positivas. As amostras de soro consideradas positivas foram submetidas à titulação com os respectivos antígenos que foram reagentes, em diluição seriada de razão dois. A diluição da amostra capaz de aglutinar 50% das leptospiras foi considerada como ponto final da reação.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada segundo Laemmli⁵¹. O gel de separação (“Running Gel”) consistiu de 12,5 % de acrilamida, SDS 10%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, APS (Solução de Persulfato de Amônio) 10% e TEMED (Tetrametiletenodiamina) e um gel de concentração (“Stacking Gel”) contendo 3% de acrilamida, SDS 10%, Tris-HCl 1 M pH 6,8, APS 10% e TEMED.

Para a corrida eletroforética, foi adicionado tampão de amostra redutor 5x no antígeno, na proporção 1:4, e então, foi aquecido a 100° C por 3 minutos.

Após a polimerização, realizado em 40 minutos a temperatura ambiente e mais 30 minutos em estufa a 30° C, os géis foram adicionados na cuba para corrida eletroforética com tampão de corrida pH 8,3, contendo Glicina, Trizma base, SDS, e água ultrapura tipo I. Como Padrão de Peso Molecular (PPM) foi utilizado o “Precision Plus Protein™ All Blue Standards” de 10-250 KDa Bio-Rad®.

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 80V por 10 minutos para correr o gel de empilhamento e 100V para o antígeno percorrer o gel de separação, aproximadamente por 1h e meia. As corridas foram

realizadas empregando o equipamento “Mini Protean II Eletrophoresis Cell”(Bio Rad Laboratories, California, USA).

Após o término da corrida, os géis realizados para visualização das bandas proteicas foram retirados do sistema e corados com o corante “Coomassie Brilliant Blue” por 24 horas. Os géis foram descorados com solução descorante composta de ácido acético glacial, etanol, e água ultrapura tipo I, em plataforma agitadora tipo gangorra duas horas. Em seguida, o descorante foi filtrado em carvão ativado e recolocado conforme necessidade, até que bandas proteicas nos géis apresentassem uma boa visualização. Já os géis confeccionados para realização do “immunoblotting”, foram retirados do sistema de corrida eletroforética e transferidos para o sistema de transferência do “immunoblotting”.

3.6 “Immunoblotting”

Imediatamente, após a separação das frações proteicas em gel de poliacrilamida foi realizada a transferência eletroforética para membranas de nitrocelulose de 45um (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA). O sistema de transferência continha papel filtro e esponjas de poliuretano, embebidos em tampão de transferência 1x, composto por Tris-HCl, glicina, água ultrapura tipo I e metanol. A transferência foi realizada empregando a voltagem constante de 30V por 18h a 4°C, usando equipamento “Trans-Blot System” (Bio Rad Laboratories, California, USA).

Após esse período os géis foram descartados e a membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por 10 segundos para a avaliação da eficácia da transferência na membrana. As

membranas então foram lavadas 2x com PBS 7,4 bloqueadas com a solução de bloqueio PBS leite em pó desnatado 5% por 2h em plataforma agitadora tipo gangorra. Após o bloqueio, as membranas foram colocadas sob uma placa de vidro, recoberta com papel filme e cortadas em forma de fitas, numeradas e colocadas em canaletas contendo 2ml de solução PBS leite em pó desnatado 3% e soro de paciente, na diluição de 1:100. As fitas foram incubadas por 2 horas em plataforma agitadora tipo gangorra em temperatura ambiente.

Após essa etapa, as fitas foram lavadas seis vezes, por 10 minutos sob agitação constante a temperatura ambiente, utilizando o PBS Tween 0,1%. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com peroxidase, diluído em 1:3000 em leite-PBS 3%, por 1 hora e 30 minutos sob agitação constante, protegidas da luz, a temperatura ambiente. Logo após, as membranas foram lavadas seis vezes com PBS Tween 0,1%.

A reação foi revelada logo após as lavagens, com 1 ml da solução de 4-cloro 1-naftol SigmaAldrichCo. St. Louis, Mo, USA), peróxido de hidrogênio e PBS 1x (pH 7,4) por 2 minutos, em agitação constante. A reação foi interrompida com água ultrapura tipo I. Para que houvesse melhor visualização das frações proteicas reconhecidas, os recipientes com as fitas foram armazenados em geladeira por 1h. Após esse período, as fitas foram secas em papel filtro, coladas em papel sulfite junto do PPM, identificadas e armazenadas em temperatura ambiente.

3.7 Padronizações

3.7.1 Cepa de leptospira

Na etapa de padronização foi utilizada apenas o sorovar Copenhageni cepa M20, pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae por ser o mais prevalente em São Paulo⁵³. O cultivo foi mantido conforme citado no item 3.2.

3.7.2 Determinação das condições para obtenção dos antígenos

Para a obtenção de todos os 20 antígenos, a padronização foi realizada com a cepa M20 pertencente ao sorovar Copenhageni. O método foi realizado conforme item 3.3, e a solubilização foi feita com tampão de amostra redutor 1x e tampão de amostra redutor 5x para avaliar qual teria melhor desempenho nos testes de eletroforese e “Immunoblotting”.

3.7.3 Determinação do volume de antígeno para a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A técnica foi realizada conforme citada no item 3.5, utilizando apenas o antígeno de cepa M20 proveniente do sorovar Copenhageni, onde o antígeno, solubilizado com tampão de amostra redutor 1x e 5x foi adicionado no gel nos volumes de 5, 10, 15, 20, 30 e 40 μL , para verificar qual o volume dos antígenos apresentaria melhor visualização das frações proteicas, utilizando a técnica de coloração com “Comassie Blue”.

3.7.4 Padronização do volume de antígeno na eletroforese em gel de poliacrimamida SDS-PGE para utilização no “immunoblotting”

A técnica foi realizada conforme citada no item 3.5, utilizando apenas o antígeno de cepa M20 proveniente do sorovar Copenhageni, onde o antígeno,

solubilizado com tampão de amostra redutor 1x e 5x foi adicionado no gel no volume de 100 μ L, para verificar concentração apresentaria melhor reatividade ao ser transferida para a membrana de nitrocelulose.

3.8 Considerações Éticas

A realização deste estudo foi aprovada pela Comitê Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz- Projeto CTC-IAL 33-L/2019 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) Plataforma Brasil (Projeto número 22704619.1.0000.0059) e número de parecer consubstanciado 3.806.761 (Apêndice 1).

4. RESULTADOS DAS PADRONIZAÇÕES

4.1 Volume de antígeno na eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A figura 4 demonstra a separação eletroforética, por SDS-PAGE, da preparação do antígeno obtido a partir do sorovar Copenhageni, cepa M20, solubilizado em tampão de amostra redutor (1x e 5x) e volumes de 5 μ L a 15 μ L aplicados nos poços, corado com Comassie Blue.

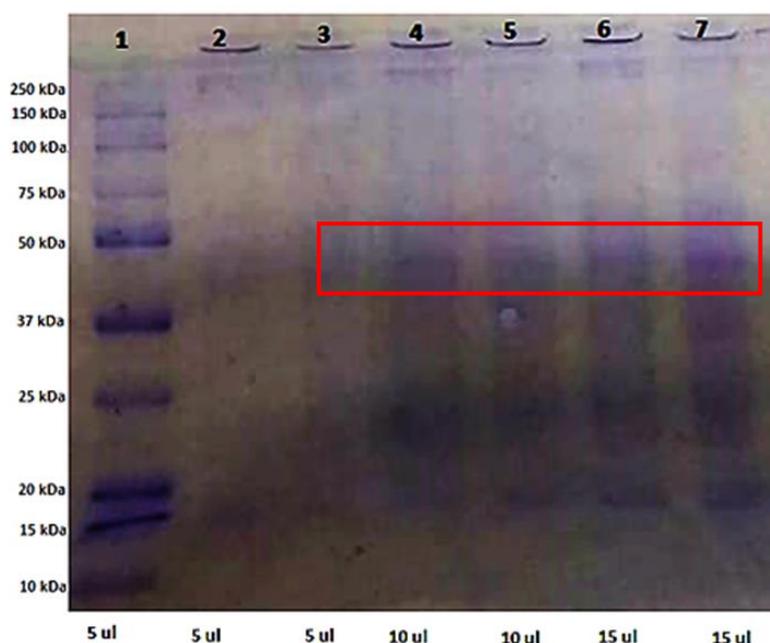


Figura 4. Gel SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida do antígeno sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra redutor com concentrações em 5x e 1x e em volumes de 5, 10 e 15 μ L, corado com "Comassie Blue". Poço 1 – Padrão de Peso Molecular, Poço 2 – antígeno com tampão de amostra 5x redutor, Poço 3 – antígeno com tampão de amostra 1x redutor, Poço 4 – antígeno com tampão de amostra 5x redutor, Poço 5 – antígeno com tampão de amostra 1x redutor, Poço 6 – antígeno com tampão de amostra 5x redutor, Poço 7 – antígeno com tampão de amostra 1x redutor

Nas condições estabelecidas para o desenvolvimento da eletroforese em gel de acrilamida, foi possível a visualização de uma fração antigênica com massa molecular aparente entre 37 e 50 kDa com 10 e 15 μ L de antígeno em ambas as concentrações de tampão de amostra redutor.

A figura 5 demonstra a separação eletroforética, por SDS-PAGE, da preparação antigênica obtida a partir do sorovar Copenhageni, corado com “Comassie Brilliant Blue”, em volumes de 20, 30 e 40 μ L solubilizados com tampão de amostra redutor nas concentrações de 1x e 5x, corado com Comassie Blue.

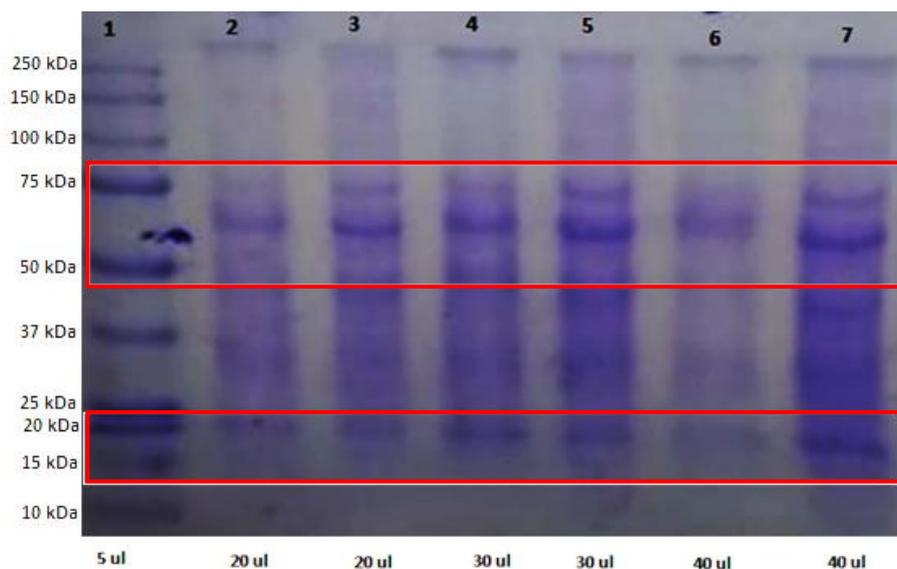


Figura 5. Gel SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida do antígeno sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra redutor com concentrações em 1x e 5x e em volumes de 20, 30 e 40 μ L, corado com “Comassie Blue”. Poço 1 – Padrão de Peso Molecular, Poço 2 – antígeno com tampão de amostra 5x redutor, Poço 3 – antígeno com tampão de amostra 1x redutor, Poço 4 – antígeno com tampão de amostra 5x redutor, Poço 5 – antígeno com tampão de amostra 1x redutor, Poço 6 – antígeno com tampão de amostra 5x redutor, Poço 7 – antígeno com tampão de amostra 1x redutor

Com volumes acima de 15 μ L, foi possível visualizar as frações antigênicas, tanto no antígeno solubilizado com tampão de amostra redutor 1x como também em 5x. Após o processo de coloração do gel, foi possível visualizar frações antigênicas com a massa molecular aparente de 75 kDa, uma entre 50 e 75 kDa e uma entre 15 e 20 kDa.

Com base nesses resultados, observou-se que os volumes de 30 μ L e 40 μ L possibilitaram uma melhor visualização das frações proteicas por SDS-PAGE,

e a escolha de volume para confecção de novos géis foi de 40 μ L foi por apresentar visualização de forma mais marcada do que a do volume de 30 μ L.

4.2 Reconhecimento das frações antigênicas do antígeno obtido a partir do sorovar Copenhageni, por “immunoblotting”, solubilizado com tampão de amostra 5x redutor

Para essa etapa foram utilizadas amostras de soros pareadas, sendo primeira amostra não reagente e segunda amostra reagente para leptospirose. As fitas de nitrocelulose da figura 6 representam esses soros pareados de diferentes pacientes, conforme mostrados anteriormente na tabela 1: fitas 2 e 3 (caso 1), fitas 4 e 5 (caso 2), fitas 6 e 7 (caso 3), fitas 8 e 9 (caso 4), fitas 10 e 11 (caso 5), fitas 12 e 13 (caso 6). A fita de membrana de nitrocelulose 14 representa a amostra de soro de paciente (caso 7) reagente para leptospirose pelo MAT e fita 15 representa soro de paciente (caso 8) não reagente para leptospirose.

A figura 6 apresenta a reatividade de reconhecimento dos anticorpos IgM anti-leptospiras, por “immunoblotting” com tampão de amostra 1x redutor. Verificou-se que amostras de soro com reatividade sorológica, pelo MAT, para sorovar Copenhageni foram capazes de reconhecer frações antigênicas com massa molecular aparente de 10 kDa (caso 6, fita 13), 15 kDa (casos 1,3 e 4, fitas 2,7 e 9, respectivamente) e uma fração entre 37-50 kDa (caso 1, fita 2). A amostra de soro com reatividade sorológica para os sorovares Djasiman e Cynopteri não apresentou reatividade frente ao antígeno do sorovar Copenhageni. A amostra de soro com reatividade sorológica pelo MAT para o sorovar Cynopteri (caso 5, fita 11) apresentou reatividade frente as frações de 25-37 kDa e a amostra com reatividade sorológica para os sorovares Icterohaemorrhagiae e

Copenhageni (caso 7, fita 14) reconheceu a fração de 10 kDa. Dentre as sete amostras de soro com ausência de reatividade de casos confirmados de leptospirose pelo MAT, duas reconheceram frações antigênicas de 10 e 15 kDa (casos 6 e 4, respectivamente).

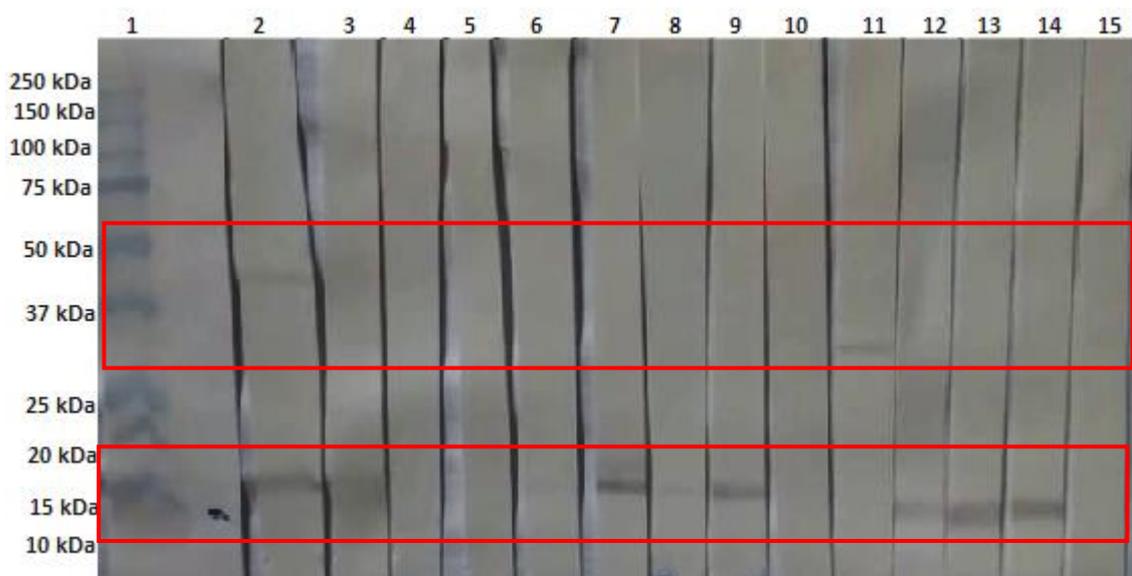


Figura 6. Perfil de reatividade, por “immunoblotting”, do antígeno obtido do sorovar Copenhageni, cepa M20, solubilizado com tampão de amostra 5x redutor frente a amostras de soro de pacientes com leptospirose, na diluição 1:100. Fita 1 -Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro de primeira amostra (caso 1), Fita 3 – soro de segunda amostra (caso 1), Fita 4 – soro de primeira amostra (caso 2), Fita 5 – soro de segunda amostra (caso 3), Fita 6 – soro de primeira amostra (caso 3), Fita 7 – soro de segunda amostra (caso 3), Fita 8 – soro de primeira amostra (caso 4), Fita 9 – soro de segunda amostra (caso 4), Fita 10 – soro de primeira amostra (caso 5), Fita 11 – soro de segunda amostra (caso 5), Fita 12 – soro de primeira amostra (caso 6), Fita 13 – caso de segunda amostra (caso 6), Fita 14 – soro utilizado como controle positivo, Fita 15 – soro utilizado como controle negativo

Tabela 3. Reatividade de anticorpos IgM anti-leptospiras, por “immunoblotting”, do antígeno extraído do sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra 5x redutor, frente a amostras de soro de pacientes com resultado reagente e não reagente para leptospirose

Caso	Fita	MAT	Frações proteicas reconhecidas (kDa)
1	2	Copenhageni	15, 37-50
1	3	Não reagente	(-)
2	4	Djasiman e Cynopteri	(-)
2	5	Não reagente	(-)
3	6	Não reagente	(-)
3	7	Copenhageni	15
4	8	Não reagente	15
4	9	Copenhageni	15
5	10	Não reagente	(-)
5	11	Cynopteri	25-37
6	12	Não reagente	10
6	13	Copenhageni	10
7	14	Icterohaemorrhagiae e Copenhageni	10
8	15	Não reagente	(-)

(-) ausência de reatividade

4.3 Reconhecimento das frações antigênicas do antígeno obtido a partir do sorovar Copenhageni, por “immunoblotting”, solubilizado com tampão de amostra 1x redutor

A figura 7 apresenta o reconhecimento de anticorpos IgM anti-leptospiras, por “immunoblotting”, do antígeno extraído do sorovar Copenhageni, solubilizado com tampão de amostra 1x redutor. Verificou-se que as amostras de soro com reatividade sorológica, pelo AMT, para os sorovares Copenhageni (casos 1,3,4 e 6), Djasiman e Cynopteri (caso 2), e Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (caso 7) reconheceram a fração de 10 kDa do antígeno obtido do sorovar Copenhageni. A amostra de soro com reatividade sorológica para o sorovar Cynopteri (caso 5, fita 11) não apresentou reatividade sorológica, por

“immunoblotting”, frente a preparação antigênica avaliada. Dentre as amostras de soro com ausência sorológica pelo MAT, verificou-se que três amostras apresentaram reatividade frente a fração antigênica de 10 kDa.

Com base nesses resultados, o antígeno solubilizado com tampão de amostra 1x mostrou ser mais sensível, detectando banda nas primeiras amostras negativas, e por isso foi selecionado para dar continuidade na obtenção dos antígenos.

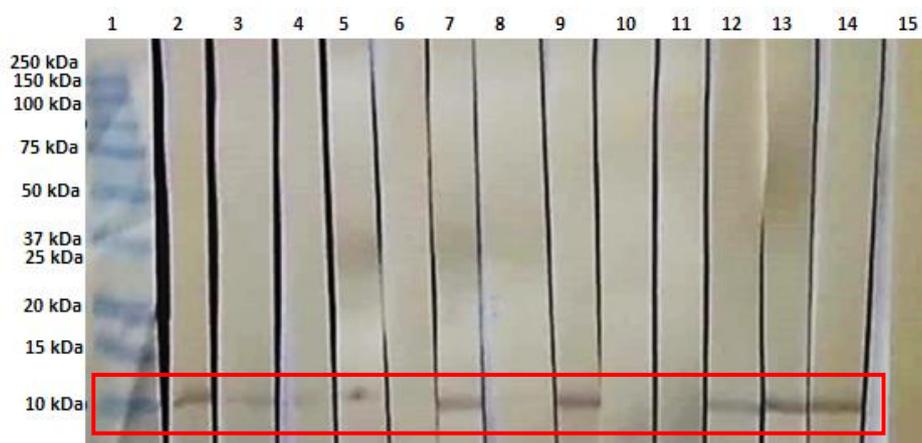


Figura 7. Perfil de reatividade, por “immunoblotting”, do antígeno obtido do sorovar Copenhageni, cepa M20, solubilizado com tampão de amostra 1x redutor frente a amostras de soro de pacientes com leptospirose, na diluição 1:100. Fita 1 –Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro de primeira amostra (caso 1), Fita 3 – soro de segunda amostra (caso 1), Fita 4 – soro de primeira amostra (caso 2), Fita 5 – soro de segunda amostra (caso 3), Fita 6 – soro de primeira amostra (caso 3), Fita 7 – soro de segunda amostra (caso 3), Fita 8 – soro de primeira amostra (caso 4), Fita 9 – soro de segunda amostra (caso 4), Fita 10 – soro de primeira amostra (caso 5), Fita 11 – soro de segunda amostra (caso 5), Fita 12 – soro de primeira amostra (caso 6), Fita 13 – soro de segunda amostra (caso 6), Fita 14 – soro utilizado como controle positivo, Fita 15 – soro utilizado como controle negativo

Tabela 4. Reatividade de anticorpos IgM anti-leptospiras, por “immunoblotting”, do antígeno extraído do sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra 1x redutor, frente a amostras de soro de pacientes com resultado reagente e não reagente para leptospirose

Caso	Fita	MAT	Frações proteicas reconhecidas (kDa)
1	2	Copenhageni	10
1	3	Não reagente	10
2	4	Djasiman e Cynopteri	10
2	5	Não reagente	10
3	6	Não reagente	(-)
3	7	Copenhageni	10
4	8	Não reagente	(-)
4	9	Copenhageni	10
5	10	Não reagente	(-)
5	11	Cynopteri	(-)
6	12	Não reagente	10
6	13	Copenhageni	10
7	14	Icterohaemorrhagiae e Copenhageni	10
8	15	Não reagente	(-)

(-) ausência de reatividade

5. RESULTADOS GEL SDS-PAGE

5.1 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Sejroe, Autumnalis, Castellonis e Cynopteri

A figura 8 apresenta os resultados das bandas proteicas visualizadas, coradas com Comassie Blue. Houve visualização de fração proteica com massa molecular aparente entre 10-15 kDa, 25-37 kDa, 37-50 kDa e entre 50-75 kDa para o antígeno obtido a partir de sorovar Icterohaemorrhagiae (poço 2). Os antígenos obtidos a partir dos sorovares Copenhageni (poço 3) e Sejroe (poço 5) apresentaram frações antigênicas de entre 37-50 kDa e entre 50-75 kDa. O antígeno extraído do sorovar Cynopteri (poço 8) e Castellonis (poço 7), apresentaram quatro frações antigênicas, uma com massa molecular aparente

de 10 kDa, a segunda entre 25-37 kDa, a terceira entre 37-50 kDa e a quarta entre 50-75 kDa. Verificou-se que as preparações antigênicas obtidas dos sorovares Canicola (poço 4) e Autumnalis (poço 6) não foi possível a visualização de frações antigênicas.

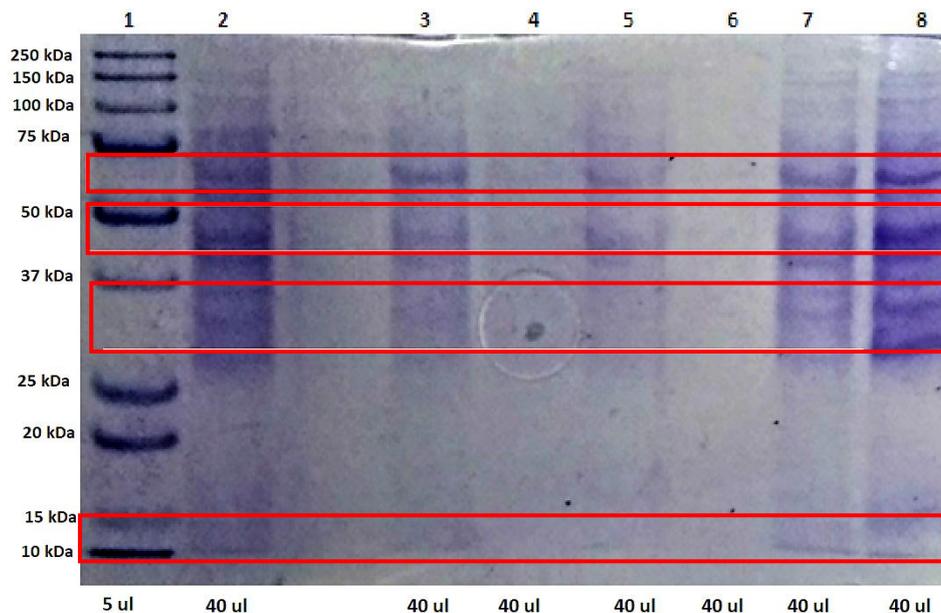


Figura 8. Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com “Comassie Blue”, dos sorovares *Icterohaemorrhagiae*, Copenhageni, Canicola, Sejroe, Autumnalis, Castellonis e Cynopteri. Poço 1 –Padrão de Peso Molecular, Poço 2 –antígeno de sorovar *Icterohaemorrhagiae*, Poço 3 – antígeno de sorovar Copenhageni, Poço 4 – antígeno de sorovar Canicola, Poço 5 – antígeno de sorovar Sejroe, Poço 6 – antígeno de sorovar Autumnalis, Poço 7 – antígeno de sorovar Castellonis, Poço 7 - antígeno de sorovar Cynopteri

Tabela 5. Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares *Icterohaemorrhagiae*, Copenhageni, Canicola, Sejroe, Autumnalis, Castellonis, Cynopteri em volume de 40 μ L

Poço	Sorovar	Frações proteicas visualizada (kDa)
2	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	10,10-15, 25-37, 37-50, 50-75
3	Copenhageni	37-50, 50-75
4	Canicola	(-)
5	Sejroe	37-50, 50-75
6	Autumnalis	(-)
7	Castellonis	10, 25-37, 37-50, 50-75
8	Cynopteri	10, 25-37, 37-50, 50-75

(-) ausência de visualização de fração proteica

5.2 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola, Autumnalis e Panama

Como os antígenos extraídos dos sorovares Canicola e Autumnalis não mostraram uma boa visualização no gel da figura 8, foi feito um novo gel, com nova extração de antígeno, para verificar se as frações proteicas seriam visualizadas.

Como o soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama seria utilizado para realização do “immunoblotting” nessa etapa de qualificação, o sorovar Panama também foi inserido nesse gel para observação de bandas proteicas do antígeno.

Por ser o primeiro gel para visualizar as bandas do antígeno Panama, foi realizado a adição do antígeno nos dois volumes testados previamente na padronização (item 3.3.1.3), o volume de 30 μ L e o de 40 μ L.

A figura 9 apresenta a visualização das frações antigênicas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, corado com Comassie Blue. Houve identificação de fração proteica com peso de 75 kDa apenas no antígeno do sorovar Autumnalis (poço 6). Como apenas o antígeno Autumnalis apresentou fração proteica de 75kD, foi feito mais um gel com novas extrações dos antígenos Canicola e Panama.

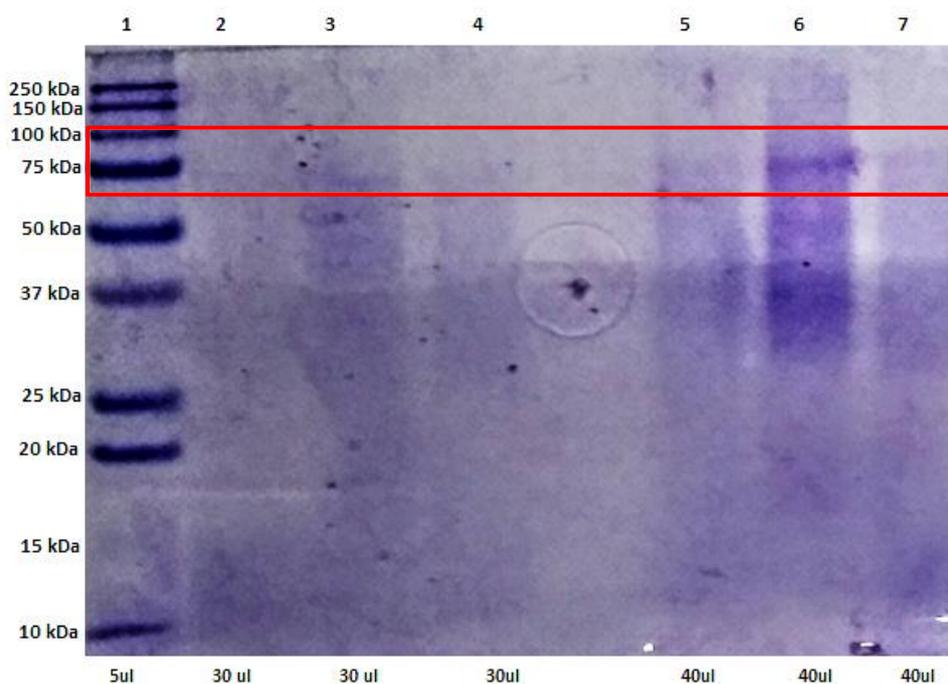


Figura 9. Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com “Comassie Blue”, dos sorovares Canicola, Autumnalis e Panama. Poço 1 – Padrão de Peso Molecular, Poço 2 – antígeno de sorovar Canicola, Poço 3 – antígeno de sorovar Autumnalis, Poço 4 – antígeno de sorovar Panama, Poço 5 – antígeno de sorovar Canicola, Poço 6 – antígeno de sorovar Autumnalis, Poço 7 – antígeno de sorovar Panama

Tabela 6. Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola, Autumnalis e Panama em volumes de 30 e 40 µL

Poço	Sorovar - volume	Frações proteicas visualizadas (kDa)
2	Canicola - 30 µL	(-)
3	Autumnalis - 30 µL	(-)
4	Panama - 30 µL	(-)
5	Canicola - 40 µL	(-)
6	Autumnalis - 40 µL	75
7	Panama - 40 µL	(-)

(-) ausência de visualização de fração proteica

5.3 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Bataviae*, *Australis*, *Pyrogenes* e *Tarassovi* em volume de 40 µL

A figura 10 apresenta os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE, corado com Comassie Blue. Houve identificação de uma fração proteica com massa molecular aparente entre 37-50 kDa e uma fração de 75 kDa dos antígenos de sorovares *Pomona* (poço 3), *Bataviae* (poço 4), *Australis* (poço 5), *Pyrogenes* (poço 6). O antígeno de sorovar *Tarassovi* (poço 7) apresentou visualização de fração entre 37-50 kDa e 50-75 kDa. O antígeno de sorovar *Grippotyphosa* apresentou uma fração de massa molecular aparente entre 25-37 kDa, uma fração entre 37-50 kDa e uma fração de 75 kDa.

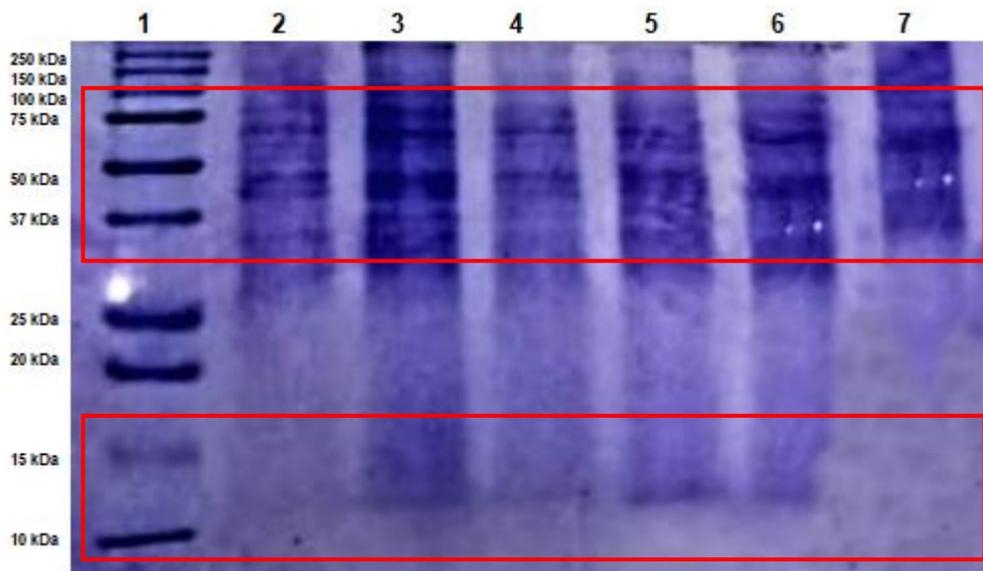


Figura 10. Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com “Comassie Blue”, dos sorovares *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Bataviae*, *Australis* e *Pyrogenes*. Poço 1 – Padrão de Peso Molecular, Poço 2 – antígeno de sorovar *Grippotyphosa*, Poço 3 – antígeno de sorovar *Pomona*, Poço 4 – antígeno de sorovar *Bataviae*, Poço 5 – antígeno de sorovar *Australis*, Poço 6 – antígeno de sorovar *Pyrogenes*, Poço 7 – antígeno de sorovar *Tarassovi*.

Tabela 7. Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Grippotyphosa, Pomona, Bataviae, Australis e Pyrogenes em volume de 40 µL

Poço	Antígeno	Frações proteicas visualizadas (kDa)
2	Grippotyphosa	25-37, 37-50 e 75
3	Pomona	37-50, 75
4	Bataviae	37-50, 75
5	Australis	10-15, 37-50, 75
6	Pyrogenes	10-15, 37-50, 75
7	Tarassovi	37-50, 50-75

5.4 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Hardjo, Wolffi, Javanica, Hebdomadis, Djasiman e Patoc

A figura 11 apresenta o perfil eletroforético das frações antigênicas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE, corado com Comassie Blue. Houve identificação de uma fração proteica com massa molecular aparente entre 10-15 kDa, 37-50 kDa e entre 50-75 no antígeno de sorovar Javanica (poço 4), Hebdomadis (poço 5), Djasiman (poço 6) e Patoc (poço 7). No antígeno de sorovar Wolffi (poço 3) foi possível visualizar a fração entre 37-50 kDa. As frações proteicas de peso molecular entre 37-50 kDa e entre 50-75 kDa, foram encontradas no antígeno de sorovar Hardjo (poço 2).

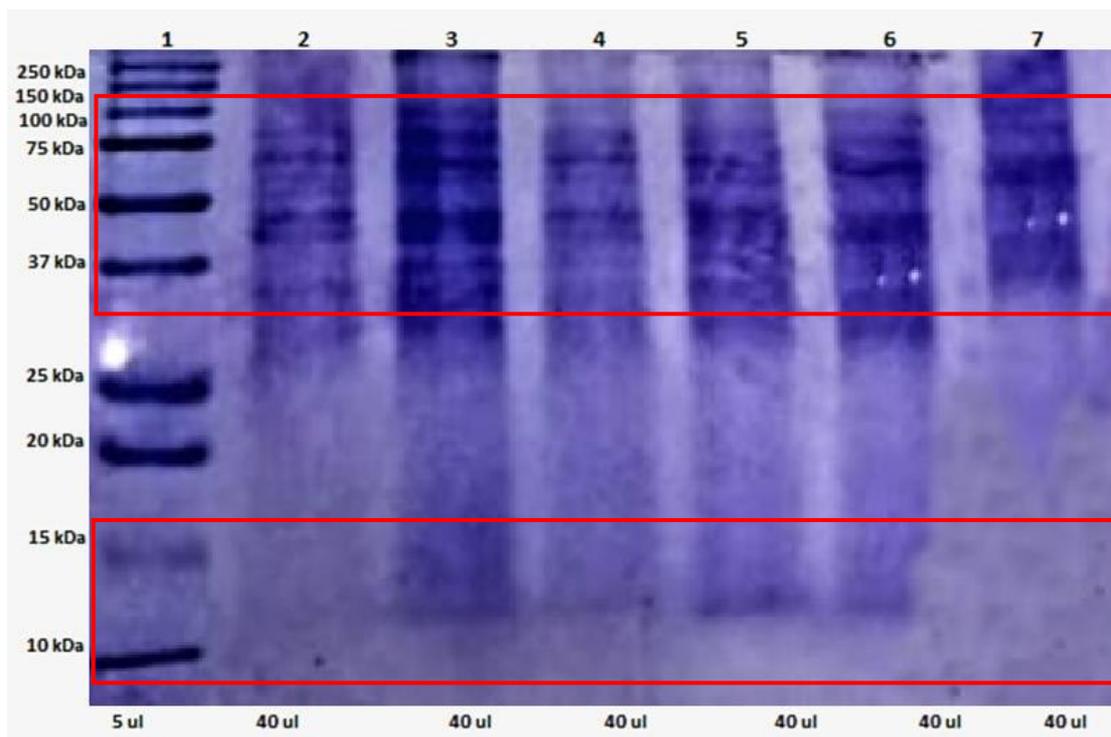


Figura 11. Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com “Comassie Blue”, dos sorovares Hardjo, Wolffi, Javanica, Hebdomadis, Djasiman e Patoc. Poço 1 – Padrão de Peso Molecular, Poço 2 – antígeno de sorovar Hardjo, Poço 3 – antígeno de sorovar Wolffi, Poço 4 – antígeno de sorovar Javanica, Poço 5 – antígeno de sorovar Hebdomadis, Poço 6 – antígeno de sorovar Djasiman, Poço 7 – antígeno de sorovar Patoc

Tabela 8. Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Hardjo, Wolffi, Javanica, Hebdomadis, Djasiman e Patoc em volume de 40 μ L

Poço	Antígeno	Frações proteicas visualizadas (kDa)
2	Hardjo	37-50, 50-75
3	Wolffi	37-50
4	Javanica	10-15, 37-50, 50-75
5	Hebdomadis	10-15, 37-50, 50-75
6	Djasiman	10-15, 37-50, 50-75
7	Patoc	10-15, 37-50, 50-75

(-) ausência de visualização de fração proteica

5.5 Análise do perfil eletroforético, por SDS-PAGE, dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola e Panama

Como não houve visualização de frações proteicas nos antígenos extraídos dos sorovares Canicola e Panama, foi realizada uma nova extração dos antígenos e confecção de um novo gel de poliacrilamida SDS-PAGE, com volume de 40 μ L.

A figura 12 apresenta a visualização das frações antigênicas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, corado com Comassie Blue. Os antígenos foram aplicados em duplicatas no gel apenas para garantia de que haveria a visualização de frações proteicas. Após a coloração do gel, pode-se identificar a presença de duas frações proteicas com massa molecular aparente entre 37-50 kDa e uma fração de massa molecular aparente de 75 kDa, no antígeno de sorovar Canicola (poços 2 e 3). O antígeno de sorovar Panama (poço 4) apresentou apenas fração de 75 kDa. Não houve visualização de fração proteica em uma das duplicatas do antígeno de sorovar Panama (poço 5).

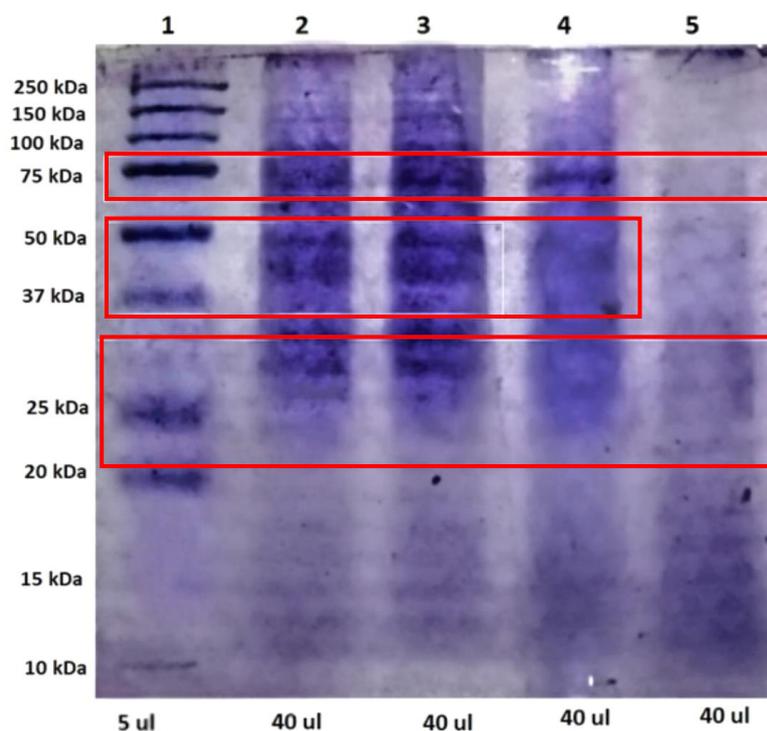


Figura 12. Perfil eletroforético por SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida, corado com “Comassie Blue”, dos sorovares Canicola e Panama. Poço 1 – Padrão de Peso Molecular, Poço 2 – antígeno de sorovar Canicola, Poço 3 – antígeno de sorovar Canicola, Poço 4 – antígeno de sorovar Panama, Poço 5 – antígeno de sorovar Panama

Tabela 9. Frações antigênicas visualizadas por SDS-PAGE a partir dos antígenos extraídos dos sorovares Canicola e Panama em um volume de 40 μ L

Poços	Antígeno	Frações proteicas visualizadas (kDa)
1	Canicola	25-37, 37-50, 75
2	Canicola	25-37, 37-50, 75
3	Panama	75
4	Panama	(-)

(-) ausência de visualização de fração proteica

6. RESULTADOS “IMMUNOBLOTTING”

6.1 Resultados da imunoreatividade por “immunoblotting” das amostras de soros de pacientes com leptospirose frente a diferentes sorovares

Dando sequência a avaliação da reatividade das amostras de soros de pacientes com leptospirose com os antígenos de sorovar Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Grippotyphosa, Canicola, Pomona, Bataviae, Australis, Pyrogenes, Tarassovi, Sejroe, Autumnalis, Hardjo, Wolffi, Javanica, Panama, Hebdomadis, Djasiman, Castellonis, Patoc e Cynopteri. Conforme citado no item 3.1, foram selecionados dois soros provenientes de casos de óbitos de sorovar Panama e dois soros de sorovar Castellonis, que primeiramente foram testados apenas um de cada sorovar com anticorpos anti-IgM humanos conjugados com peroxidase, e posteriormente, os quatro soros seriam submetidos aos anticorpos anti-IgG humanos conjugados com peroxidase.

Após a etapa de transferência, as membranas de nitrocelulose bloqueadas, foram armazenadas a -20°C e posteriormente, foi realizado o “immunoblotting”.

A tabela 9 representa a reatividade encontrada entre as amostras de soros frente aos 20 antígenos de sorovares utilizados.

As frações localizadas em locais não descritos no PPM foram consideradas com valor aproximado.

Tabela 10. Reatividade entre amostras de soro frente aos 20 sorovares

(Continua)

Antígenos	Sorores reagentes																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Icterohaemorrhagiae	15-20 25-37	10	10-15	10	10-15*	15	10-15	10-15 15-20	10-15* 37-50*	10-15* 15-20 20-25 25-37 50-75	10-15	10-15 15-20*	15-20	10-15	10-15*	10-15*	10-15*	15-20 20-25 25-37	10-15* 15-20	15-20
Copenhageni	15-20	10 15	10-15 15-20	10	20-25	15 15-20	10-15 15-20	10-15 15-20	10-15* 37-50*	10-15 20-25 25-37	10-15 15-20	10-15	15-20	10-15	15-20	10-15 15-20	10-15 *	15-20 20-25	10-15 15-20	(-)
Grippotyphosa	(-)	(-)	10-15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10-15	15-20 20-25 25-37	(-)	10-15	15-20	(-)	(-)	(-)	(-)	15-20 25-37	(-)	(-)
Canicola	15-20	10 15-20	10-15 15-20	10 10-15	10-15 15-20	15 15-20	10-15 15-20	10-15 15-20	10-15	10-15** 15-20 20-25 25-37	15	10-15 15-20*	15-20	10-15 20-25	10-15	10-15 *	10-15*	15-20 20-25 37	10-15* 15-20	15-20
Bataviae	(-)	10	10-15	10	10-15	15	10-15	10-15	10-15	10-15** 15-20 20-25 25-37	15	10-15 15-20*	10-15	10-15	10-15*	10-15*	10-15*	15-20	10-15 15-20	(-)
Australis	10	(-)	(-)	10	10-15	15-20*	10-15	10-15	10-15*	10-15 *	(-)	10-15	(-)	10-15*	(-)	(-)	10-15	15-20**	10-15 15-20	(-)
Pyrogenes	10	10	(-)	10-15 15-20 20-25	10-15**	15-20	10-15	10-15 15-20	10-15*	10-15 15-20	(-)	10-15* 15-20	15-20	10-15 15-20	10-15*	10-15 *	10-15	10-15	(-)	10-15
Tarassovi	10 15-20	(-)	10-15	(-)	10-15	15-20*	10-15	10-15	10-15*	10-15**	10-15	10-15	(-)	10-15**	10-15	10-15 *	10-15	15-20 **	(-)	15-20

Tabela 10. Reatividade entre amostras de soro frente aos 20 sorovares

(Conclusão)

Antígenos	Soros reagentes																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Sejroe	(-)	10	10-15	10	10-15	15-20	10-15	10-15	10-15*	10-15* 15-20 20-25 25-37	10-15	10-15 20-25*	15-20	10-15	10-15*	10-15 *	10-15	15-20	10-15 15-20	(-)	
Autumnalis	15-20	25-37	10	10-15	10	(-)	15-20*	10-15	10-15	10-15*	10-15* 15-20 20-25 25-37	10-15	10-15 20-25*	15-20	10-15	10-15*	10-15 *	10-15	15-20 37	10-15 15-20 25-37	15-20
Hardjo	(-)	(-)	(-)	10	(-)	15-20*	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15* 15-20 20-25 25-37	10-15	10-15 20-25*	10-15 15-20	10-15	10-15*	10-15 *	10-15	15-20	10-15* 15-20	10-15
Wolffi	15-20	10	10-15	10	(-)	15-20*	10-15	10-15	15-20	10-15 15-20 20-25	10-15	10-15 20-25*	10-15 15-20	10-15	10-15*	10-15 *	10-15	15-20	10-15 15-20	(-)	
Javanica	(-)	10	10-15	10	10-15	15-20*	10-15	10-15	(-)	10-15**	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15*	10-15* 15-20	10-15	15 15-20	10-15* 15-20	10-15	
Panama	(-)	10	10-15 15-20	10-15	(-)	15-20	10-15	10-15	(-)	(-)	10-15	10-15	(-)	10-15	10-15*	10-15*	10-15*	15-20	(-)	15	
Hebdomadis	10	(-)	(-)	10-15	10-15	15-20*	10-15	10-15	10-15	10-15**	(-)	10-15	(-)	10-15**	10-15	(-)	10-15*	10-15 15 15-20	10-15	10-15	
Djasiman	(-)	(-)	10-15	10-15	(-)	(-)	10-15	(-)	10-15	(-)	(-)	10-15	(-)	10-15	15-20	(-)	10-15	(-)	10-15*	15-20 50-75	
Castellonis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10-15	10-15	10-15	(-)	(-)	10-15	10-15 15-20	10-15	15-20	(-)	10-15	10-15	10-15*	15-20	
Patoc	15	(-)	(-)	10-15	10-15 15-20	10-15 15-20	10-15	10-15	10-15	10-15* 25-37*	15-20 25-37	(-)	10-15	10-15 15-20	10-15	15-20	(-)	10-15	10-15	10-15*	15-20* 25
Cynopteri	(-)	10-15	10-15	10-15	10-15	15-20	10-15	10-15	10-15	15-20 25-37	10-15	10-15 15-20*	10-15 15-20	10-15	15-20	10-15*	10-15	10-15	10-15*	15-20* 25 37	50

6.1.1 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Icterohaemorrhagiae

A figura 13 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Icterohaemorrhagiae.

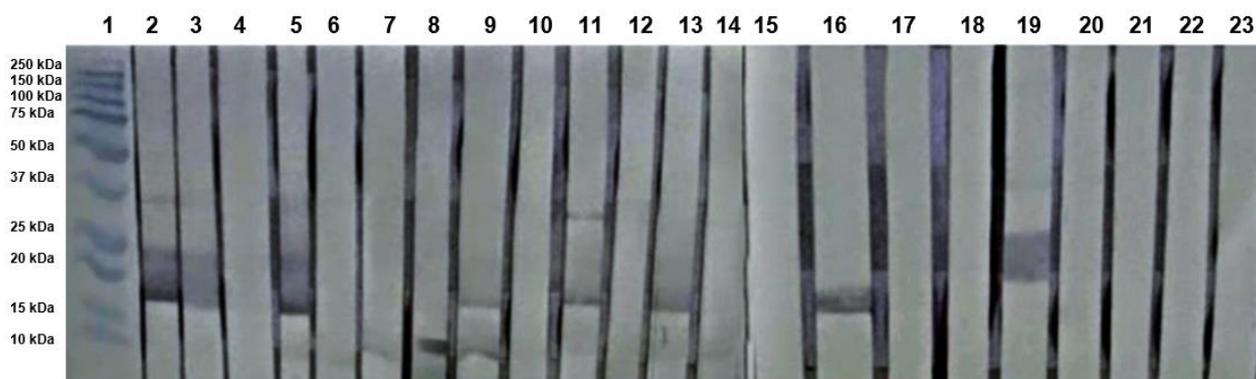


Figura 13. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Icterohaemorrhagiae e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 –soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 –soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 –soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

As amostras de soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2) e o soro reagente para sorovar Autumnalis (fita 11), reconheceram uma fração proteica de massa molecular aparente entre 15-20 kDa e uma entre 25-37 kDa. Os soros reagentes para sorovar Copenhageni (fita 3), sorovar Canicola (fita 5) e sorovar Wolffi (fita 13), reconheceram uma fração proteica de peso molecular entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Australis (fita 7), Pyrogenes (fita 8) e Hebdomadis (fita 16), reconheceram fração de peso molecular aparente de

10 kDa. O soro reagente para sorovar Tarassovi (fita 9), reconheceu uma fração proteica de 10 kDa e uma fração de peso entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Patoc (fita 19), reconheceu fração de massa molecular aparente de 15 kDa. As amostras de soros reagentes para sorovares Panama (fita 15), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 5), Cynopteri (fita 18), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar *Icterohaemorrhagiae*.

6.1.2 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Copenhageni

A figura 14 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Copenhageni.

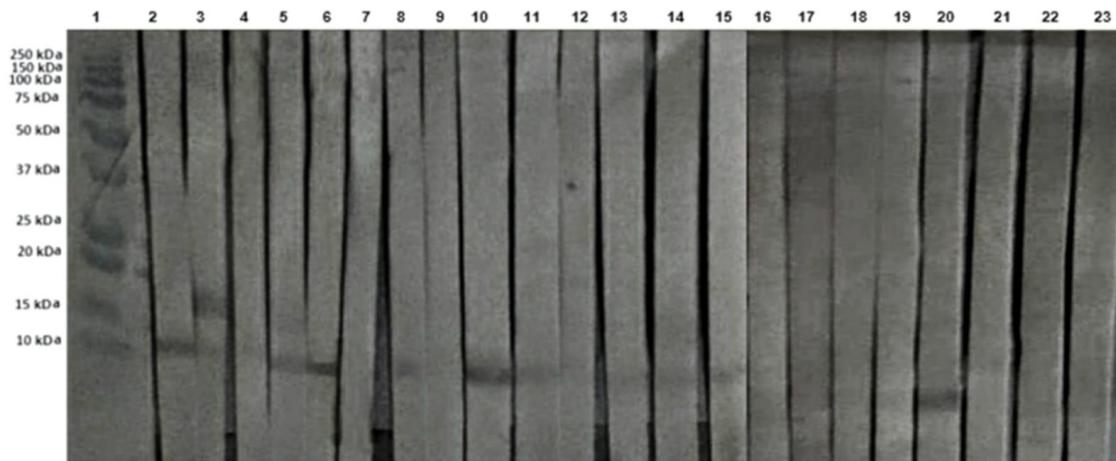


Figura 14. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Copenhageni e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 –Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 - soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

O soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2), Bataviae (fita 6), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14), Pyrogenes (fita 8) e Panama (fita 15), reconheceram fração proteica de massa molecular aparente de 10 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3), reconheceu uma fração antigênica de 10 kDa e uma fração de 15 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5) reconheceu uma fração antigênica de 10 kDa e uma fração de massa molecular aparente entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Cynopteri (fita 20) reconheceu fração proteica de peso molecular entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), Australis (fita 7), Tarassovi (fita 9), Hardjo (fita 12), Hebdomadis (fita 16), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), soro proveniente de

óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Copenhageni.

6.1.3 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Grippotyphosa

A figura 15 apresenta os resultados da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno obtido de sorovar Grippotyphosa.

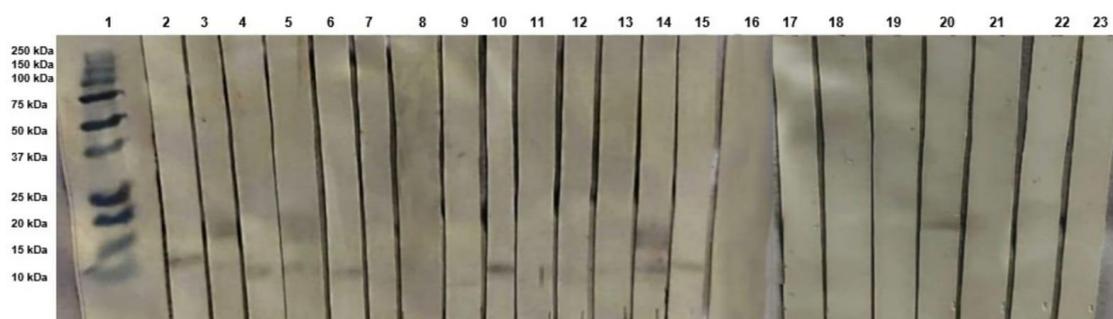


Figura 15. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Grippotyphosa e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 –Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

O soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2), Grippotyphosa (fita 4), Bataviae (fita 6), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11),

Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14), Djasiman (fita 17), Cynopteri (fita 20), reconheceram fração antigênica de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3), Canicola (fita 5) e Panama (fita 15), reconheceu frações de massa molecular aparente entre 10-15 kDa e 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Australis (fita 7), Pyrogenes (fita 8), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), Hebdomadis (fita 16), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (22), soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Grippotyphosa.

6.1.4 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Canicola

A figura 16 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Canicola.

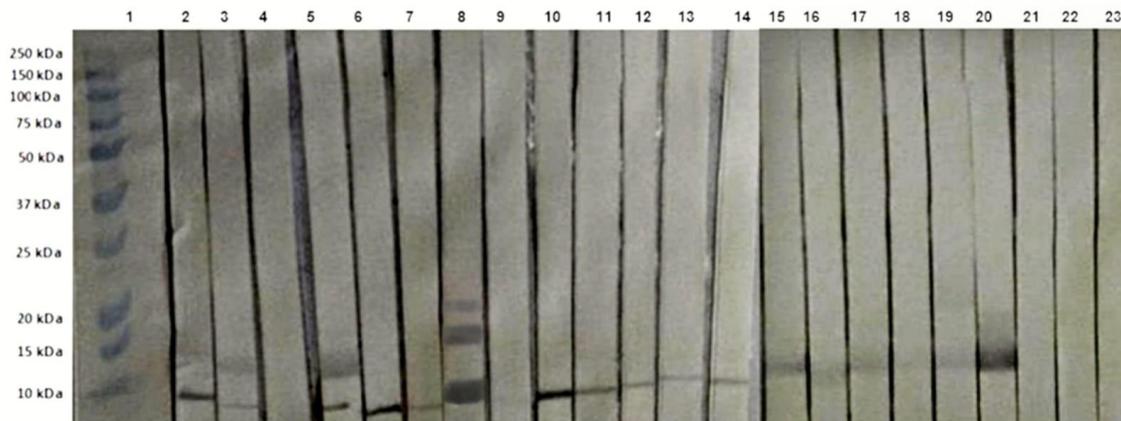


Figura 16. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Canicola e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 –Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

O soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2), Copenhageni (fita 3), Bataviae (fita 6), Australis (fita 7), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13) e Javanica (fita 14), reconheceram fração antigênica de massa molecular aparente de 10 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5), reconheceu uma fração de 10 kDa e uma fração de peso molecular ente 10-15kDa. O soro reagente para sorovar Panama (coluna 2), Hebdomadis (fita 16), Djasiman (fita 17), Patoc (fita 19) e Cynopteri (fita 20), reconheceram fração proteica de peso molecular ente 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Pyrogenes (fita 8), reconheceu frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa, 15-20 kDa e 20-25 kDa. O soro reagente para os sorovares Grippotyphosa (fita 4), Tarassovi (fita 9), soro reagente para sorovar Castellonis (fita 18), soro proveniente de óbito, reagente

para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Canicola.

6.1.5 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Pomona

A figura 17 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Pomona.

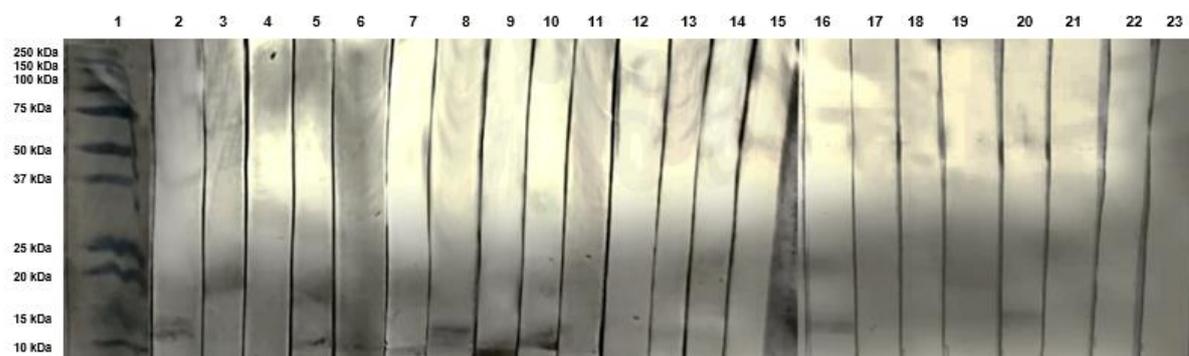


Figura 17. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Pomona e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 –Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 –soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 - soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

O soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2) reconheceu duas frações antigênicas com massa molecular entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3) reconheceu fração entre 20-25 kDa. Soros

reagentes para sorovares Canicola (fita 4) e Patoc (fita 19) reconheceram frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa e 15-20 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Bataviae (fita 6), Australis (fita 7), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Javanica (fita 14), Hebdomadis (fita 16), Cynopteri (fita 20) reconheceu fração antigênica aparente entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Pyrogenes (fita 8), reconheceu três frações antigênicas de massa molecular entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Panama (fita 15), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (fita 22), soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Pomona.

6.1.6 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Bataviae

A figura 18 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Bataviae.

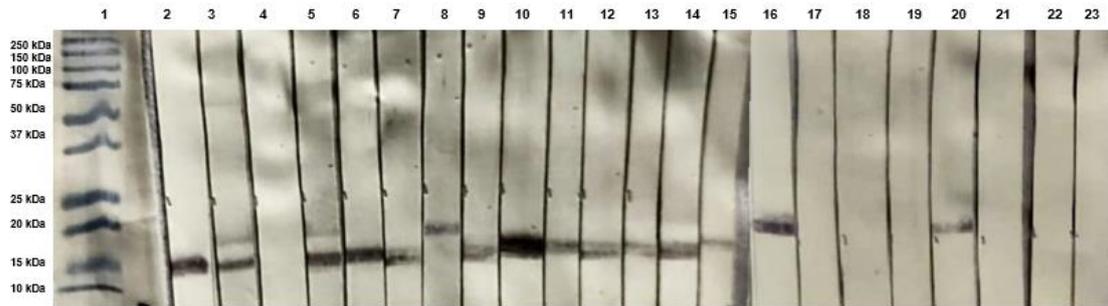


Figura 18. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Bataviae e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 –Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 –soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 –soro do controle negativo

O soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2), Bataviae (fita 6) uma fração antigênica de massa molecular aparente entre 15 kDa. Os soros reagentes para sorovar Copenhageni (fita 3) e Canicola (fita 5), reconheceram frações de 15 kDa e entre uma entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para sorovar Australis (fita 7), Tarassovi (fita 9), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14), Hebdomadis (fita 16), reconheceram duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Pyrogenes (fita 8), Sejroe (fita 10), Panama (fita 15), Cynopteri (fita 20), reconheceu fração aparente entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para sorovar Grippotyphosa (fita 4), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), O soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (fita 22), soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23),

apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Bataviae.

6.1.7 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Australis

A figura 19 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Australis.

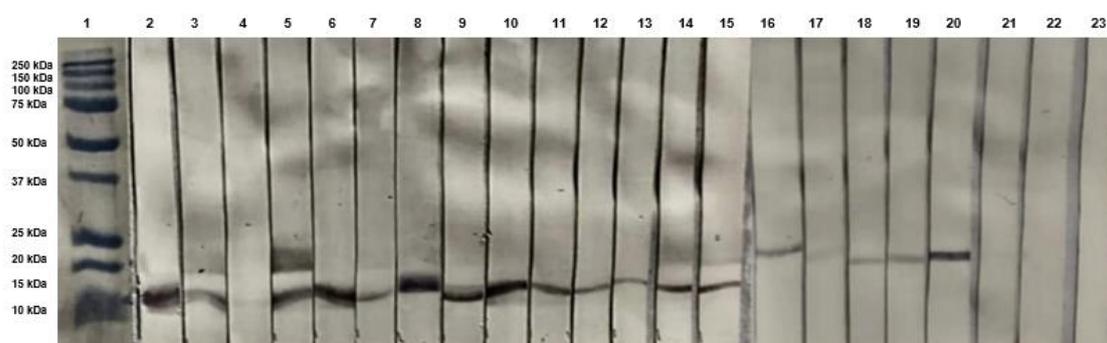


Figura 19. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Australis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – de Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

As amostras de soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Bataviae (fita 6), Australis (fita 7), Pyrogenes (fita 8), Tarassovi (fita 9),

Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffii (fita 13), Javanica (fita 14), Panama (fita 15), Hebdomadis (fita 6), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), Cynopteri (fita 20), reconheceram frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3) e Canicola (fita 5), reconheceu uma fração entre 10-15 kDa e outra entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (fita 22), soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Australis.

6.1.8 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Pyrogenes

A figura 20 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Pyrogenes.

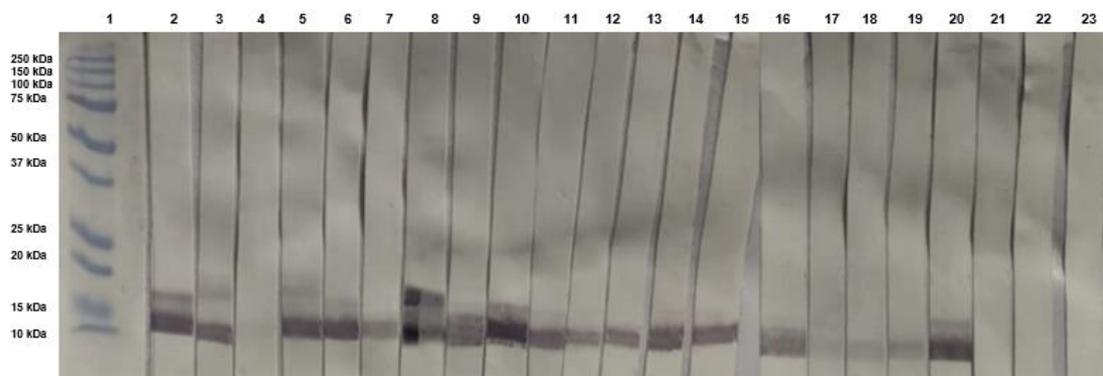


Figura 20. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Pyrogenes e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

A amostra de soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (2), Pyrogenes (8) e Cynopteri (fita 20), reconheceu frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa e 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3) e Canicola (fita 5), reconheceu duas frações antigênicas de massa molecular aparente ente 10-15 kDa e uma fração entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Bataviae (fita 6), Australis (fita 7), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14) e Panama (fita 15), reconheceu duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. As amostras de soro reagente para sorovar Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hebdomadis (fita 16), Castellonis (fita 18) e Patoc (fita 19), reconheceram fração entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), Djasiman (fita 17), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (fita 22),

soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Pyrogenes.

6.1.9 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Tarassovi

A figura 21 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Tarassovi.

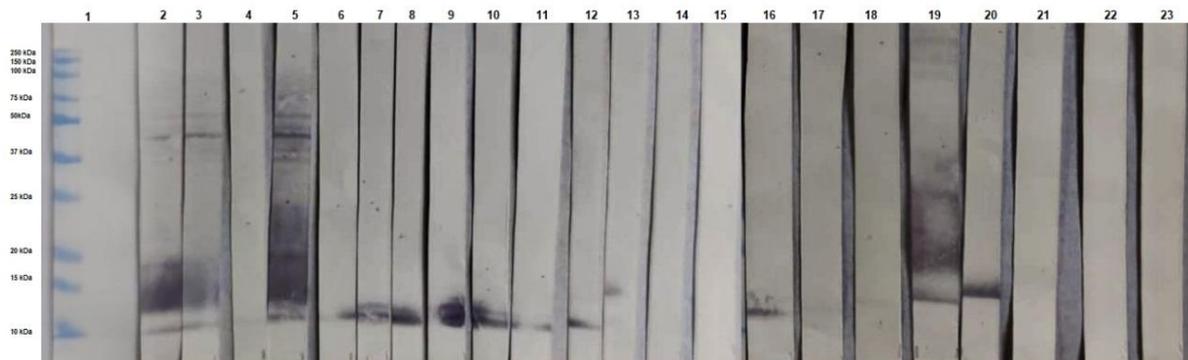


Figura 21. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Tarassovi e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 –soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 –soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

As amostras de soro reagentes para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2) e Copenhageni (fita 3) reconheceram duas frações antigênicas de massas moleculares aparente entre 10-15 kDa e duas entre 37-50 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), Bataviae (fita 6), Hardjo (fita 12),

Hebdomadis (fita 16), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18) e Cynopteri (fita 20), reconheceram uma fração de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. Os soros reagentes para sorovar Australis (fita 7), Pyrogenes (fita 8), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10) e Autumnalis (fita 11), reconheceram duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. O soro proveniente de sorovar Canicola (fita 5) reconheceu duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa, uma fração entre 25-37 kDa e quatro frações de massa molecular aparente entre 37-50 kDa. A amostra de soro reagente para sorovar Wolffi (fita 13), reconheceu fração de massa entre 15-20 kDa. O soro proveniente de sorovar Patoc (fita 19) reconheceu duas frações antigênicas de massa molecular entre 10-15 kDa, duas frações entre 37-50 kDa, uma fração entre 100 kDa, 150 kDa e uma fração de 250 kDa. A amostra de soro reagente para sorovar Javanica (fita 14), Panama (fita 15), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (fita 22), soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Tarassovi.

6.1.10 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Sejroe

A figura 22 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Sejroe.

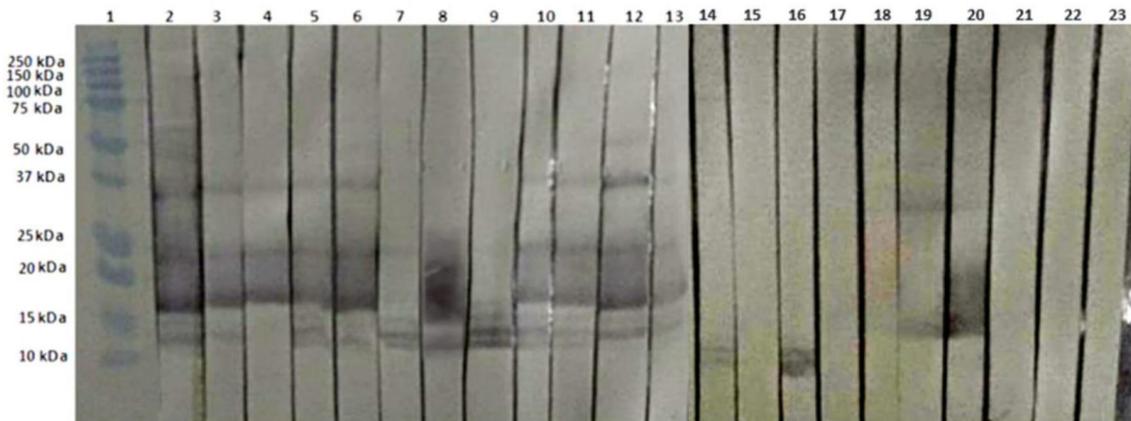


Figura 22. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Sejroe e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 - soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

A amostra de soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2) reconheceu seis frações antigênicas de massa molecular aparente onde duas frações foram entre 10-15 kDa, uma entre 15-20 kDa, uma entre 20-25 kDa, uma entre 25-37 kDa e uma fração entre 50-75 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3) reconheceu frações antigênicas entre 10-15 kDa, 20-25 kDa e 25-37 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4) reconheceu fração aparente entre 15-20 kDa, 20-25 kDa e 25-37 kDa. Os soros reagentes para sorovares Canicola (fita 5) e Bataviae (fita 6) reconheceram seis frações antigênicas, sendo três frações entre 10-15 kDa, uma entre 15-20 kDa, outra 20-25 kDa e a última entre 25-37 kDa. O soro reagente para sorovar Australis (fita 7) reconheceu duas frações antigênicas aparentes entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Pyrogenes (fita 8) reconheceu duas frações

entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Tarassovi (fita 9) reconheceu três frações antigênicas entre 10-15 kDa. As amostras de soros reagentes para os sorovares Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11) e Hardjo (fita 12) reconheceram cinco frações, sendo duas frações com massa molecular aparente entre 10-15 kDa, uma entre 15-20 kDa, outra entre 20-25 kDa e a última entre 25-37 kDa. O soro reagente para sorovar Wolffi (fita 13) reconheceu frações antigênicas entre 10-15 kDa, 15-20 kDa e 20-25 kDa. O soro reagente para sorovar Javanica (fita 14) e Hebdomadis (fita 16) reconheceram três frações entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Patoc (fita 19), Cynopteri (fita 20) reconheceram frações entre 15-20 kDa e 25-37 kDa. Os soros reagentes para sorovares Panama (fita 15), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito reagente para sorovar Castellonis (fita 22), soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Sejroe.

6.1.11 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Autumnalis

A figura 23 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Autumnalis.

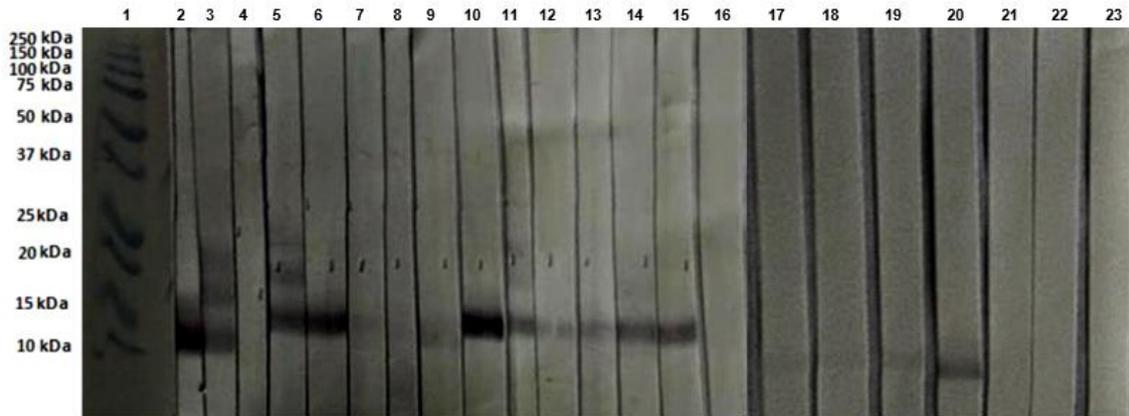


Figura 23. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Autumnalis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

As amostras de soros reagentes para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Cynopteri (fita 20), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14) e Panama (fita 15), reconheceram uma fração antigênica de massa molecular aparente ente 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3), reconheceu uma fração ente 10-15 kDa e uma fração entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5) e Bataviae (fita 6), reconheceram fração de 15 kDa. O soro reagente para sorovar Djasiman (fita 17), Grippotyphosa (fita 4), Australis (fita 7), Pyrogenes (fita 8), Hebdomadis (fita 16), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram

ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Autumnalis.

6.1.12 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Hardjo

A figura 24 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Hardjo.

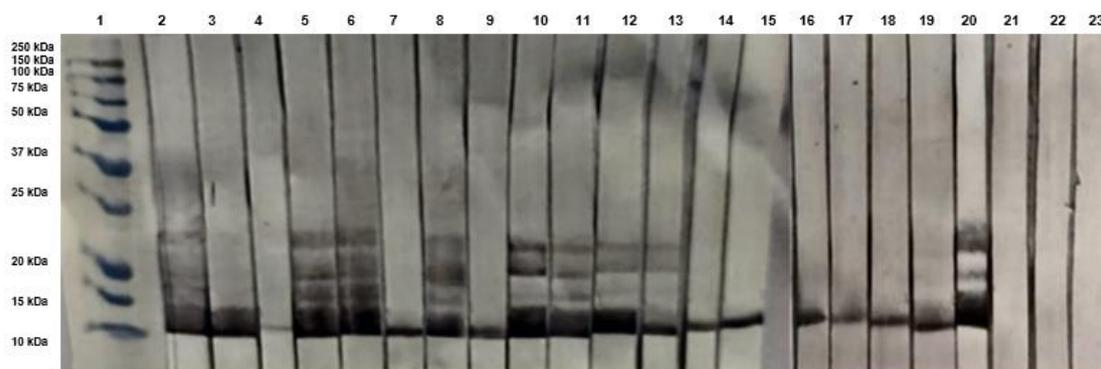


Figura 24. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Hardjo e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 –soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

As amostras de soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Canicola (fita 5), Bataviae (fita 6), reconheceram frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa, duas frações entre 15-20 kDa, e uma entre 20-25 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3),

Grippotyphosa (fita 4), Australis (fita 7), Tarassovi (fita 9), Javanica (fita 14), Panama (fita 15), Hebdomadis (fita 16), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), reconheceu fração aparente entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Pyrogenes (fita 8) reconheceu duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), reconheceram uma fração entre 10-15 kDa, uma entre 15-20 kDa e duas frações aparentes entre 20-25 kDa. O soro reagente para sorovar Cynopteri (fita 20) reconheceu uma fração antigênica entre 10-15 kDa e duas frações entre 15-20 kDa. Soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Hardjo.

6.1.13 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Wolffi

A figura 25 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Wolffi.

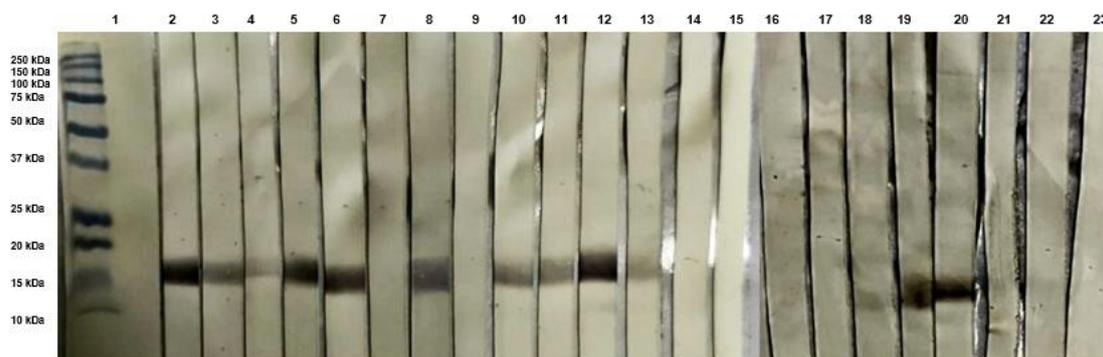


Figura 25. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Wolffi e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

As amostras de soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Copenhageni (fita 3), Grippotyphosa (fita 4), Canicola (fita 5), Pyrogenes (fita 8), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), reconheceram uma fração antigênica de massa molecular aparente entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Bataviae (fita 6) e Javanica (fita 14), reconheceu fração aparente entre 10-15 kDa. Os soros reagentes para sorovares Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), Cynopteri (fita 20), reconheceram uma fração aparente entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para sorovares Australis (fita 7), Tarassovi (fita 9), Panama (fita 15), Hebdomadis (fita 16), Djasiman (fita 17), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como

controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Wolffi.

6.1.14 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Javanica

A figura 26 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Javanica.

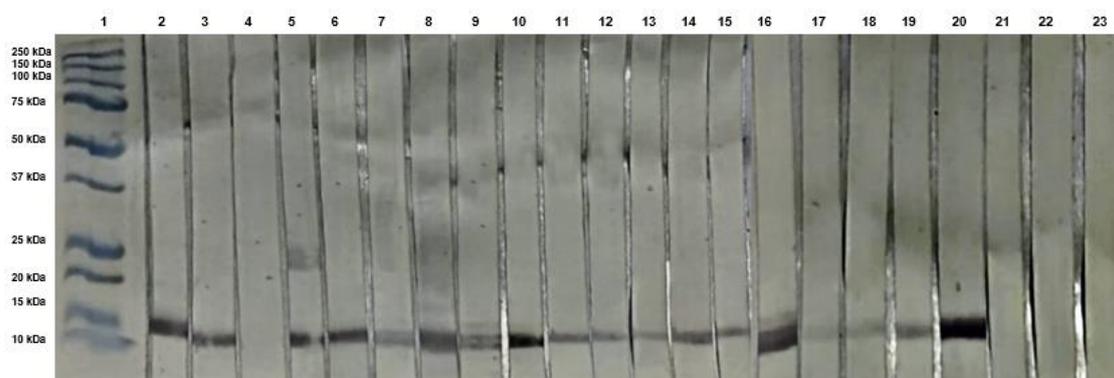


Figura 26. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Javanica e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro de controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Copenhageni (fita 3), Bataviae (fita 6), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14), Panama (fita 15), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), Cynopteri (fita 20) reconheceram

frações antigênicas de massa molecular aparentes entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Pyrogenes (fita 8) reconheceu uma fração entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5), reconheceu uma fração entre 10-15 kDa e outra entre 20-25 kDa. O soro reagente para sorovar Australis (fita 7) reconheceu duas frações antigênicas entre 10-15 kDa. Os soros reagentes para sorovares Tarassovi (fita 9) e Hebdomadis (fita 16) reconheceram três frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. Os soros reagentes para sorovares Grippotyphosa (fita 4), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Javanica.

6.1.15 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Panama

A figura 27 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Panama.

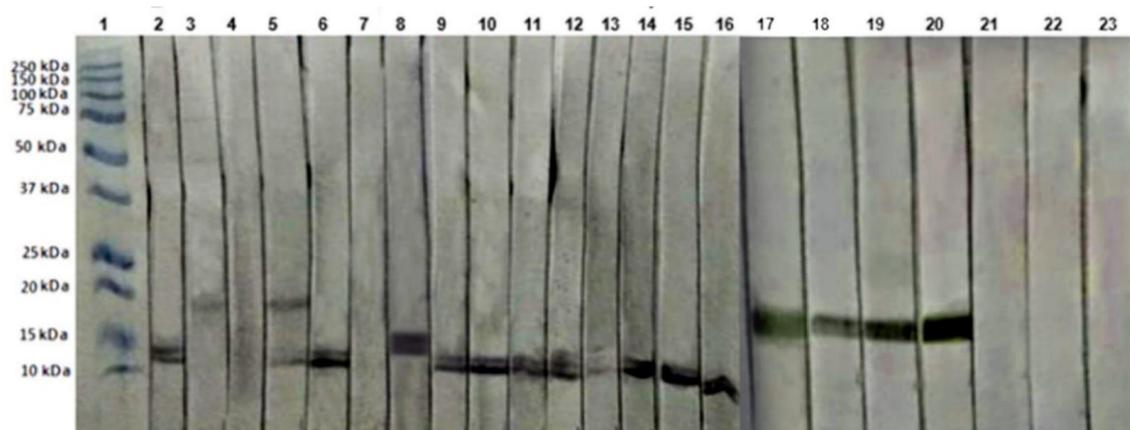


Figura 27. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Panama e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 –soro reagente para sorovar Grippytyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 –soro do controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Bataviae (fita 6), Pyrogenes (fita 8), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14), Panama (fita 15), Hebdomadis (fita 16), reconheceram duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Copenhageni (fita 3), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19) e Cynopteri (fita 20), reconheceram fração aparente entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5), reconheceu uma fração entre 10-15 kDa e outra entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Grippytyphosa (fita 4), Australis (fita 7), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23),

apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Panama.

6.1.16 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Hebdomadis

A figura 28 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Hebdomadis.

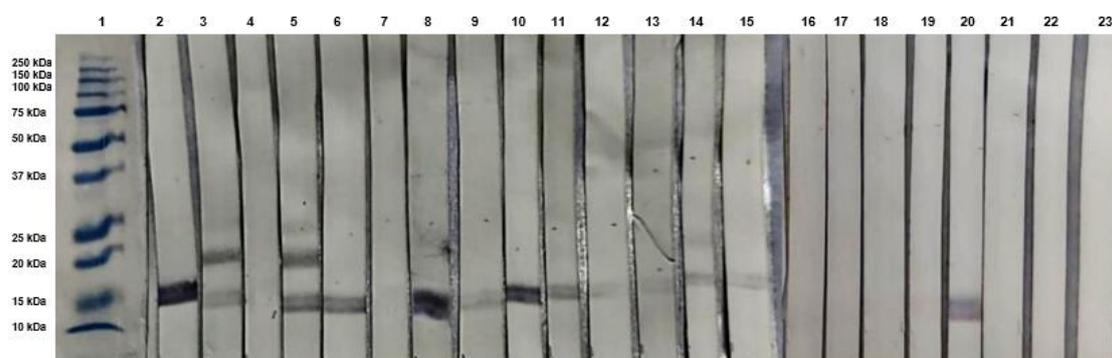


Figura 28. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Hebdomadis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar

Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 –soro do controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Bataviae (fita 6), Pyrogenes (fita 8), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffii (fita 13), Panama (fita 15), reconheceram duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3), reconheceu uma fração antigênica entre 10-15 kDa e 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5), reconheceu duas frações de massa molecular aparente entre 10-15 kDa, uma entre 15-20 kDa e a última entre 20-25 kDa. O soro reagente para sorovar Javanica (fita 14), reconheceu duas frações entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. Soro reagente para sorovar Grippytyphosa (fita 4), Australis (fita 7), Hebdomadis (fita 16), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19), Cynopteri (fita 20), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Hebdomadis.

6.1.17 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Djasiman

A figura 29 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Djasiman.

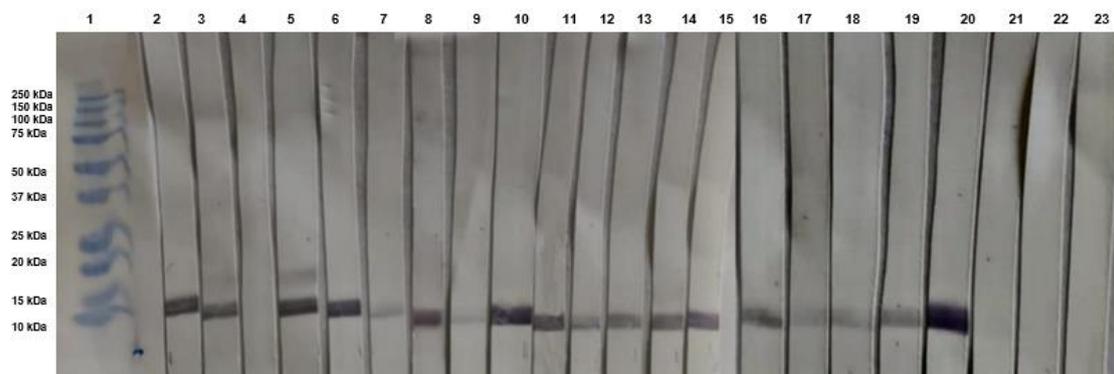


Figura 29. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Djasiman e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Copenhageni (fita 3), Bataviae (fita 6), Panama (fita 15), Hebdomadis (fita 16), reconheceram duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5), reconheceu duas frações entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Australis (fita 7), Pyrogenes (fita 8), Tarassovi (fita 9), Sejroe (fita 10), Autumnalis (fita 11), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13), Javanica (fita 14), Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18), Patoc (fita 19) e Cynopteri (fita 20), reconheceram uma fração antigênica de massa molecular aparente entre 10-15 kDa. Soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue,

utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Djasiman.

6.1.18 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Castellonis

A figura 30 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Castellonis.

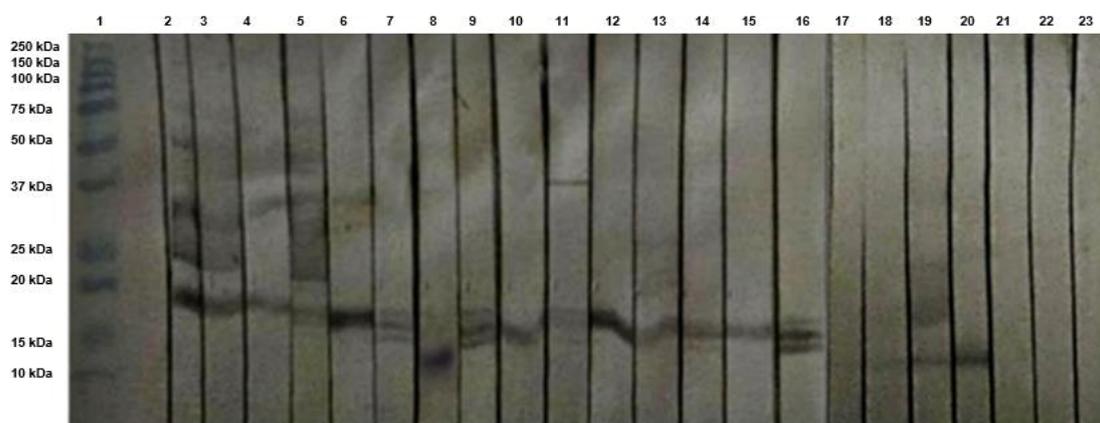


Figura 30. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Castellonis e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippotyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Bataviae (fita 6), Sejroe (fita 10), Hardjo (fita 12), Wolffi (fita 13) e Panama (fita 15), reconheceram uma fração antigênica de massa molecular entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar

Australis (fita 7) e Tarassovi (fita 9), reconheceram 3 frações proteicas de peso molecular entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae (fita 2), reconheceu uma fração proteica de peso molecular entre 15-20 kDa, uma fração entre 20-25 kDa e uma fração entre 25-37 kDa. O soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3), reconheceu uma fração de peso entre 15-20 kDa e uma entre 20-25 kDa. O soro reagente para sorovar Grippotyphosa (fita 4), reconheceu uma fração entre 15-20 kDa e uma fração entre 25-37 kDa. O soro reagente para sorovar Canicola (fita 5), reconheceu uma fração de peso molecular entre 15-20 kDa, uma fração entre 20-25 kDa e uma fração de 37 kDa. O soro reagente para sorovar Autumnalis (fita 11), reconheceu fração proteica de peso entre 15-20 kDa e uma fração de 37 kDa. O soro reagente para sorovar Hebdomadis (fita 16), reconheceu uma fração proteica de peso molecular entre 10-15 kDa, uma fração de 15 kDa e uma fração entre 15-20kDa. Os soros reagentes para os sorovares Pyrogenes (fita 8), Castellonis (fita 18) e Cynopteri (fita 20), reconheceram fração antigênica entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Patoc (fita 19), reconheceu uma fração antigênica de massa molecular aparente entre 10-15 kDa e uma entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Djasiman (fita 17), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Castellonis.

6.1.19 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Patoc

A figura 31 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Patoc.

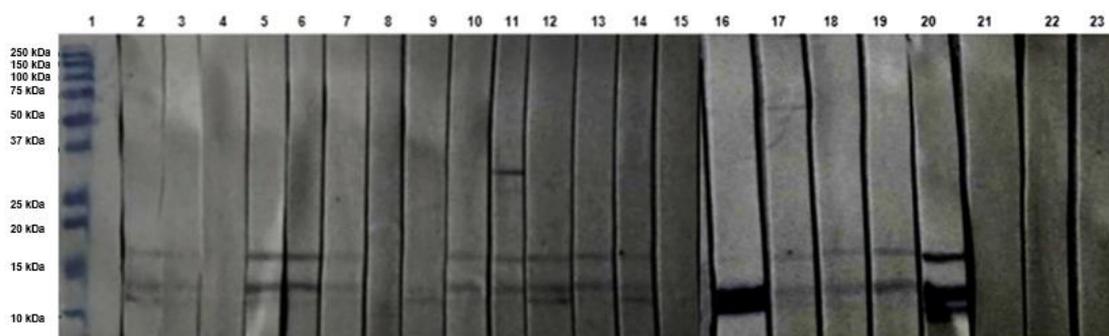


Figura 31. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Patoc e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippityphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Canicola (fita 5), Hardjo (fita 12) e Javanica (fita 14), reconheceram duas frações antigênicas de massa molecular entre 10-15 kDa e uma fração entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar reconheceram uma fração de massa molecular entre 10-15 kDa e uma fração entre 15-20 kDa. O soro reagente para sorovar Autumnalis (fita 11), reconheceu uma fração de peso entre 10-15 kDa, uma fração entre 15-20 kDa e uma fração de peso molecular ente 25-37 kDa.

Os soros reagentes para os sorovares Djasiman (fita 17), Castellonis (fita 18) e Patoc (fita 19), reconheceram duas frações entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Hebdomadis (fita 16), reconheceu uma fração proteica de peso entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Cynopteri (fita 20), reconheceu fração proteica de peso de 10 kDa e duas frações entre 10-15 kDa. Soro reagente para sorovar Grippytyphosa (fita 4), Pyrogenes (fita 8), Tarassovi (fita 9), Panama (fita 15), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Patoc.

6.1.20 Imunoreatividade das amostras de soro frente ao antígeno do sorovar Cynopteri

A figura 32 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das amostras de soro de pacientes com leptospirose frente ao antígeno extraído de sorovar Cynopteri.

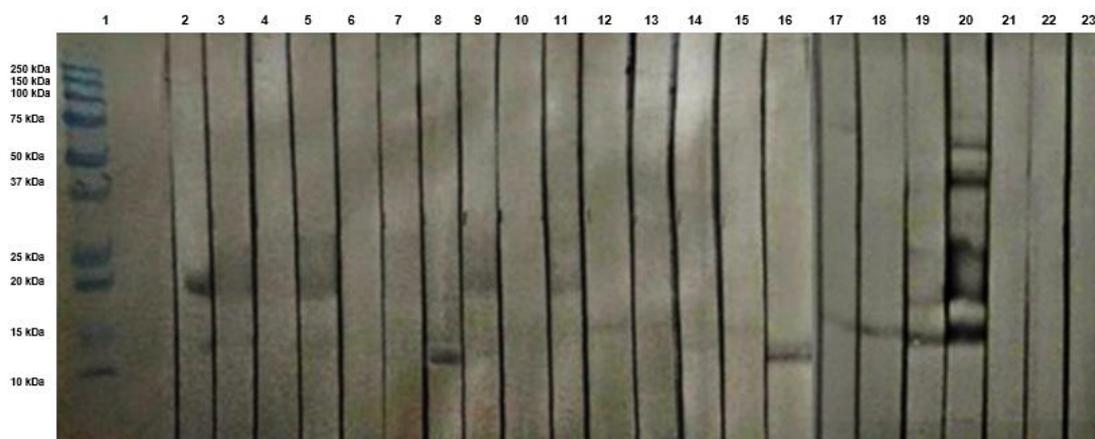


Figura 32. Reatividade dos anticorpos IgM anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Cynopteri e soros reagentes pelo MAT na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro reagente para sorovar Icterohaemorrhagiae, Fita 3 – soro reagente para sorovar Copenhageni, Fita 4 – soro reagente para sorovar Grippytyphosa, Fita 5 – soro reagente para sorovar Canicola, Fita 6 – soro reagente para sorovar Bataviae, Fita 7 – soro reagente para sorovar Australis, Fita 8 – soro reagente para sorovar Pyrogenes, Fita 9 – soro reagente para sorovar Tarassovi, Fita 10 – soro reagente para sorovar Sejroe, Fita 11 – soro reagente para sorovar Autumnalis, Fita 12 – soro reagente para sorovar Hardjo, Fita 13 – soro reagente para sorovar Wolffi, Fita 14 – soro reagente para sorovar Javanica, Fita 15 – soro reagente para sorovar Panama, Fita 16 – soro reagente para sorovar Hebdomadis, Fita 17 – soro reagente para sorovar Djasiman, Fita 18 – soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 19 – soro reagente para sorovar Patoc, Fita 20 – soro reagente para sorovar Cynopteri, Fita 21 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Panama, Fita 22 – soro de caso de óbito reagente para sorovar Castellonis, Fita 23 – soro do controle negativo

Os soros reagentes para os sorovares Icterohaemorrhagiae (fita 2), Canicola (fita 5), Tarassovi (fita 9), Autumnalis (fita 11), Castellonis (fita 18), reconheceram uma fração antigênica de massa molecular aparente entre 15-20 kDa. Os soros reagentes para os sorovares Pyrogenes (fita 8), Hardjo (fita 12), Javanica (fita 14), Hebdomadis (fita 16), reconheceram fração entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar Panama (fita 15) reconheceu uma fração de massa molecular entre 15 kDa. O soro reagente para sorovar Djasiman (fita 17) reconheceu uma fração entre 15-20 kDa e uma entre 50-75 kDa. O soro reagente para o sorovar Patoc (fita 19) reconheceu duas frações antigênicas de massa molecular aparente entre 15-20 e uma de 25 kDa. O soro reagente para sorovar Cynopteri (fita 20) reconheceu cinco frações antigênicas sendo as primeiras duas frações entre 15-20 kDa, a segunda entre 25 kDa, a terceira

entre 37 kDa e a última entre 50 kDa. Soro reagente para sorovar Copenhageni (fita 3), Sejroe (fita 10), Wolffi (fita 13), Bataviae (fita 6), Australis (fita 7), Grippytyphosa (fita 4), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Panama (fita 21), soro proveniente de óbito, reagente para sorovar Castellonis (fita 22) e soro reagente para dengue, utilizado como controle negativo (fita 23), apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Cynopteri.

6.2. Imunoreatividade dos casos de óbito com IgG

O “immunoblotting” foi realizado conforme item 3.6, alterando apenas os anticorpos anti-IgM humanos conjugados com peroxidase para anticorpos anti-IgG humanos conjugados com peroxidase, para verificar a imunoreatividade das amostras de soros de casos de óbito dos sorovares Panama e Castellonis.

6.2.1 Amostras de soro provenientes de casos de óbito frente ao antígeno de sorovar Panama e anticorpo anti-IgG

A figura 33 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das duas amostras de soro de casos de óbitos provenientes do sorovar Panama, frente ao antígeno extraído de sorovar Panama.

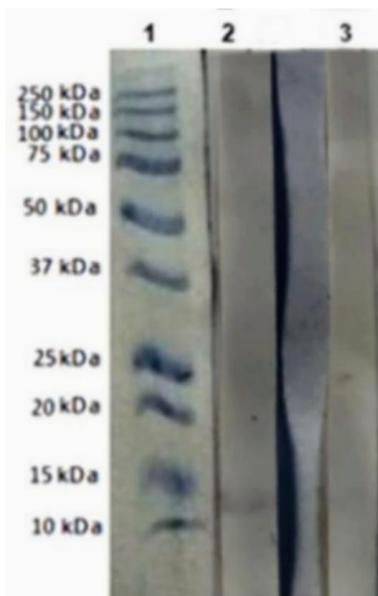


Figura 33. Reatividade dos anticorpos IgG anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Panama e soros de casos de óbito reagentes pelo MAT, na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – soro de caso de óbito 1 reagente para sorovar Panama, Fita 3 – soro de caso de óbito 2 reagente para sorovar Panama

Os soros provenientes de casos de óbito para sorovar Panama apresentaram reconhecimento de fração antigênica de massa celular aparente entre 10-15 kDa.

6.2.2 Amostras de soro provenientes de casos de óbitos frente ao antígeno do sorovar Castellonis e anticorpo anti-IgG

A figura 34 apresenta a avaliação da imunoreatividade, por “immunoblotting”, das duas amostras de soro de casos de óbitos provenientes do sorovar Castellonis, frente ao antígeno extraído de sorovar Castellonis.

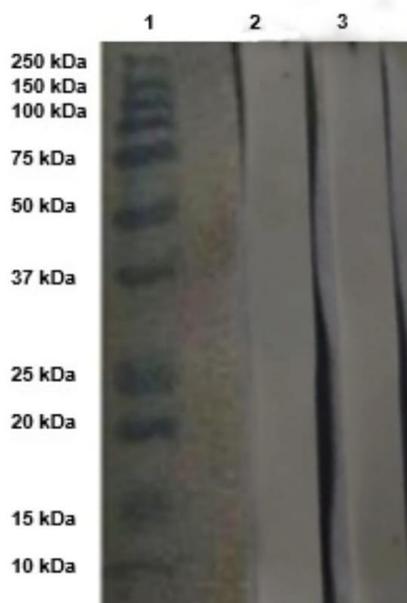


Figura 34. Reatividade dos anticorpos IgG anti-leptospiras por “immunoblotting” em fitas de nitrocelulose com antígeno obtido do sorovar Castellonis e com soros de casos de óbito reagentes pelo MAT, na diluição 1:100. Fita 1 – Padrão de Peso Molecular, Fita 2 – caso 1 soro reagente para sorovar Castellonis, Fita 3 – caso 2 soro reagente para sorovar Castellonis.

Os soros provenientes de casos de óbito para sorovar Castellonis apresentaram ausência de reatividade quando avaliados frente ao antígeno extraído do sorovar Castellonis.

7. DISCUSSÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial¹, encontrada principalmente em países subtropicais e tropicais^{2,12}, com altas taxas anuais de casos registrados³⁷. Como são excretadas através da urina de animais, como roedores e cães^{12,13}, a transmissão animal-humano em épocas de enchentes se torna mais comum^{12,34}. A doença vem sendo estudada desde 1907⁴, e até os dias atuais, continua apresentando dificuldades no diagnóstico.

Devido ao seu complexo LPS^{18,19}, as leptospiras conseguem sobreviver em ambientes favoráveis para sua sobrevivência, como no caso de solo e água^{12,13, 35}. Essa complexidade do LPS refere-se às lipoproteínas encontradas na membrana externa das leptospiras¹², considerado um fator de virulência. Essas proteínas são capazes de causar falha no reconhecimento do sistema imune humano¹⁸, por ativar o TLR2 ao invés do TLR4^{23,24}, ao contrário da maioria das bactérias Gram-negativas, que ativam o TLR4.

A proteína mais abundante na membrana externa das leptospiras é a lipoproteína LipL 32^{27,28} que possui peso molecular entre 32 kDa³⁰. Outras proteínas já descritas são Dnak¹⁹, OmpL1²⁸, LipL 63²⁰. Por causa dessa diversidade de lipoproteínas, há dificuldade de encontrar melhorias para o diagnóstico laboratorial da leptospirose e na produção de uma vacina humana eficaz³¹. Com mais de 300 sorovares descritos atualmente, se faz necessário o estudo de proteínas de leptospiras frente a resposta imune humoral humana, para que futuramente, as melhorias nas metodologias para o diagnóstico da leptospirose e a vacinação da população mundial contra essa doença sejam possíveis.

Esse estudo foi realizado de forma precursora, com o intuito de visualizar as frações antigênicas de 20 sorovares de *Leptospira ssp.*, utilizando a técnica de SDS-PAGE e também, identificar o perfil da reatividade entre amostras de soros de pacientes com leptospirose e os antígenos dos sorovares de leptospirosas, através da técnica de “immunoblotting”, visto que não há na literatura trabalhos que utilizaram essa vasta quantidade de amostras de soros e antígenos.

Durante a etapa de padronização, para avaliar se haveria uma possível diferença entre as concentrações na técnica de “immunoblotting”, o antígeno utilizado foi apenas do sorovar Copenhageni e o mesmo foi solubilizado com tampão de amostra 5x redutor e 1x redutor. Observou-se que os soros de primeira amostra não reagente e segunda amostra reagente para leptospirose apresentaram resultados diferentes na reatividade com os antígenos solubilizados com tampões de amostra em diferentes concentrações. No “immunoblotting” realizado com o antígeno solubilizado com tampão de amostra 5x redutor, pudemos observar que dois casos de primeira amostra de soro não reagente para leptospirose com segunda amostra reagente para sorovar Copenhageni no MAT, apresentaram reatividade em primeira e segunda amostra. Portanto, podemos considerar que apesar de apresentar resultado não reagente pelo MAT, a técnica de “immunoblotting” apresentou ser mais sensível na detecção dos anticorpos reagentes às proteínas dos antígenos. No “immunoblotting” realizado com antígeno de sorovar Copenhageni solubilizado com tampão de amostra 1x redutor, os casos de primeira amostra não reagente para leptospirose, pelo MAT, apresentaram reatividade, assim como as amostras reagentes, indicando que a possível

combinação entre extração de antígeno, amostra de soro e a técnica utilizada foram capazes de detectar reatividade.

O caso 3, apresentado no item 3.1, apresentou resultado não reagente pelo MAT na primeira amostra e resultado reagente na segunda amostra para o sorovar Copenhageni, porém, ao utilizar essas mesmas amostras de soro no “immunoblotting”, houve ausência de reatividade. Uma hipótese, descrita por Lafetá²⁰, seja de que a quantidade de proteína não foi suficiente para que pudesse ocorrer uma reação.

Após a etapa de padronização, a reatividade encontrada na técnica de “immunoblotting”, dentre todos os sorovares e as 19 amostras de soros, variou entre frações de massas moleculares com pesos variando de 10 kDa a 75 kDa, sendo a média de massa molecular mais prevalente entre 15-20 kDa. Na literatura, são descritas reatividades entre 14 kDa a 97 kDa^{54,56,57,59,60}, com frações antigênicas em média com massa molecular pesando entre 30-40 kDa, que se assemelham com a lipoproteína mais prevalente entre as leptospiras, a LipL 32.

Conforme Lafetá²⁰, uma possível explicação para essas diferenças entre frações antigênicas pode ser a patogenicidade das leptospiras, tempo de exposição entre hospedeiro e bactéria, sistema imune do hospedeiro, que podem contribuir para uma resposta imune diferente, e, portanto, uma variação de massas moleculares.

A fração de massa molecular entre 15-20 kDa, demonstrada nesse trabalho pela técnica de “immunoblotting” em todos os antígenos, exceto no antígeno de sorovar Tarassovi, pode estar relacionada com as lipoproteínas descritas e

estudadas por Lafetá com sorovar Hardjoprajitno²⁰ e descrita por Barbosa et al.⁶³ com sorovar Copenhageni, sendo elas LipL21 e LcpA. A fração entre 25-37 kDa apresenta similaridade com as massas moleculares das lipoproteínas, LipL 31, descrita por Haake e Zückert¹⁹ e LipL32, LipL 36 e OmpL1 descritas por Cullen et al.²⁸. Vale ressaltar que a OmpL1 também pode ser expressa em células de *E. coli*¹⁹. Frações de massas moleculares entre 37-50 kDa podem ter relação com LipL 41²⁸ e LipL 48^{28,20}. As frações de massas moleculares acima de 50 kDa, demonstradas nesse atual estudo pelas técnicas já apresentadas, possuem similaridade de massa molecular com a lipoproteína de 62 kDa (GroEl)⁵⁴, a lipoproteína de 75 kDa (LMB216)⁵⁵, a lipoproteína de 63 kDa (LipL 63)²⁰ e a de massa molecular de 76 kDa (DnaK)⁵⁶.

Durante o processo de extração de antígeno pode ocorrer uma degradação de proteínas, conforme observado por Lafetá²⁰. A diferença entre resultados previamente descritos na literatura para alguns antígenos de leptospiros e também, na reatividade por “immunoblotting”, comparada com os resultados obtidos por esse presente estudo, pode ter como responsável a forma de extração do antígeno, ou algum outro processo durante a aplicação das técnicas. A degradação da LipL 32 pode resultar em inúmeras massas moleculares, podendo chegar a aproximadamente 10 kDa⁶⁵ e 26,44 kDa, 29 kDa, 30,88 kDa, 31,81 kDa e 32 kDa²⁰, ou até mesmo, ocorrendo a divisão mais fragmentada da proteína original, resultando em isoformas, descritas como LipL 32.26, LipL 32.24, LipL32.23a,b,c; LipL32.22; LipL32.16; LipL32.14a,b²⁸. Até o momento, não foram demonstradas outras isoformas para outras lipoproteínas. Os resultados inéditos obtidos nesse presente estudo, em relação à questão de degradação de proteínas, sugerem uma

possibilidade sobre uma nova lipoproteína encontrada ou isoformas de uma proteína já caracterizada pois a média geral de fração antigênica na reatividade pela técnica do “immunoblotting” demonstrou constância na massa molecular entre 15 kDa.

O preparo da técnica de SDS-PAGE nesse trabalho foi realizado conforme Laemmli⁵¹. Os géis de poliacrilamida descritos na literatura variaram entre 10%^{51,64,56}, 12%^{58,65} e 12,5%^{33,30,62}. A porcentagem de 12,5%, escolhida para a confecção dos géis nesse presente estudo, consegue detectar desde proteínas com massa molecular menores até proteínas com massa molecular maiores, entre 10 KDa a 250 kDa.

No SDS-PAGE, os resultados visualizados mostraram frações antigênicas com massas moleculares variando de 10 kDa a 75 kDa, com maior prevalência de frações entre os antígenos entre 10-15 kDa, 37-50 kDa e 75 kDa. As massas moleculares estão dentro dos pesos já descritos por outros autores ^{20,54,57,58,59,20,60,61,62}, que variaram de 14 kDa a 70 kDa, sendo a fração mais prevalente entre 32 kDa⁵⁶, descrita como lipoproteína LipL 32, a mais prevalente dentre as proteínas de membrana externa das leptospiros²⁸.

Analisando as frações visualizadas na técnica de SDS-PAGE, as massas moleculares, de uma forma geral, se concentraram em pesos acima de 37 kDa.

Nos antígenos dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Pomona, Bataviae, Australis, Pyrogenes, Autumnalis, Hardjo, Wolffi, Hebdomadis e Djasiman, foram visualizadas frações proteicas de massa molecular entre 10-15 KDa, 25-37 kDa, 37-50 kDa e 50-75 kDa, similares com as descritas por Leite et al. (1996) e Brown et al. (1991). Vários autores^{54,57}

demonstraram frações proteicas para o sorovar Grippotyphosa, com massas entre 29-32 kDa, 35-43 kDa, 64-68 kDa e 70 kDa similares com as massas moleculares visualizadas no presente estudo, sendo entre 10 kDa, 25-37 kDa, 37-50 kDa e entre 50-75 kDa. Brown et al. ⁵⁷ descreveram frações moleculares para o sorovar Sejroe, com massa molecular entre 32-35 kDa, 37-42 kDa e entre 64-70 kDa, semelhantes às visualizadas no atual estudo, onde foi possível visualizar frações de massa molecular entre 10-15 kDa, 37-50 kDa e 50-75 kDa. O presente estudo também avaliou os resultados de frações proteicas para o sorovar Castellonis, onde a massa molecular variou entre 10-15 kDa, 37-50 kDa e 50-75 kDa, assim como a descrita por Chapman et al. ⁶⁰, com visualização de fração proteica de massa molecular de 40 kDa. Conforme citado anteriormente, as variações de massa molecular das frações proteicas podem ser resultado de degradação do antígeno em alguma etapa das técnicas utilizadas.

Até o momento, não foram descritas frações antigênicas, pela técnica de SDS-PAGE, dos sorovares Bataviae, Australis, Pyrogenes Wolffi, Hebdomadis, Djasiman, Cynopteri, Tarassovi, Javanica, Panama e Patoc, sendo as frações antigênicas descritas nesse trabalho inéditas.

A variação de frações antigênicas visualizadas nos antígenos de leptospiras reforça a ideia de Brown et al. ⁵⁷, de que cada sorovar possui uma diferença na estrutura em relação a quantidade de proteínas existentes em suas membranas externas, na composição do LPS, mesmo pertencendo a mesma espécie ou sorogrupo^{12,13}.

Outros autores que utilizaram conjugado de peroxidase IgM, diluição de soro em 1:100 e PBS 3%^{28,59,60,62} no “immunoblotting” demonstraram reatividade semelhante às encontradas no presente estudo. Trabalhos que utilizaram antissoro de coelho^{30,53,56} também demonstraram reatividade semelhante.

A leptospirose em seres humanos ocorre pelo fato de que o TLR4 não reconhece e não impede que a infecção por leptospiras ocorra. Já em animais, como no caso dos roedores, o TLR4 reconhece o LPS das leptospiras, fazendo com que não ocorra uma infecção¹⁹. Essa resposta baseada no sistema imune do hospedeiro, pode ser uma possível explicação para as diferenças entre as massas moleculares encontradas nesse presente estudo com as massas descritas por outros autores que utilizaram antissoro animal^{10,17,29,52,57,59}.

No “immunoblotting”, as membranas dos antígenos de sorovar Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Pomona, Bataviae, Australis, Pyrogenes, Autumnalis, Hardjo, Wolffi, Hebdomadis e Djasiman, apresentaram resultados de frações antigênicas com massas moleculares entre 10-15 kDa, 15-20 kDa e 20-25 kDa, diferente dos resultados encontrados por outros autores^{30,54,56,57,60} que demonstraram reatividade com frações maiores que 25 kDa, sendo elas frações de massa molecular entre 37-50 kDa, 50-75 kDa e ente 75-97 kDa.

Nas membranas com antígenos dos sorovares Grippotyphosa e Cynopteri, a reatividade apresentou frações antigênicas de massa molecular entre 10-15 kDa, 15-20 kDa, 20-25 kDa, 25-37 kDa, 37-50 kDa e 50-75 kDa. Natarajaseenivasan et al.⁵⁴ e Brown et al.⁵⁷ demonstraram massas moleculares para o sorovar Grippotyphosa entre 14 kDa, 82 kDa e 97 kDa.

Mesmo pertencendo a mesma espécie e podendo ocorrer reação cruzada entre eles³⁰, os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o antígeno de sorovar *Cynopteri* apresentou mais reatividade e frações de massa molecular maiores que as encontradas no sorovar *Grippotyphosa*. Válido ressaltar que a amostra de soro reagente para sorovar *Cynopteri* frente ao antígeno de sorovar *Cynopteri*, apresentou reatividade com duas frações entre 15-20 kDa, uma fração entre 25 kDa, entre 37 kDa e uma fração entre 50 kDa. O soro reagente para sorovar *Djasiman*, na reatividade com o antígeno do sorovar *Cynopteri*, apresentou frações antigênicas de massa molecular entre 15-20 kDa e uma entre 50-75 kDa.

Os resultados obtidos através do reconhecimento no "immunoblotting", com os sorovares *Sejroe*, *Javanica* e *Castellonis*, foram entre 10-15 kDa, 15-20 kDa, 25-37 kDa, 37-50 kDa, 50-75 kDa, semelhantes as frações descritas na literatura^{56,57}, de bandas de 20 kDa, 30-45 kDa, 43-62, 62-82 kDa e fração descrita por Chapman et al.⁶⁰ com massa molecular de 94 kDa. Diferente dos resultados desses autores, no presente estudo foi possível encontrar frações antigênicas menores, com massas moleculares entre 10-15 kDa. O soro reagente para sorovar *Icterohaemorrhagiae* apresentou reatividade ao ser analisado com o antígeno de sorovar *Sejroe*, onde foi possível visualizar uma variedade de frações antigênicas, sendo duas frações entre 10-15 kDa, uma entre 15-20 kDa, 20-25 kDa, 25-37 kDa e 50-75 kDa. A membrana com antígeno de sorovar *Panama* reconheceu frações antigênicas entre 10-15 kDa e 15-20 kDa.

O sorovar Tarassovi apresentou reatividade semelhante às frações reconhecidas pelo “immunoblotting” de massas moleculares entre 30 kDa a 82 kDa descritas por Croda et al.⁵⁶. Válido ressaltar que o autor utilizou um “pool” de amostras de soros para a realização dessa reatividade de massa molecular de 82 kDa. No presente estudo, as frações encontradas foram entre 10-15 kDa e 250 kDa, com reconhecimento de frações de 100 kDa, 150 kDa e 250 kDa com a amostra de soro reagente para sorovar Patoc.

A membrana com sorovar Patoc, saprófito, apresentou reconhecimento dentre os soros com frações entre 10-15 kDa, 15-20 kDa e 25-37 kDa. Na literatura, é possível encontrar frações de 14 kDa, 20-29 kDa, 29-37 kDa, 43-68 kDa, 68-97 kDa^{54,56,60} e 116 kDa⁵⁶, sendo essa última fração ainda não descrita na literatura.

Até o momento, não há descrição das frações antigênicas dos sorovares Wolffi, Djasiman, Cynopteri e Panama no “immunoblotting”, portanto os resultados com as reatividades nesse presente trabalho são inéditos. Apesar da reatividade entre amostras de soros e 20 antígenos de sorovares utilizados nesse presente estudo apresentarem resultados de frações antigênicas com massa molecular similares, com uma média entre 10-15 kDa, não foi possível encontrar uma única fração que pudesse ser uma característica individual de cada sorovar. Isso demonstra que o “immunoblotting” não é uma técnica que poderia substituir o MAT, visto que o teste padrão ouro consegue entregar resultados individuais, de acordo com a reação da amostra de soro com cada sorovar. Contudo, para uso apenas de detecção de proteínas em que futuramente possam ser caracterizadas, a

técnica cumpre seu propósito, possibilitando o uso dessas proteínas de leptospiros em pesquisas de caracterização e possível uso em produção de vacinas humanas e testes diagnósticos.

Nesse trabalho também foi estudado a reatividade de casos de óbito provenientes de sorovar Panama e Castellonis, em que apresentaram titulação no MAT de 100 e por serem casos de óbito, não foi possível obter uma segunda amostra. As amostras não apresentaram reatividade quando utilizado anticorpo anti-IgM, tanto com o sorovar Panama como com o sorovar Castellonis. Mas, ao utilizar o anticorpo anti-IgG, foi possível observar uma reatividade nos soros de casos de óbito do sorovar Panama, com fração antigênica de massa molecular entre 10-15 kDa, sugerindo que esses casos possuíam imunoglobulinas de memória imunológica.

Os casos de óbito provenientes de sorovar Castellonis apresentaram ausência de reatividade com anticorpos anti-IgM e anti-IgG. O resultado com título de 100 no MAT pode ser resultado de uma infecção residual⁶⁶, mas que não apresenta proteínas suficientes para serem detectados pelo “immunoblotting”. Não houve reatividade do soro proveniente de caso de dengue, utilizado como controle negativo, frente aos 20 antígenos de sorovares de leptospira, mostrando que a técnica pode ser utilizada para descartar casos de possíveis reações cruzadas e diagnosticar apenas os casos de leptospirose.

8. CONCLUSÃO

- O tampão de amostra redutor 1x utilizado para extração dos antígenos, apresentou resultados satisfatórios, tanto para visualização das frações dos antígenos no SDS-PAGE, como para observar a reatividade no “immunoblotting”;
- Com a técnica de SDS-PAGE foi possível obter e visualizar as frações proteicas de 20 sorovares, sendo eles: Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Grippotyphosa, Canicola, Pomona, Bataviae, Australis, Pyrogenes, Tarassovi, Sejroe, Autumnalis, Hardjo, Wolffi, Javanica, Panama, Hebdomadis, Djasiman, Castellonis, Patoc e Cynopteri;
- Através da técnica de “imunoblotting” foi possível verificar o perfil de reatividade entre os 19 soros reagentes para leptospirose frente aos 20 sorovares estudados;
- A frações visualizadas nos géis SDS-PAGE dos antígenos dos 20 sorovares apresentaram em média frações de massas moleculares entre 10 kDa a 75 kDa;
- No “immunoblotting”, as frações antigênicas dos 20 sorovares, variaram entre frações de peso molecular de 10 kDa a 250 kDa;
- Caso reagente para dengue (controle negativo) apresentou ausência de reatividade frente a todos os antígenos;
- Soros provenientes de óbito reagente para sorovar Panama apresentaram reatividade no “immunoblotting” com o uso de anticorpo anti-IgG, mas não apresentaram reatividade com o uso de anticorpo anti-IgM;

- Soros provenientes de óbito reagente para sorovar Castellonis, apresentaram ausência de reatividade com o uso de anticorpos anti-IgM e anti-IgG;
- O reconhecimento proteico em ambas as técnicas utilizadas, apresentaram massa molecular entre 20-37 kDa, mostrando semelhança com a lipoproteína LipL 32;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fry NK, La Ragione RM, Ready D. Leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*. *Journal of Medical Microbiology*; 2019;68(3):289.
2. Jost BH, Adler B, Faine S. Reaction of monoclonal antibodies with species specific determinants in *Leptospira interrogans* outer envelope. *Journal of Medical Microbiology*. *Journal of Medical Microbiology*; 1988;27(1):51–7.
3. Alston JM, Brown HC. The Epidemiology of Weil's Disease. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*; 1937;30(6):741–56.
4. Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*. *Infection, Genetics and Evolution*; 2009;9(5):760–8.
5. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of well's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *Journal of Experimental Medicine*. *Journal of Experimental Medicine*. 1916;23(3):377–402.
6. Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The rat as a carrier of spirochaeta icterohæmorrhagiae, the causative agent of weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *Journal of Experimental Medicine*. *Journal of Experimental Medicine*; 1917;26(3):341–53.

7. Otteraaen, A. The Spirochete of Infectious Jaundice (*Spirocheta icterohemorrhagiae*, Inada; *Leptospira*, Noguchi) in House Rats in Chicago. *The Journal of Infectious Diseases*, 1919;24(5), 485–488.
8. Fairley NH. Weil's disease among sewer workers in london. *British Medical Journal*; 1934;2(3835):10–4.
9. Wolff JW, Turner LH. Report of a Meeting of the Taxonomic Subcommittee on *Leptospira* Montreal, 16-17 August 1962. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*; 1963;13(3):161–6.
10. Johnson RC, Rogers P. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology*; 1964;88(6):1618–23.
11. Corrêa MOA, Amato Neto V, Pedro RDJ, Konichi SR, Fleury GC. Considerações sôbre caso humano de leptospirose canícola, com isolamento e identificação do agente etiológico pela primeira vez no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.; 1971;5(1):55–8.
12. Levett PN. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*: 2001;14(2), 296–326.
13. Faine S. Leptospirosis. *Bacterial Infections of Humans*; 1998;
14. Marquez, A., Djelouadji, Z., Lattard, V., & Kodjo, A. (2017). Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire. *International microbiology : the official journal of the Spanish*

- Society for Microbiology, 20(4), 184–193.
15. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, et al.. Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a *Rattus* Species Reservoir in the Peruvian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 2008;2(4):e213.
 16. Haake DA, Matsunaga J. *Leptospira*: A spirochaete with a hybrid outer membrane. *Molecular Microbiology*. 2010;77(4):805–14.
 17. Wasiński B, Pejsak Z. Reactivity of heat-stable *Leptospira* antigenic preparation used in enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies in swine serum. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*; 2012;15(1)
 18. Melo TF, Peconick AP. As características da *Leptospira* spp.: uma revisão de literatura. *Scire Salutis*. *Scire Salutis*; 2019;9(3):1–7.
 19. Haake DA, Zückert WR. The leptospiral outer membrane. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:187-221.
 20. Lafetá BN. Perfil Protéico da Membrana Externa da *Leptospira interrogans* sorovariedade hardjoprajitno. Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
 21. Werts C. Interaction of *Leptospira* with the Innate Immune System. In: *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017. p. 163–87.
 22. Schroppel B, He JC. Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. *Kidney International*. *Kidney International*;

- 2006;69(5):785–7.
23. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. *Scandinavian Journal of Immunology*; 2011;73(5):408–19.
 24. Yang C-W. Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney International*; 2007;72(8):918–25.
 25. Diniz RL. Estudo comparativo de protocolos e meios de cultivo para isolamento de *Leptospira* sp. Universidade Federal Fluminense; 2011.
 26. Silveira TB. Perfil de crescimento de genomoespécies de *leptospira* spp. Em diferentes meios de cultura. Universidade Federal Fluminense; 2018.
 27. Bashiru, G., & Bahaman, A. R. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. *The Indian journal of medical research*, 2018; 147(1), 15–22.
 28. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global Analysis of Outer Membrane Proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. *Infection and Immunity*. *Infection and Immunity*; 2002;70(5):2311–8.
 29. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al.. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infection and Immunity*; 2000;68(4):2276–85.
 30. Doungchawee G, Sirawaraporn W, Icksang-Ko A, Kongtim S, Naigowit P, Thongboonkerd V. Use of immunoblotting as an alternative method for

- serogrouping *Leptospira*. *Journal of Medical Microbiology*; 2007;56(5):587–92.
31. Bacelo KL, Hartwig DD, Seixas FK, Schuch R, Moreira ADS, Amaral M, et al.. Xanthan Gum as an Adjuvant in a Subunit Vaccine Preparation against Leptospirosis. *BioMed Research International*; 2014;2014:1–0.
 32. Félix SR, Hartwig DD, Argondizzo APC, Silva ÉF, Seixas FK, Neto ACPS, et al.. Subunit Approach to Evaluation of the Immune Protective Potential of Leptospiral Antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*; 2011;18(12):2026–30.
 33. Saengjaruk P, Chaicumpa W, Watt G, Bunyaraksyotin G, Wuthiekanun V, Tapchaisri P, et al. Diagnosis of Human Leptospirosis by Monoclonal Antibody-Based Antigen Detection in Urine. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40:480–9.
 34. Blanco RM, Romero EC. Fifteen years of human leptospirosis in São Paulo, Brazil. *Journal of Epidemiological Research*. *Journal of Epidemiological Research*; 2015;2(1):56.
 35. Adler B, De La Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. *Veterinary Microbiology*; 2010;140(3-4):287–96.
 36. De Brito T, Silva AMGD, Abreu PAE. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*; 2018;60(0).
 37. Romero EC, Bernardo CCDM, Yasuda PH. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Revista do*

- Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2003;45(5):245–8.
38. Sun AH, Liu XX, Yan J. Leptospirosis is an invasive infectious and systemic inflammatory disease. *Biomedical Journal*. 2020;43(1):24–31.
 39. World Health Organization W. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003;
 40. Ministério da Saúde Brasil. Leptospirose : Diagnóstico E Manejo. 2009;1–34.
 41. Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SYAM, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. flaB-Polymerase Chain Reaction (flaB-PCR) and Its Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis Are an Efficient Tool for Detection and Identification of *Leptospira*Spp.. *Microbiology and Immunology*;2001;45(6):491–6.
 42. Letocart M, Baranton G, Perolat P. Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(1):248–53.
 43. Galloway RL, Levett PN. Levett. Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;78:628–32.
 44. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Analysis of multilocus sequence typing for identification of *Leptospira* isolates in Brazil. *Journal of Clinical*

- Microbiology. 2011;49(11):3940–2.
45. Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(11):3954–62.
 46. Gussenhoven GC, Van Der Hoorn MAWG, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35(1):92–7.
 47. Roy S, Biswas D, Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Antigenic and genetic relatedness of *Leptospira* strains isolated from the Andaman Islands in 1929 and 2001. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;52(10):909–11.
 48. Yasuda PH, Sakata EE, Shikanai-Yasuda MA, Vasconcelos S de A, Romero EC, Silva MV da, et al. Avaliação da contraímunoeletroforese com antígenos dos sorovars icterohaemorrhagiae E patoc no diagnóstico sorológico da leptospirose humana. Vol. 33, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1991. p. 497–502.
 49. Naoum PC. Eletroforeses. • Hemoglobinopatias. • Proteínas Séricas. • Lipoproteínas. • DNA. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo. 2010.
 50. Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho M V., et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Embrapa*. 2005;(ISSN 9192-0099):1–12.

51. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*; 1970;227(5259):680–5.
52. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1979;76(9):4350–4.
53. Pope V, Johnson RC. Effect of heat or formalin treatment of leptospires on antibody response detected by immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29(7):1548–50.
54. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sugunan AP, Sharma S, Sehgal SC. Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis. *The Indian journal of medical research*. 2004;120(3):151–9.
55. Toma C, Murray GL, Nohara T, Mizuyama M, Koizumi N, Adler B, et al. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. *Cellular Microbiology*. 2014;16(9):1366–77.
56. Croda LIO, Flannery B, Mazel M, Guerreiro H, Reis O, Levett PN, et al. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. *Infection and immunity*. 2001;69(8):4958–68.
57. Brown JA, LeFebvre RB, Ming Jeng Pan. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. *Infection and immunity*. 1991;59(5):1772–7.

58. Parma AE, Cerone SI, Sansinanea SA. Biochemical analysis by SDS-PAGE and Western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1992;33(1-2):179-85.
59. Chapman AJ, Adler B, Faine S. Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Journal of medical microbiology*. 1988;25(4):269-78.
60. Chapman AJ, Faine S, Adler B, Everard COR. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. *Epidemiology and infection*. 1991;107(1):143-55.
61. Carneiro LA, Bahia M de NM, Pereira WLA, Dias HLT, Costa ARF da. Investigaçã sorológica, molecular e anatomopatológica para leptospirose em ovinos (*Ovis aries*) procedentes de um biotério de criaçã. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2015;6(4):55-61.
62. Leite LTQ, Resende M, Souza W, Camargos ERS, KowyMC. Production and characterization of monoclonal antibodies to the EDTA extract of *Leptospira interrogans*, serovar icterohaemorrhagiae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; set-out, 1996 29:483-489.
63. Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Morais ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, et al. Functional Characterization of LcpA, a Surface-Exposed Protein of *Leptospira* spp. That Binds the Human Complement Regulator C4BP. *Infection and Immunity*; 2010;78(7):3207-16.
64. Luo Y-H, Yan J, Mao Y-F, Li S-P. Determination of the genus-specific

- antigens in outer membrane proteins from the strains of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* with different virulence. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A. Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*; 2004;5(4):462–6.
65. Alves SF, Lefebvre RB, Probert W. Amino acid sequences of proteins from *Leptospira* serovar pomona. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 2000;95(4):503–4.
66. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011;105(5):289–97.

10.

APÊNDICE

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Proteínas de leptospiros reconhecidas durante a resposta imunológica humoral na leptospirose humana

Pesquisador: ELIETE CALO ROMERO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22704619.1.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.806.761

Apresentação do Projeto:

Nada a acrescentar ao parecer substanciado do CEPIAL nº 3.665.921 de 28/10/2019.

Objetivo da Pesquisa:

Nada a acrescentar ao parecer substanciado do CEPIAL nº 3.665.921 de 28/10/2019.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada a acrescentar ao parecer substanciado do CEPIAL nº 3.665.921 de 28/10/2019.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a acrescentar ao parecer substanciado do CEPIAL nº 3.665.921 de 28/10/2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Análise ética com base no parecer substanciado do CEPIAL nº 3.665.921 de 28/10/2019 e atendimento à pendência.

A pesquisadora responsável justificou a dispensa do TCLE alegando que os soros em repositório no Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz são oriundos da rotina diagnóstica e a eles não estão associadas informações pessoais dos indivíduos que lhes deram origem a fim de localiza-los e, assim sendo, não é possível o acesso para a obtenção do termo. Informou, ainda, que o material biológico será usado somente para o projeto de pesquisa específico e que serão guardados o sigilo, a confidencialidade e o anonimato;

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 3.806.761

acrescenta-se desse modo o Termo de sigilo e confidencialidade.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Na data de 22/01/2020, em tempo desta análise ética, Dra. Eliete Caló Romero, pesquisadora responsável, e Luz Marina Trujillo, coordenadora do CEPIAL, reuniram-se para esclarecimentos sobre a justificativa de dispensa do TCLE. Nova redação foi dada ao documento, documento este adicionado ao protocolo de pesquisa pela coordenadora do comitê em 22/01/2020.

2. O protocolo de pesquisa, pela análise do conjunto dos documentos, foi considerado aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS Nº 466/2012 com base nas deliberações do colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 16 de janeiro de 2020.

3. Em conformidade com a Resolução CNS Nº 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

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

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

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

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

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



Continuação do Parecer: 3.806.761

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2020_TCLE_Justificativa_Eliete.pdf	22/01/2020 16:49:15	Luz Marina Trujillo	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1434273.pdf	04/12/2019 14:16:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	esclarecimento.pdf	04/12/2019 14:15:34	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Outros	termo_de_responsabilidade_e_sigilo.pdf	04/12/2019 14:13:36	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	01/10/2019 14:35:04	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Cronograma	cronograma_de_desenvolvimento.pdf	01/10/2019 14:31:35	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Imunoblotting.pdf	01/10/2019 14:29:48	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_anuencia.pdf	01/10/2019 14:28:42	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	manuseio_soros.pdf	01/10/2019 14:28:26	ELIETE CALO ROMERO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	01/10/2019 14:22:37	ELIETE CALO ROMERO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Janeiro de 2020

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador(a))

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