

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

**Avaliação da glicolipoproteína como antígeno para
sorodiagnóstico da leptospirose**

Roberta Morozetti Blanco

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Kioko Takei

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Blanco,Roberta Morozetti
B641g Avaliação da glicolipoproteína como antígeno para
sorodiagnóstico com leptospirose. -- São Paulo, 2007.
1v.(varias paginações)

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Takei, Kioko

1. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Leptospirose humana :
Medicina I. T. H. Takei, Kioko, orientador.

616.0756-9 CDD

Roberta Morozetti Blanco

Avaliação da glicolipoproteína como antígeno para
sorodiagnóstico da leptospirose

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Kioko Takei
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Adelaide Jose Vaz
1º. examinador

Dra Eliete Caló Romero
2º. examinador

São Paulo, 09 de março de 2007

Aos meus pais, meus maiores e melhores exemplos de vida, por terem me ensinado, cada um do seu jeito, o significado de perseverança, luta, esperança, honestidade, bondade, respeito, carinho e principalmente amor. Por acreditarem nas minhas escolhas e me apoiarem durante meu caminho.

Ao Valner, agradeço por todo carinho, respeito, companheirismo, paciência, amor e atenção dedicados a mim. Por compartilhar a vida comigo e por toda ajuda na parte tecnológica deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Carla Morozetti Blanco Sinto e Rodrigo Morozetti Blanco, por estarem presentes em todas as horas;

À Dra. Kioko Takei, que me orientou e me ensinou a escrever o trabalho científico e por todas as palavras de conforto nas horas de aflição;

À Dra Eliete Caló Romero, por todo o ensinamento, apoio e estímulo, sem os quais eu não teria continuado na pesquisa científica;

À Sandra, por toda paciência e ajuda no auxílio técnico no setor de leptospirose;

À Ângela Brandão, Maria Cecília Outeiro Gorla e Dra Ana Paula Lemos, pesquisadoras científicas da seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, que sempre estiveram prontas para me dar dicas, conselhos e discutir comigo minhas dúvidas, e que por todo apoio, foram muito importantes para a realização deste trabalho;

Dra Julia Maria Felipe Martins, Dra Maria das Graças Alckmin, Vera Simonsen, Dra Tânia Mara Ibelli Vaz, por permitirem que o trabalho fosse desenvolvido na seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo;

Aos membros da banca de qualificação, Dra Kinue Irino e Dra Elsa Mamizuka, pelas importantes sugestões que enriqueceram a escrita deste trabalho;

Ao Dr. Décio Diament, do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, pela valiosa colaboração nos métodos estatísticos aplicados no estudo;

Alexandre Ferraz Braz, pelas impressões das figuras;

Maria Conceição Martins e Suely Ueki, por toda ajuda e carinho e por terem sido minhas primeiras orientadoras em trabalhos científicos;

Ana Luiza Gomes Nicoliello, por emprestar seu material de estudo;

A todos os estagiários que passaram pelo setor de Leptospirose e de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho;

À Roberta Peres pela torcida e pelas palavras de conforto nas horas difíceis;

À Maria Cecília dos Santos Blanco Peres, por todo apoio familiar;

À família Gomes da Silva e à família Azevedo, em especial à Florence, à Roberta e à Frances, por todo apoio, carinho e dedicação, em todos os momentos;

Aos companheiros da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos momentos que desfrutamos juntos.

A todos vocês, o meu muito obrigada!

RESUMO

BLANCO, R. M. **Avaliação da glicolipoproteína como antígeno para sorodiagnóstico da leptospirose.** 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Este trabalho visa investigar a resposta sorológica para glicolipoproteína (GLP) de leptospirosas com a finalidade de padronizar o uso deste antígeno em testes sorológicos para o diagnóstico da leptospirose humana. Dentre as proteínas envolvidas na patogenicidade das leptospirosas, a GLP ainda não foi estudada quanto a imunogenicidade e quanto ao seu emprego como antígeno na detecção de anticorpos específicos. Assim, dot-ELISA para detecção de anticorpos IgG e IgM, com o emprego de GLP de leptospirosas patogênicas e não patogênicas, foi padronizado. Foram testadas amostras pareadas de soros de 90 pacientes com leptospirose confirmada sorologicamente por MAT, sendo as primeiras amostras colhidas na fase aguda da doença e as segundas amostras após 10 a 15 dias. Foram testadas também amostras únicas de 30 pacientes de diferentes patologias, que apresentaram resultados negativos no MAT, pertencentes ao grupo controle. A detecção de anticorpos IgG não mostrou resultados satisfatórios, tendo sido, o seu estudo, descontinuado. Os resultados do dot-ELISA IgM mostraram sensibilidade de 100% nas amostras colhidas após soroconversão no MAT e a precocidade de detecção foi demonstrada pela alta positividade nas amostras colhidas na fase aguda da doença (76,6% para dot-ELISA com antígeno de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e 90% com antígeno de *Leptospira biflexa* sorovar Patoc). A especificidade foi alta (96,6%), porém o dot-ELISA utilizando ambos os antígenos apresentou 3,3% de resultados falso-positivos. Este estudo demonstrou a importância da resposta imune humoral ao antígeno GLP de leptospirosas. A utilização da GLP, no teste dot-ELISA para detecção de anticorpos IgM permitiu realizar o diagnóstico sorológico de forma simples, rápida e com alta eficiência diagnóstica.

Palavras-chave: Leptospirose. GLP. Imunodiagnóstico. Dot-ELISA.

ABSTRACT

BLANCO, R. M. **Evaluation of glycolipoprotein antigen for serodiagnosis of leptospirosis.** 2007. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The aim of this work was the study of serologic response against leptospira glycolipoprotein (GLP) for the purpose of standardizing its use as an antigen on serological tests to diagnose human leptospirosis. Among the proteins involved in the pathogenicity, GLP is yet to be studied regarding its immunogenicity and its use as an antigen in the detection of specific antibodies. That led to our standardization of dot-ELISA for detecting IgG and IgM antibodies, using GLP extracted from either pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni or nonpathogenic *Leptospira biflexa* serovar Patoc. Paired serum samples were taken from 90 patients with serologically confirmed leptospirosis, by MAT, with the first samples collected on the disease's acute phase and the second samples after a period of 10 to 15 days. We also tested single samples taken from 30 patients with other diseases, MAT negative, belonging to the control group. Detection rates for IgG antibodies were unsatisfactory, so the study for that use was discontinued. The dot-ELISA IgM results yielded 100% sensitivity on the samples taken after MAT seroconversion. The early detection pattern was evidenced by the high positivity rate on the samples taken during the disease's acute phase (76,6% dot-ELISA using *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni antigen and 90% using *Leptospira biflexa* sorovar Patoc antigen). Specificity rates were high (96.6%), although a 3.3% rate of false-positive results was observed for dot-ELISA using both antigens. The present study revealed the importance of the humoral immune response against the GLP antigen. The use of GLP, on the dot-ELISA test for IgM antibodies afforded a simple, quick and effective diagnosis.

Key words: Leptospirosis. GLP. Immunodiagnosis, Dot-ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIP	Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil
BSA	Albumina de soro bovino
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
dL	Decilitro
dot-ELISA	Dot-enzyme-linked immunosorbent assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	Meio de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
FL	Fosfolipase
GLP	Glicolipoproteína
Ig	Imunoglobulina
IHA	Hemaglutinação indireta
KDO	Ácido 2-ceto-3-deoxioctônico
LPS	Lipopolissacáride
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MAT	Teste de aglutinação microscópica
μL	Microlitro
μg	Micrograma
mL	Mililitro
mg	Miligrama
μm	Micrometro
nm	Nanometro
Na,K-ATPase	Sódio-Potássio Adenosina-Trifosfatase
NBT	Nitroblue tetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PG	Peptideoglicano
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
rpm	Rotações por minuto
TNF α	Fator de necrose tumoral- α
Tris/HCl	Tampão Tris-ácido clorídrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	2
1.2 Agente etiológico.....	3
1.2.1 Classificação.....	3
1.2.2 Aspectos biológicos e morfológicos das leptospiras	4
1.2.3 Fatores de virulência das leptospiras	4
1.3 Epidemiologia.....	9
1.4 Manifestações clínicas	11
1.5 Diagnóstico Laboratorial	12
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Material.....	22
3.1.1 Amostras de soros.....	22
3.1.2 Cepas de Leptospira	23
3.2 Teste de aglutinação microscópica (MAT)	24
3.3 ELISA IgM.....	25
3.4 dot-ELISA IgM	25
3.4.1 Extração da GLP.....	25
3.4.2 Dosagem de proteínas.....	26
3.4.3 Procedimento do teste.....	26
3.4.4 Absorção de fator reumatóide	28
3.5 Métodos estatísticos.....	28
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Histórico

Segundo relatos de Alston e Broom (1958), a leptospirose foi descrita pela primeira vez por Landouzy, em 1883, porém foi Adolf Weil, em 1886, quem a descreveu minuciosamente, após um estudo de quatro casos. O termo síndrome de Weil foi designado por Goldschmidt em 1887.

Em 1916, Inada et al., detectaram, pela primeira vez, espiroquetas e anticorpos específicos no sangue de mineiros japoneses com infecção icterica. Eles denominaram essas espiroquetas de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*.

Gsell (1984), relata em sua descrição histórica da leptospirose que simultaneamente e independentemente do estudo de Inada, dois grupos de médicos estudaram soldados alemães afligidos pela “doença francesa” nas trincheiras do nordeste da França e também encontraram espiroquetas circulantes, as quais foram denominadas por Hübener e Reiter de *Spirochaeta nodosa* e por Uhlenhuth e Fromme de *Spirochaeta icterogenes*.

Entretanto, cerca de 10 anos antes destes estudos, Stimson (1907) já havia demonstrado, pela coloração da prata, a presença de grupos de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente que foi reportado como tendo falecido de febre amarela. Essas espiroquetas apresentavam extremidades semelhantes a um ponto de interrogação, e por isso Stimson as nomeou de *Spirochaetae interrogans* (STIMSON, 1907). Esta observação, porém, ficou negligenciada por vários anos.

Os achados de Inada et al. (1916), foram confirmados posteriormente por pesquisadores na Inglaterra, Bélgica e França (COSTA; TROISIÈRE, 1916; DAWSON et al., 1917; STOKES; RYLE, 1916).

Em 1918, Noguchi estudando a *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* de Inada, as cepas de casos de síndrome de Weil em Flanders, Inglaterra, e de ratos

selvagens nos EUA, concluiu que essas eram iguais na forma e que apresentavam respostas semelhantes nos testes imunológicos, criando um novo gênero, o qual ele designou como *Leptospira* e incluiu na ordem Spirochaetales. Em 1979, Hovind-Hougen propôs a criação da família Leptospiraceae.

1.2 Agente etiológico

1.2.1 Classificação

As leptospiros pertencem à ordem Spirochaetales e à família Leptospiraceae que compreende dois gêneros, *Leptospira* e *Leptonema*.

Através da classificação sorológica, o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies, *L. interrogans* e *L. biflexa*. As leptospiros patogênicas pertencem à espécie *Leptospira interrogans* e a espécie *Leptospira biflexa* reúne as leptospiros ambientais, de vida livre (BARANTON; OLD, 1995; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Tanto *L. interrogans* quanto *L. biflexa* são divididas em numerosos sorovares, e são classificadas de acordo com a análise de sua constituição antigênica, por meio de reações de absorção cruzada de aglutininas. Dois ou mais sorovares, antigenicamente relacionados, formam um sorogrupo (FAINE et al., 1999).

A espécie *L. interrogans* compreende 23 sorogrupos e mais de 200 sorovares enquanto que *L. biflexa* compreende 38 sorogrupos com mais de 60 sorovares. As variações dos carboidratos da cadeia lateral do LPS são responsáveis pela diversidade antigênica dos sorovares das leptospiros (FAINE et al., 1999).

Com o surgimento de novas técnicas de estudos taxonômicos, principalmente as de biologia molecular, essa classificação fenotípica vem sofrendo modificações (BRENDLE et al., 1974; HAAPALA et al., 1969; SHIMID et al., 1986, YASUDA et al.,

1987). Com base nos estudos de reassociação de DNA-DNA, o gênero *Leptospira* compreende 11 espécies, sendo as patogênicas *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirshneri*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii* e *L. inadai* e as saprófitas *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. biflexa* e *L. parva* (RAMADASS et al., 1992; YASUDA et al., 1987).

1.2.2 Aspectos biológicos e morfológicos das leptospiras

As leptospiras são organismos helicoidais, medindo de 10 a 20 µm de comprimento, aeróbias estritas, que apresentam uma ou as duas extremidades em forma de gancho e se movimentam através de flagelo contido no envelope externo. Podem ser de vida livre ou parasita de homens e animais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Por serem muito finas, são visualizadas por microscópio de campo escuro ou contraste de fase e não são facilmente coradas (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Utilizam sais de amônia como fonte de nitrogênio, ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e purinas (FAINE et al., 1999).

São bactérias fastidiosas, com tempo de geração de 6 a 16 horas, crescimento ótimo em pH 7,2 – 7,6 e temperatura de 28°C a 30°C (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O envelope externo é composto por proteínas, lipídeos e lipopolissacarídeos, concentrando grande parte dos seus fatores de virulência (FAINE et al., 1999).

1.2.3 Fatores de virulência das leptospiras

Os mecanismos de patogenicidade envolvidos na leptospirose ainda não estão claros. Muitos componentes bacterianos com capacidade de produzir efeitos tóxicos têm sido isolados de leptospiras patogênicas, tais como o lipopolissacáride

(LPS), a fosfolipase (FL), o peptidoglicano (PG), esfingomielinase, urease, hialuronidase e a glicolipoproteína (GLP) (FAINE et al., 1999).

A maioria das pesquisas com antígenos de leptospiros tem sido focada no LPS. Este, apesar de não conter KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctônico), é semelhante ao LPS das bactérias Gram negativas (VIHNNH et al., 1986). Seu efeito endotóxico é 12 vezes menor em camundongos quando comparado ao LPS de *E. coli*, porém pode causar hemorragia nesses animais, além de ativar macrófagos (FAINE et al., 1999).

Chapman et al. (1998) demonstraram que o LPS de *L. interrogans* sorovar Hardjo é o principal antígeno responsável pela resposta imune humoral em pacientes com leptospirose, aumentando anticorpos protetores e podendo ser utilizado em imunizações.

LPS e antígenos lipídicos foram preparados a partir de diferentes sorovares de *L. interrogans* e a reatividade sorológica destes antígenos foi analisada pelo teste de ELISA utilizando anti-soros homólogos e heterólogos. O estudo sugere que LPS e antígenos lipídicos de *L. interrogans* podem conter epítomos sorovar específico, assim como epítomos que apresentam reação cruzada entre os sorovares (CHO et al., 1992).

Anticorpos monoclonais anti-leptospiros têm sido utilizados para estudar seu efeito na opsonização contra *L. interrogans* (TAKASE; YANAGAWA, 1988). A investigação das propriedades imunoquímicas dos epítomos responsáveis pela ligação de anticorpos monoclonais ao LPS de leptospiros demonstrou que formas fosforiladas e amino de manose e galactose são componentes importantes dos epítomos que estão diretamente envolvidos na opsonização das leptospiros (VINH et al., 1994).

Além do LPS, as leptospirosas expressam diferentes componentes na sua membrana externa, tais como porinas (OmpL1), e várias lipoproteínas, como LipL36 e LipL41. A caracterização da expressão e distribuição destes componentes durante a infecção experimental em hamsters, demonstrou que LPS e LipL41 são encontrados no interstício renal e dentro de fagócitos enquanto que OmpL1 foi encontrada exclusivamente dentro do lúmen tubular renal. A LipL36 não foi detectada nos rins dos hamsters infectados, sugerindo que esta lipoproteína não é expressa *in vivo*. Estes achados demonstram que a migração dos antígenos da membrana externa é seletiva e contribui para a resposta inflamatória e para a lesão renal na leptospirose (BARNETT et al., 1999).

Guerreiro et al. (2001) realizaram análises qualitativas e quantitativas dos antígenos protéicos reconhecidos pelos anticorpos induzidos durante a leptospirose humana. Sete proteínas foram estudadas e identificadas como antígenos alvos da resposta imune durante a infecção. O estudo demonstrou que a lipoproteína LipL32 é o antígeno protéico imunodominante, reconhecido pela resposta humoral durante a infecção. Estes achados sugerem que as proteínas de leptospirosas reconhecidas durante a infecção natural podem ser utilizadas no sorodiagnóstico da leptospirose e como imunoprotetoras no desenvolvimento de vacinas para a prevenção da doença.

O peptidoglicano de leptospirosas patogênicas, ativa diretamente as células do endotélio vascular aumentando sua adesão por neutrófilos (DOBRINA et al., 1995). Além disso, Cinco et al. (1996) demonstraram que peptidoglicano de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi capaz de induzir a liberação de TNF α (fator de necrose tumoral- α) a partir de células mononucleares de sangue periférico.

As fosfolipases de leptospirosas atuam nos eritrócitos e em outras membranas celulares contendo substratos fosfolipídicos, causando lise celular (FAINE et al.,

1999). As cepas virulentas de leptospiros apresentam fosfolipase A com maior atividade do que as cepas não virulentas (VOLINA et al., 1986). Foi sugerido que a fosfolipase A apresenta efeito hemolítico em cultura e tem participação na invasão das leptospiros nos tecidos durante a infecção (YANAGIHARA et al., 1984).

Estudos demonstraram que, além da fosfolipase A, a hialuronidase também tem participação na penetração e na invasão das leptospiros nos tecidos, durante a infecção (ITO e YANAGAWA, 1987; YANAGIHARA et al., 1984).

As leptospiros patogênicas têm preferência por se localizarem nos rins, entre outros órgãos, e foi sugerido que esse fato se dá por que essas bactérias utilizam uréia como fonte de nitrogênio por meio da enzima urease e que essa atividade enzimática está relacionada aos danos causados aos rins durante a leptospirose (KADIS e PUGH, 1974).

Foi identificada uma proteína de 36 kDa que liga-se à fibronectina e que é expressa exclusivamente por cepas de *L. interrogans* virulentas. Supõe-se que esta proteína seja um importante fator de virulência das leptospiros já que está associada à adesão dessas bactérias ao organismo do hospedeiro, sendo essencial para que se instale a infecção (MERIEN et al., 2000).

A GLP constitui de 3 a 5% do peso seco da célula bacteriana e é composta de aproximadamente 20% de proteína, 39% de carboidratos e 33% de lípidos (VINH et al., 1986).

Magaldi et al. (1999) estudando o efeito da GLP extraída de *Leptospira interrogans* diretamente sobre o ducto coletor medular interno de cobaias, demonstraram que a GLP exerce um efeito inibidor sobre o hormônio anti-diurético.

Pereira et al. (1997), utilizando a GLP extraída de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola verificaram em eletroforese com dodecilsulfato de sódio e gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE) que há produção de bandas com peso molecular variando de 14 a 66 kDa com reconhecimento através de anticorpos monoclonais anti-GLP de uma banda de 24 kDa.

A GLP inibe a enzima sódio-potássio adenosina-trifosfatase (Na,K-ATPase), presente na membrana celular (YOUNES-IBRAHIM et al., 1995), através da sua porção lipídica, mais especificamente através dos ácidos graxos insaturados não esterificados, como o ácido oléico e o ácido palmítico. Esta inibição produz lesão nas células do epitélio tubular renal, causando disfunção (BURTH et al., 1997).

Macedo et al. (1989) detectaram GLP em fígado e rim de cobaias a partir do quinto dia de infecção, sob a forma de grânulos no citoplasma de macrófagos, livres no interstício ou acoplados à membrana de células endoteliais e parenquimatosas, sugerindo que a GLP trata-se de produto de lise de leptospiros fagocitadas por macrófagos e está associada ao agravamento das lesões nas etapas mais avançadas da leptospirose.

Diament et al. (2002) estudaram o efeito da GLP na indução da ativação celular através da mensuração da secreção de TNF- α e interleucina-10 em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e o efeito na indução da expressão de antígenos de ativação celular CD 69 em linfócitos T e monócitos e de HLA-DR em monócitos. O estudo demonstrou que a GLP de leptospiros patogênicas foi capaz de ativar CMSP e que esta ação se dá por outra via que não o receptor CD14 de monócitos.

Dorigatti et al. (2005) demonstraram que a GLP induz interleucina-6 (IL-6) em células mononucleares do sangue periférico, e ativa os monócitos em nível celular, em sangue total.

A GLP exerce seu efeito tóxico intercalando sua porção lipídica com ácidos graxos e fosfolípidos de membrana, levando ao extravasamento do conteúdo celular (VINH et al., 1986), sendo muito importante na patogenicidade da leptospirose.

1.3 Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, onde o homem é apenas hospedeiro transitório e casual, sendo de notificação compulsória no Estado de São Paulo desde 1983 (ROMERO; BERNARDO; YASUDA, 2003).

É uma doença sazonal ocorrendo predominantemente nos períodos de chuva, sendo a incidência significativamente mais alta em países de clima quente do que em países de clima temperado devido à longa sobrevivência das leptospirosas no meio ambiente em temperaturas quentes e condições úmidas (LEVETT, 2001; ROMERO; BERNARDO; YASUDA, 2003).

Acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, pertencentes a faixa etária mais produtiva da população. Além disso, está relacionada com o nível socioeconômico, havendo predominância de pacientes com ocupações de nível econômico muito baixo (ANDRADE; BRANDÃO, 1987; ROMERO; BERNARDO; YASUDA, 2003; SILVA et al., 1974).

Em muitos países, a leptospirose é considerada ocupacional, ocorrendo principalmente em trabalhadores do serviço de água, esgotos e minas, agricultores que trabalham em campos alagados ou irrigados, como culturas de arroz e em pessoas que estão diretamente em contato com animais ou tecidos infectados, como veterinários, tratadores de animais, açougueiros e profissionais de laboratório. Existe também um risco associado com a exposição recreativa em esportes aquáticos, incluindo natação, canoagem e pescaria (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O papel do rato como fonte de infecção humana foi descoberto em 1917 por Ido et al., que descreveram o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) como o reservatório de leptospiros. Os ratos e outros roedores são portadores sãos e desempenham um importante papel na disseminação da doença, pois apresentam leptospiúria prolongada (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Os animais domésticos como bovinos, eqüinos, caninos, suínos, ovinos e caprinos também são reservatórios de leptospiros, contribuindo para a disseminação da doença. As aves, os ofídios, morcegos e artrópodes hematófagos eventualmente contribuem para a transmissão da leptospirose, embora sua importância epidemiológica não tenha sido bem estabelecida (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Com a melhora dos serviços de saneamento básico e com os programas de desratização, esperava-se uma redução das taxas de incidência da leptospirose, porém essas taxas permaneceram estáveis nos últimos vinte anos, no Estado de São Paulo, variando entre 1,03 e 2,87 por 100 000 habitantes (<http://www.cve.saude.sp.gov.br>).

A leptospirose é transmitida de animal infectado para outros animais incluindo o homem, não sendo muito freqüente a transmissão de homem para homem (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O homem pode adquirir a doença de forma direta através do contato com a urina, sangue, órgãos e tecidos de animais infectados ou indiretamente através do contato com solo úmido, água ou vegetação contaminada com urina de animais infectados. Raramente a infecção é transmitida pela mordida de animais (ALSTON; BROOM, 1958; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

As leptospirosas penetram através da pele escoriada ou íntegra quando imersa por período prolongado na água, e também através das mucosas íntegras. A inalação da água ou de aerossóis também pode resultar em infecção através da membrana mucosa do trato pulmonar (LEVETT, 2001).

1.4 Manifestações clínicas

A leptospirose, em humanos, pode manifestar-se de várias formas, desde quadros assintomáticos, passando por formas anictéricas de gravidade moderada, até formas severas e potencialmente fatais, conhecidas como Síndrome de Weil, apresentando icterícia, fenômenos hemorrágicos e múltiplas disfunções de órgãos (LEVETT, 2001).

Independente do sorovar causal, a leptospirose humana, em geral, apresenta uma evolução bifásica. A fase inicial, denominada leptospirêmica ou septicêmica, na qual as leptospirosas podem ser encontradas na circulação sanguínea e/ou líquido, é caracterizada pela manifestação dos sintomas da doença como febre, mialgia, calafrio e cefaléia. A doença pode progredir para a segunda fase, que é a fase de localização ou imune, apresentando quadro clínico decorrente do comprometimento de vários órgãos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A síndrome pulmonar hemorrágica grave tem sido enfocada em diversos trabalhos, sendo considerada freqüentemente fatal. É uma forma de leptospirose emergente aparecendo cada vez mais nos relatos epidemiológicos (NALLY, 2004; SEIJO, 2002; VIJAYACHARI, 2003).

A forma grave da doença ocorre em apenas 5 a 10% dos indivíduos infectados. Nos demais casos, a leptospirose tem apresentação clínica inespecífica, freqüentemente confundida com outras doenças infecciosas, comuns em climas tropicais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Para o tratamento da leptospirose humana a droga de escolha é a penicilina. Nos casos em que esta seja contra indicada, a alternativa pode ser a tetraciclina, a ampicilina ou a doxaciiclina. A antibioticoterapia é benéfica, desde que sua administração seja iniciada até o quarto dia contado a partir do surgimento da doença. As medidas terapêuticas de suporte, como hidratação e monitoração cardíaca, também representam importante papel no tratamento da leptospirose humana (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

1.5 Diagnóstico Laboratorial

Os antecedentes epidemiológicos e os achados clínicos nem sempre são critérios suficientes para fins diagnósticos da leptospirose humana, já que esta pode ser confundida com outras doenças como dengue, gripe, febre amarela, hantavirose, entre outras. Assim, os exames laboratoriais tornam-se extremamente importantes para o diagnóstico da doença (FAINE et al., 1999).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser feito através do isolamento do agente, da visualização direta do agente, de métodos sorológicos e mais recentemente através de técnicas de biologia molecular (FAINE et al., 1999).

O diagnóstico microbiológico consiste em isolar leptospiras diretamente do sangue e/ou do LCR, porém, devido ao crescimento lento das leptospiras, uma cultura pode levar até dois meses para se ter um resultado definitivo. Além disso, a cultura apresenta baixa taxa de isolamento em decorrência da coleta, que deve ser feita no período correspondente ao leptospirêmico e da presença de contaminantes que acabam inibindo o crescimento das leptospiras (FAINE et al., 1999; SAKATA et al., 1992).

A visualização direta das leptospiras por microscopia de campo escuro ou contraste de fase não é um método recomendado devido ao grande número de artefatos que podem ser confundidos com bactérias, resultando em diagnóstico falso-positivo (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O suporte laboratorial empregando testes sorológicos sensíveis e específicos tem contribuído muito para o diagnóstico clínico e soropidemiológico da leptospirose.

Os anticorpos circulantes começam a ser detectados 3 a 5 dias após o início dos sintomas, atingindo níveis máximos na segunda semana da doença (FAINE et al., 1999). As aglutininas anti-leptospiras podem persistir no soro de pacientes infectados por muito tempo, tendo Romero, Caly e Yasuda (1998) encontrado pacientes com leptospirose que mantiveram títulos de 800, treze meses após terem sido infectados.

O teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), baseado na resposta imunológica do paciente, é o teste de aglutinação microscópica (MAT). É um teste sorogrupo específico proposto inicialmente por Martin e Petit em 1918, e modificado por Schuffner e Mochtar em 1927.

Este teste requer no mínimo, duas amostras de soro com intervalos de 10 a 15 dias para a correta interpretação dos resultados.

Considera-se caso confirmado pelo MAT, aquele que apresenta soroconversão, ou uma variação sorológica no título de anticorpos de quatro ou mais vezes. Os casos que apresentam títulos de anticorpos em duas ou mais amostras de soros, mas não têm esta variação sorológica, permanecem como casos presuntivos. O provável sorogrupo infectante é o que apresenta o maior título no teste. Se mais

de um sorogrupo apresentar o maior título, o provável sorogrupo infectante é considerado como inconclusivo (FAINE et al., 1999).

A necessidade de se utilizar um grande número de leptospirosas vivas, potencialmente patogênicas, tem sido apontada como a principal limitação para o emprego do teste, além de necessitar de um técnico especializado e treinado para proceder à leitura em microscopia de campo escuro.

Vários testes sorológicos foram desenvolvidos como alternativa ao MAT, tais como a reação de hemaglutinação indireta, a contraímunoeletroforese, teste de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), *Lepto dipstick* e dot-ELISA (*Dot-enzyme-linked immunosorbent assay*).

O teste de hemaglutinação indireta é de fácil execução e tem sido considerado sensível e específico para o diagnóstico sorológico da leptospirose por alguns autores (LEVETT; WHITTINGTON, 1998; SULZER et al., 1975). Entretanto, nem todos os trabalhos têm mostrado sucesso com essa metodologia, motivo pelo qual a utilização de outros testes mais sensíveis tem sido sugerida para a triagem sorológica da leptospirose (EFFLER et al. 2000).

A contraímunoeletroforese, utilizando-se como antígenos diferentes sorovares de leptospirosas, é um teste sensível, específico e de fácil execução, além de apresentar estabilidade de antígenos, de até um ano em temperatura ambiente. O resultado obtido é imediato ou em 24 horas (MYERS, 1987; YASUDA et al., 1991).

O teste de ELISA-IgM tem se mostrado um teste sensível, reprodutível e de fácil realização, além de detectar anticorpos mais precocemente do que o MAT (AHMAD et al., 2005, FAINE et al., 1999, SILVA et al., 1990).

Diferentes antígenos têm sido utilizados na realização do ELISA para o diagnóstico da leptospirose. Em muitos estudos, extratos brutos de diferentes

sorovares têm sido empregados, incluindo-se as cepas não patogênicas (CUMBERLAND et al., 1999; MILNER et al., 1985; LEVETT; BRANCH, 2002; TERPSTRA et al., 1985; WINSLOW et al., 1997). A utilização de cepas não patogênicas, como *L. biflexa* sorovar Patoc, nos testes de ELISA visa diminuir os riscos de contaminação acidental para o operador (AHMAD et al., 2005).

LPS de *L. biflexa* sorovar Patoc foi utilizado como antígeno no teste de ELISA para o diagnóstico de pacientes com uveíte causada por leptospiros. O teste para detectar anticorpos IgM apresentou boa especificidade (90%), porém a sensibilidade foi de 48%. Os autores do trabalho atribuem à baixa sensibilidade o fato de o LPS ser sorovar específico e sugerem que a utilização de LPS de diferentes sorovares aumentaria a sensibilidade do teste (PRIYA et al., 2003).

Adler et al. (1980) utilizaram sonicados de cepas patogênicas pertencentes aos sorovares Pomona, Hardjo e Copenhageni, na sensibilização das placas para o teste de ELISA frente a conjugados anti-IgM e anti-IgG humanos, e comparam os resultados com o teste de referência MAT. O teste de ELISA mostrou-se mais sensível, tendo detectado anticorpos IgM mais precocemente que o MAT além de detectar menores quantidades de anticorpos após titulações comparativas entre as duas técnicas. O teste de ELISA também mostrou boa especificidade, tendo os autores sugerido a utilização da técnica, principalmente com anti-IgM para o diagnóstico da leptospirose.

Ribeiro et al. (1994, 1996) utilizaram sonicado de sorovar Copenhageni, tratado com proteinase K, como antígeno para o teste de ELISA IgM e demonstraram que o teste foi sensível (89,8%), específico (97,4%) e reprodutível, tendo como vantagem a estabilidade do antígeno que é de 18 meses em temperatura ambiente.

Silva et al. (1990) utilizaram 10 diferentes sorovares, prevalentes na cidade de São Paulo, na preparação de antígenos para a realização do teste de ELISA IgM. Os cinco sorovares que apresentaram melhores resultados individualmente no teste de ELISA IgM também foram estudados em mistura antigênica. O teste utilizando os antígenos não tratados, isoladamente e em mistura antigênica, apresentou melhores resultados do que utilizando antígenos tratados com Triton X 100 (4%), demonstrando ser sensível, tendo a sensibilidade variado de 70,7% a 100% entre as primeiras e as segundas amostras, e podendo ser útil como teste de triagem para o diagnóstico precoce da leptospirose.

Proteínas recombinantes, principalmente a LipL32, também têm sido utilizadas como antígeno na realização do ELISA não só para detecção de anticorpos IgM, mas também de anticorpos IgG. Estes antígenos mostraram-se eficientes, com boa sensibilidade, que variou de 56% a 94%, e especificidade, que variou de 90% a 97%, entre as primeiras e as segundas amostras, no diagnóstico da leptospirose (FLANNERY et al., 2001; TAHILIANI et al., 2005).

Silva et al. (1995), além de anticorpos IgM, também estudaram o comportamento dos anticorpos IgG e IgA pelo teste de ELISA, confirmando que o IgM é detectado precocemente, nos primeiros dias da doença, persistindo até a fase de convalescença, sendo uma importante ferramenta no diagnóstico precoce. Os anticorpos IgA apresentaram resposta semelhante aos anticorpos IgM, podendo ser detectados no quinto dia da doença e persistindo até a fase de convalescença. Porém, os anticorpos IgG não demonstraram bons resultados, nem mesmo na fase de convalescença, porque não foram detectados em todos os pacientes e quando presentes, apareceram irregularmente.

Testes de dot-ELISA IgM têm sido desenvolvidos utilizando antígenos de leptospiros para sensibilizar membranas de nitrocelulose. Tem como vantagem a utilização de pequenas quantidades de reagentes (AHMAD et al., 2005). O teste foi introduzido por Papas et al., em 1985, e nesse estudo foram utilizados antígenos de cepa saprófita e patogênica e conjugados anti-IgG e anti-IgM humanos. O teste com conjugado anti-IgM, mostrou-se sensível (91,2%) e específico (81,3%), além de não ter a necessidade de leitura espectrofotométrica, mostrando ser um teste rápido e simples.

Silva et al., em 1997, padronizaram o teste de dot-ELISA para detecção de anticorpos específicos das classes IgM, IgG e IgA, utilizando como antígenos sonicados de sorovares de *L. interrogans*. Este estudo demonstrou que o dot-ELISA para detecção de anticorpos IgM apresentou maior sensibilidade (98%) e especificidade (100%) do que o estudo de Pappas et al. (1985), podendo ser utilizado na triagem do diagnóstico da leptospirose humana, apresentando vantagens em termos de rendimento, tempo, facilidade na execução e baixo custo.

Bajani et al. (2003), avaliaram quatro testes comerciais, o teste ELISA IgM (PanBio), a hemaglutinação indireta (IHA) (MRL Diagnostics), o teste IgM *dipstick* (Royal Tropical Institute) e o dot-ELISA IgM *dipstick* (Integrated Diagnostics Inc.) para o diagnóstico da leptospirose. Os valores da sensibilidade e especificidade foram respectivamente 93.2% e 89.6% para o IgM *dipstick*, 92.5% e 98.8% para o dot-ELISA *dipstick*, 86.5% e 97% para o ELISA IgM e 79.0% e 95.8% para o IHA. Devido à fácil execução e aos resultados apresentados, os autores indicaram os testes de ELISA IgM e dot-ELISA *dipstick* IgM como testes de escolha para o diagnóstico da leptospirose.

O *Lepto dipstick* para pesquisa de anticorpos IgM foi utilizado para o diagnóstico da leptospirose, demonstrando que este método apresenta alta sensibilidade e especificidade, tendo como vantagem maior simplicidade na realização do ensaio e quase nenhuma necessidade de equipamentos especializados (GUSSENHOVEN et al., 1997; LEVETT et al., 2001; SMITS et al., 1999).

Muitos trabalhos têm demonstrado a importância dos anticorpos IgM no diagnóstico da leptospirose, pela alta sensibilidade dos testes e pelo longo tempo de persistência dessa classe de imunoglobulina no soro dos pacientes, resultando em uma maior possibilidade de detecção.

A imunidade anti-GLP desenvolvida em pacientes com leptospirose ainda não foi estudada. Assim, a padronização de um teste que detecte anticorpos contra essa toxina é inédita e pode trazer novos subsídios para o diagnóstico precoce da doença. Acredita-se que o tratamento com antibióticos possa beneficiar melhor o paciente quando indicado no período inicial da doença, sendo, portanto essencial um diagnóstico laboratorial precoce.

O desenvolvimento de um teste sorológico simples, porém de alta eficiência é de grande interesse para a saúde pública, pois poderá tornar o diagnóstico sorológico da leptospirose acessível a todos os laboratórios, mesmo aos de poucos recursos ou de pequeno porte.

2 OBJETIVOS

2. Objetivos

Os trabalhos realizados com GLP de *Leptospira* até agora foram focados nos efeitos que ela causa no organismo durante a infecção. Como esta toxina provavelmente participa da fisiopatogenia da leptospirose induzindo resposta inflamatória, torna-se de grande importância estudar se há reconhecimento da GLP, pelos anticorpos de pacientes com leptospirose e quais seriam as fases da doença em que há esse reconhecimento, bem como a possível utilização no diagnóstico. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram:

- Verificar se a GLP está envolvida na resposta imune humoral em infecções por *Leptospira*, por meio da detecção de anticorpos IgM anti GLP nos soros de pacientes, nas diferentes fases da doença (fase aguda e de convalescença);
- Padronização do emprego do antígeno GLP no teste de dot-ELISA IgM e IgG para o imunodiagnóstico da leptospirose;
- Avaliação do desempenho diagnóstico do dot-ELISA empregando a GLP como antígeno, tendo-se o teste de MAT como referência;
- Comparar os resultados do dot-ELISA IgM utilizando a GLP extraída de cepa patogênica e saprófita de *Leptospira* (na detecção de anticorpos IgM anti GLP)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Amostras de soros

Foram analisados soros de 90 pacientes com suspeita clínica de leptospirose, recebidos no Setor de Leptospirose do Instituto Adolfo Lutz, entre os anos de 2003 e 2005. Estes soros estavam armazenados a -20°C.

Duas amostras de sangue destes pacientes foram coletadas com intervalos de 10 a 15 dias entre elas. Ambas foram submetidas previamente ao teste de MAT. De acordo com os resultados apresentados no MAT os soros foram divididos em três Grupos:

Grupo 1: soros de 30 pacientes casos confirmados de leptospirose por terem apresentado soroconversão, ou seja, a primeira amostra não reagente e a segunda amostra reagente, apresentando títulos ≥ 200 . O provável sorogrupo infectante foi *Icterohaemorrhagiae*.

Grupo 2: soros de 30 pacientes casos confirmados de leptospirose por apresentarem as duas amostras reagentes, porém, com elevação significativa de títulos na segunda amostra, de quatro vezes ou mais. O provável sorogrupo infectante foi *Icterohaemorrhagiae*.

Grupo 3: A) soros de 15 pacientes casos confirmados de leptospirose, por apresentarem soroconversão, ou seja, a primeira amostra não reagente e a segunda amostra reagente com títulos ≥ 200 ; B) 15 pacientes casos confirmados de leptospirose por apresentarem as duas amostras reagentes, sendo a segunda com

títulos ≥ 200 e elevação significativa de títulos de quatro vezes ou mais. Os prováveis sorogrupos infectantes eram outros que não o *Icterohaemorrhagiae* (*Cynopteri*, *Djasiman*, *Sejroe*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Batavie*, *Hebdomadis*, *Canicola*, *Shermani*, Inconclusivos: *Grippotyphosa* e *Batavie*; *Hebdomadis* e *Celledoni*; *Canicola* e *Ballum*).

Grupo controle: Soros de 30 pacientes, com amostra única de soro, confirmados laboratorialmente para outras etiologias que não a leptospirose e que estavam mantidos a -20°C no Setor de Leptospirose do Instituto Adolfo Lutz. Destes soros, 10 foram confirmados para hepatite A, 9 para dengue, 9 para toxoplasmose, 1 para febre maculosa e 1 para hepatite C. Todos foram submetidos ao teste de MAT.

3.1.2 Cepas de *Leptospira*

As leptospiros empregadas neste estudo foram as utilizadas na rotina diagnóstica do setor de leptospirose, seção de Bacteriologia, do Instituto Adolfo Lutz.

Para o teste de dot-ELISA, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, pertencente ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (GLP Copenhageni) e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc I, pertencente ao sorogrupo Semarang (GLP Patoc) foram cultivadas em meio de Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris (EMJH – Difco) suplementado com 10% de enriquecimento para EMJH (Difco) durante 7 dias a 30°C .

Como antígenos para o teste de MAT foram utilizados os seguintes sorovares: *Australis*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Butembo*, *Canicola*, *Castellonis*, *Celledoni*, *Copenhageni*, *Cynopteri*, *Djasiman*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Panama*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Shermani*, *Tarassovi* e *Wolffi*. Estes sorovares são representantes dos principais sorogrupos prevalentes

no Estado de São Paulo. Além disso, foram utilizados os sorovares Andaman e Patoc, representantes de dois diferentes sorogrupos de *Leptospira biflexa*.

As leptospiras foram cultivadas em meio de Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris (EMJH - Difco) suplementado com 10% de enriquecimento para EMJH (Difco) durante 7 dias a 30°C e foram utilizados na densidade equivalente ao tubo 1 de Mc Farland diluído v/v em salina tamponada de Sörensen.

3.2 Teste de aglutinação microscópica (MAT)

O MAT, técnica de referência recomendada pela Organização Mundial de Saúde, foi realizado segundo Faine et al. (1999), utilizando como antígenos culturas vivas de leptospiras.

Os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina com tampão do tipo Sörensen. Alíquotas de 50µL de cada soro diluído foram colocadas frente aos 22 sorovares utilizados como antígeno em placas para microaglutinação contendo 96 poços de fundo chato. As amostras foram colocadas em 22 cavidades da placa, uma para cada sorovar. Acrescentou-se a seguir 50µL de cada um dos antígenos para cada amostra de soro, obtendo-se uma diluição final de 1:100. As placas foram incubadas a 30°C durante 2 horas. A seguir foi realizada a leitura utilizando microscópio munido de dispositivo para campo escuro (Zeiss).

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

Os soros considerados positivos nesta etapa de triagem foram submetidos à titulação com os respectivos antígenos reagentes, em diluição seriada de razão dois.

Como ponto final da reação, foi considerada a diluição da amostra capaz de aglutinar 50% das leptospiras. Considerou-se reagente os soros que apresentaram título igual ou maior que 200.

3.3 ELISA IgM

Os resultados do teste de ELISA IgM realizado nas primeiras amostras de soros dos Grupos 1, 2 e 3, foram obtidos no banco de dados do setor de Leptospirose do Instituto Adolfo Lutz, para fins de comparação com o dot-ELISA. O *kit* empregado foi o fabricado pela FIOCRUZ – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e fornecido pela CGLAB (Coordenação Geral de Laboratórios - Ministério da Saúde) para os laboratórios de Saúde Pública, e consiste em um *kit* contendo todos os reagentes necessários para sua realização e microplacas sensibilizadas com antígenos de *Leptospira* sp.

3.4 dot-ELISA IgM

3.4.1 Extração da GLP

A extração da GLP foi realizada de acordo com o método descrito por Vinh et al. (1986) e pode ser assim resumida:

As culturas de leptospiras foram inativadas a 56°C por 3 horas e centrifugadas a 12.000 x g (4.500 rpm) por 50 minutos. O sedimento foi ressuspensão em Tris/HCl 0,01M pH 7,4 (Sigma) adicionado de 50µg/mL de lisozima (Pharmacia Biotech, Brasil) e incubado por 18 horas a 34°C. Após centrifugação a 20.000 x g (12.000 rpm) por 30 minutos, o sedimento obtido foi desprezado e o sobrenadante foi tratado com 50µg/mL de Ribonuclease I de pâncreas bovino (Sigma) e 50µg/mL de Deoxiribonuclease I de pâncreas bovino (Sigma) em solução de Tris/HCl por 3

horas a 37°C. O sobrenadante foi então dialisado em Tris/HCl 0,01M pH 7,4 por 24 horas a 4°C em sacos de diálise 33x21 mm (Inlab, Brasil) e tratado com ácido acético 1M a 4°C até o dialisato atingir um pH 3,7. Depois de ser centrifugado a 37.000 x g (13.500 rpm) por 1 hora o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com ácido acético 0,1M duas vezes. O sedimento precipitado foi diluído em 100 µL de água ultra pura (Milli Q- Brasil) constituindo, assim, a GLP para uso em dot-ELISA, que foi armazenada a 4°C até momento do uso.

3.4.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína contida no sedimento foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando o *Bio-Rad Protein Assay Kit II* (Boehringer, Alemanha). O sedimento contendo a GLP extraída de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e *Leptospira biflexa* sorovar Patoc foi diluída a 1:10. O padrão BSA (albumina de soro bovino) foi diluído nas concentrações de 0,9, 0,6, 0,4, 0,3, 0,2 mg/dL para montagem da curva padrão, utilizando as respectivas absorbâncias. Após adição de 5 mL do corante (Coomassie brilhante Blue G-250) em cada tubo, as amostras e os padrões foram incubados a temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por 5 minutos. As absorbâncias foram então medidas utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína das amostras foi determinada utilizando a curva padrão de BSA.

3.4.3 Procedimento do teste

O teste de dot-ELISA foi padronizado a partir de modificações na técnica descrita por Fenoll et al. (1997). Para este ensaio, foram realizadas titulações em bloco com soros previamente sabidos como positivos e como negativos, pelo ELISA IgM e pelo MAT, e com conjugado anti-IgG e anti-IgM humano (Sigma). Os soros

foram diluídos para ambos os conjugados a 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 e 1:1.000, o conjugado anti-IgG foi diluído a 1:200, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000 e o conjugado anti-IgM foi diluído a 1:500, 1:1.000, 1:1.500, 1:2.000, 1:3.000 e 1:4.000 e 1:8.000.

Para determinar a concentração ideal de proteína na sensibilização das membranas foram feitas titulações em bloco com soros e com o antígeno GLP. Os soros foram diluídos a 1:600 e 1:1.000 e a GLP foi utilizada pura (200µg/mL) e nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.

O bloqueio das membranas de nitrocelulose foi realizado com leite desnatado a 5% em PBS, testando-se dois períodos, 30 min e 45 min.

Para a realização do teste, membranas de nitrocelulose (Bio Rad-poro de 0,2 µm) foram sensibilizadas com a GLP extraída previamente, contendo 200µg/mL de proteína e diluídas a 1:8. Para bloqueio utilizou-se leite desnatado (Molico) na concentração de 5%, diluído em PBS. As membranas foram incubadas com o leite a temperatura ambiente por 45 minutos em agitador. Os soros dos pacientes foram diluídos a 1:1.000 na solução de bloqueio. As membranas foram incubadas em temperatura ambiente por 18 horas, em agitador. Após o período de incubação as membranas foram lavadas quatro vezes com 1 mL de PBS, 4 minutos cada vez.

As membranas foram então incubadas com anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanos conjugados com fosfatase alcalina, em uma diluição de 1:3.000 e 1:10.000 respectivamente, por 3h, a temperatura ambiente, em agitador. Após este procedimento, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente e reveladas submergindo-as em 10 mL de solução tampão 3, contendo 66µL de nitroblue tetrazólio (NBT) 5% e 33µL de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP)

5% . Para parar a reação, a membrana foi submersa em água destilada por 5 minutos.

Adotou-se como critério para positivo quando se podia visualizar objetivamente a presença de uma mancha de coloração rósea bem definida e para o negativo a ausência de cor.

Os reagentes utilizados na padronização deste teste estão descritos no **Anexo A1**.

3.4.4 Absorção de fator reumatóide

A absorção do fator reumatóide foi realizada utilizando-se o reagente *RF absorbens*[®] (Dade Behring). Os soros de pacientes com resultado de sorologia positivo no dot-ELISA IgM foram diluídos em leite desnatado (Molico) a 1:20, e então foram misturados v/v com *RF absorbens* e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento o teste de dot-ELISA IgM foi realizado como descrito anteriormente, no item 3.4.3.

3.5 Métodos estatísticos

Para a determinação da eficiência do teste de dot-ELISA IgM tendo-se como referência os resultados obtidos pelo teste de MAT, foram calculados os valores relativos de sensibilidade (Sr), especificidade (Er), valores preditivos positivo (Vp+) e negativo (Vp-) e eficiência (Ef) (ARMITAGE; BERRY, 1994; FERREIRA; ÁVILA, 2001; SACKETT et al., 1991).

Para medir o grau de concordância do teste foi utilizado o índice Kappa, que leva em consideração as proporções das concordâncias esperadas e das

observadas (ARMITAGE; BERRY, 1994; FERREIRA; ÁVILA, 2001; SACKETT et al., 1991).

As tabelas e as fórmulas para determinação de S_r , E_r , V_{p+} , V_{p-} e E_f e o quadro de interpretação dos valores de Kappa estão descritas no **Anexo A2**.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

O resultado da titulação em bloco mostrou que a melhor concentração de proteína para sensibilização das membranas foi de 25 ug/mL (GLP diluída a 1:8 e empregada em volume de 1uL/teste). Assim, teoricamente, a quantidade obtida de GLP é suficiente para aproximadamente 1.600 testes de dot-ELISA.

A GLP de sorovar Patoc forneceu também um rendimento semelhante ao do sorovar Copenhageni. Pequenas diferenças na concentração protéica foram corrigidas quando da diluição inicial.

Os antígenos, armazenados a 4°C, foram empregados para a produção de testes de dot-ELISA por um período de até 9 meses, sem perda de reatividade.

Os resultados das titulações em bloco mostraram que os soros devem ser diluídos a 1:1.000 e os conjugados anti-IgM a 1:3.000 e anti-IgG a 1:10.000.

O dot-ELISA IgM e IgG foram realizados com soros de pacientes comprovadamente infectados com leptospirose e com soros negativos nos testes de ELISA IgM e MAT, para verificação do envolvimento da GLP na resposta imune humoral.

Os resultados obtidos com o dot-ELISA IgG mostraram baixa reatividade em soros positivos verdadeiros e apresentaram altas taxas de reações inespecíficas. Portanto, o teste utilizando conjugado anti-IgG foi descontinuado. Por esse motivo, todos os testes de dot-ELISA realizados nesse trabalho refere-se à detecção de anticorpos IgM.

Os resultados do dot-ELISA utilizando conjugado anti-IgM mostraram que a GLP está envolvida na resposta imune humoral da leptospirose por terem sido detectados anticorpos IgM específicos anti GLP em todos os soros de pacientes

comprovadamente infectados e ausência em praticamente todos os soros de pacientes não infectados por *Leptospira* sp.

As leituras foram bastante objetivas, discriminando nitidamente as reações positivas das negativas. (**Figura 1**).

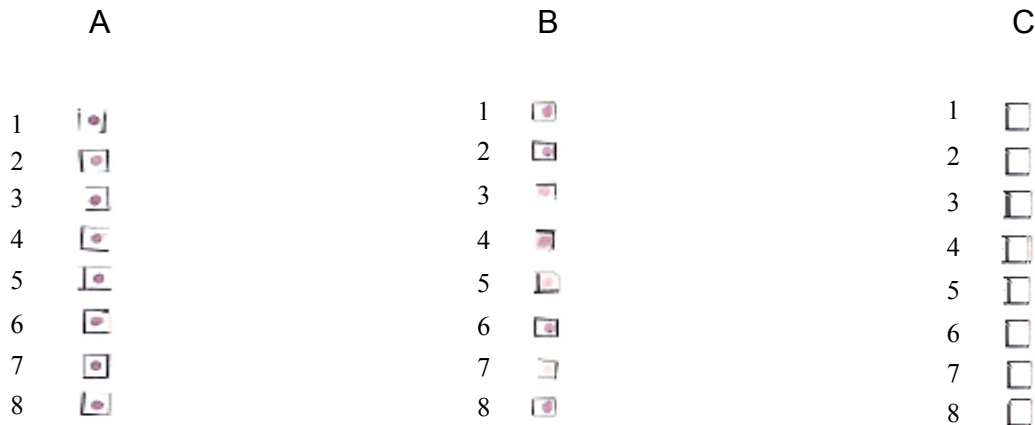


Figura 1 – dot-ELISA IgM anti-GLP Copenhageni. A – amostras pareadas de pacientes com leptospirose, respectivamente 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, sendo as primeiras e as segundas amostras positivas no MAT; B – amostras pareadas de pacientes com leptospirose, respectivamente 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, sendo as primeiras amostras negativas e as segundas positivas no MAT; C – soros com resultado negativo representantes do Grupo controle, sendo 1 e 2 soros de pacientes diagnosticados com hepatite A, 3 e 4 soros de pacientes diagnosticados com dengue, 5 e 6 soros de pacientes diagnosticados com toxoplasmose, 7 soro de paciente diagnosticado com febre maculosa e 8 soro de paciente diagnosticado com hepatite C.

O teste padronizado foi aplicado em soros pareados dos Grupos 1, 2, 3 e nos soros do grupo controle. Os resultados do teste nos soros dos Grupos 1, 2 e 3 estão resumidos na **Tabela 1**.

As primeiras amostras de soro do Grupo 1 apresentaram reação negativa no MAT, porém 76,7% dos soros apresentaram resultados positivos no dot-ELISA com a GLP Copenhageni e 90,0% com a GLP Patoc. Todas as segundas amostras foram positivas pelo MAT com títulos ≥ 200 , caracterizando conversão sorológica. Os mesmos soros apresentaram positividade também de 100% no dot-ELISA IgM tanto com GLP Copenhageni quanto com GLP Patoc.

No Grupo 2, tanto as primeiras quanto as segundas amostras apresentaram reação positiva no MAT, com títulos que variaram de 200 a 12.800 nas primeiras e de 800 a 25.600 nas segundas amostras. No dot-ELISA tanto as primeiras quanto as segundas amostras apresentaram 100% de reatividade com os dois antígenos empregados.

O Grupo 3 foi dividido em A e B, e nele estão compreendidos soros de pacientes representando os seguintes sorogrupos: 1 de Canicola, 1 de Bataviae, 2 de Australis, 7 de Autumnalis, 1 de Shermani, 3 de Sejroe, 1 de Hebdomadis, 2 de Ballum, 5 de Cynopteri e 1 de Djasiman. Seis soros foram considerados inconclusivos, sendo 2 pertencentes aos sorogrupos Grippotyphosa e Batavie, 1 aos sorogrupos Pyrogenes e Tarassovi, 2 aos sorogrupos Hebdomadis e Celledoni e 1 aos sorogrupos Canicola e Ballum. Nas primeiras amostras, no Grupo 3A, todos os 15 soros apresentaram reação negativa no MAT, porém no dot-ELISA os soros apresentaram 73,3% e 46,6% de positividade utilizando GLP Copenhageni e GLP Patoc, respectivamente. No Grupo 3B, ainda nas primeiras amostras, todos os 15 soros apresentaram reação positiva no MAT enquanto que no dot-ELISA os soros apresentaram 86,6% e 73,3 % de positividade com a GLP Copenhageni e a GLP Patoc, respectivamente. Nas segundas amostras, todos os soros representantes de todos os sorogrupos foram positivos tanto no MAT quanto no dot-ELISA realizado

com a GLP Copenhageni, apresentando 100% de reatividade, porém quando foi utilizado GLP Patoc, a reatividade do dot-ELISA foi menor (60,0 % - Grupo 3 A e 93,3% - Grupo 3 B).

Todos os 30 soros do Grupo Controle apresentaram reação negativa no MAT, enquanto que 1 soro de paciente com diagnóstico positivo para dengue e 1 soro de paciente com diagnóstico positivo para toxoplasmose apresentaram reação positiva no dot-ELISA quando utilizada a GLP Copenhageni (3,3%) e a GLP Patoc (3,3%), respectivamente.

Tabela 1 - Resultados das reações de MAT (teste de aglutinação microscópica) e de dot-ELISA(dot - enzyme-linked immunosorbent assay) realizadas com soros de pacientes com leptospirose dos Grupos 1, 2 e 3.

Pos/N*	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3			
	1° amostra	2° amostra	1° amostra	2° amostra	1° amostra		2° amostra	
					A	B	A	B
MAT	0/30	30/30	30/30	30/30	0/15	15/15	15/15	15/15
Dot-ELISA GLP Copenhageni	23/30 76,6%	30/30 100%	30/30 100%	30/30 100%	11/15 73,3%	13/15 86,6%	15/15 100%	15/15 100%
Dot-ELISA GLP Patoc	27/30 90,0 %	30/30 100 %	30/30 100 %	30/30 100 %	7/15 46,6%	11/15 73,3%	9/15 60,0%	14/15 93,3%

* POS/N = n° de resultados positivos sobre n° de soros examinados

A- 1ª amostras não reativas no MAT, porém apresentando soroconversão para leptospirose de outros sorogrupos que não Icterohaemorrhagiae

B- 1ª amostras reativas no MAT com positividade para leptospirose de outros sorogrupos que não Icterohaemorrhagiae

Na **Tabela 2** estão discriminados os sorogrupos utilizados no Grupo 3 e suas respectivas reatividades com os testes de MAT e dot-ELISA tanto nas primeiras

quanto nas segundas amostras. Nas primeiras amostras do Grupo 3A, 15 soros apresentaram reação negativa no MAT, sendo que destes, 11 e 7 apresentaram reação positiva no dot-ELISA utilizando GLP Copenhageni e GLP Patoc, respectivamente. No Grupo 3B, todas as primeiras amostras eram positivas no MAT, porém 2 foram negativas no dot-ELISA com GLP Copenhageni e 4 com GLP Patoc. Os soros das segundas amostras dos Grupos 3A e 3B que não foram reagentes no dot-ELISA utilizando GLP Patoc compreendiam os seguintes sorogrupos: 1 do sorogrupo Bataviae, 1 do Australis, 1 do Hebdomadis, 1 do Cynopteri e 3 inconclusivos sendo 2 pertencentes aos sorogrupos Grippotyphosa e Batavie e 1 aos sorogrupos Pyrogenes e Tarassovi.

Tabela 2 – Resultados das reações de dot-ELISA (dot - enzyme-linked immunosorbent assay) e de MAT (teste de aglutinação microscópica), aplicadas aos soros pareados dos 30 pacientes do Grupo 3, segundo os antígenos utilizados e os prováveis sorogrupo infectantes.

Pacientes	1ª amostra		2ª amostra		Provável Sorogrupo Infectante		
	MAT	Dot - ELISA		MAT		Dot - ELISA	
		GLP Copenhageni	GLP Patoc			GLP Copenhageni	GLP Patoc
1	-	+	-	200	+	-	Inconclusivo: Pyrogenes, Tarassovi
2	-	-	-	12800	+	+	Cynopteri
3	-	+	+	800	+	+	Djasiman
4	-	-	+	800	+	+	Sejroe
5	-	+	-	400	+	-	Australis
6	-	+	-	400	+	-	Cynopteri
7	-	-	-	1600	+	-	Inconclusivo: Grippytyphosa, Bataviae
8	-	+	+	6400	+	+	Inconclusivo: Hebdomadis, Celledoni
9	-	+	-	200	+	+	Inconclusivo: Hebdomadis, Celledoni
10	-	+	+	25600	+	+	Autumnalis
11	-	+	+	800	+	+	Ballum
12	-	+	-	1600	+	-	Bataviae
13	-	+	+	400	+	+	Autumnalis
14	-	-	-	800	+	-	Inconclusivo: Grippytyphosa, Bataviae
15	-	+	+	400	+	+	Inconclusivo: Canicola, Ballum
16	400	+	+	12800	+	+	Ballum
17	1600	+	+	25600	+	+	Australis
18	1600	+	+	51200	+	+	Autumnalis
19	400	-	-	3200	+	+	Sejroe
20	100	+	+	1600	+	+	Sejroe
21	800	+	+	6400	+	+	Autumnalis
22	3200	+	-	12800	+	+	Cynopteri
23	1600	+	+	12800	+	+	Cynopteri
24	3200	+	-	800	+	-	Hebdomadis
25	400	+	+	1600	+	+	Canicola
26	200	+	+	1600	+	+	Shermani
27	12800	+	+	51200	+	+	Autumnalis
28	800	-	-	3200	+	+	Autumnalis
29	100	+	+	3200	+	+	Autumnalis
30	800	+	+	6400	+	+	Cynopteri

Os índices de avaliação relativa do teste de dot-ELISA foram obtidos separadamente para as primeiras e segundas amostras, considerando-se o total de amostras dos Grupos 1, 2, 3 e controle e tendo-se como referência o teste de MAT.

Constam na **Tabela 3** as porcentagens dos valores relativos de sensibilidade (Sr), falso-negativo (F-), especificidade (Er), falso-positivo (F+), Eficiência (Ef) e os valores preditivos positivo (Vp+) e negativo (Vp-), relativos aos dois antígenos estudados (GLP Copenhageni e GLP Patoc). Os cálculos desses índices podem ser observados no **Anexo A2**.

Observa-se um aumento nos valores da Sr quando se passa das primeiras para as segundas amostras de soros, tendo a GLP Patoc apresentado menores valores de sensibilidade do que a GLP Copenhageni. Nenhum resultado falso-negativo foi observado com a GLP Copenhageni nas segundas amostras, porém GLP Patoc apresentou 7,7% .

A especificidade do dot-ELISA apresentou valores altos, demonstrando que os antígenos empregados foram capazes de discriminar os indivíduos não infectados com leptospirose dos infectados. Os dois antígenos empregados apresentaram os mesmos valores de resultados falsos positivos, que não ultrapassaram 5%.

A eficiência do dot-ELISA em relação ao MAT aumentou nas segundas amostras de soros, tendo-se obtido o valor máximo de 99,1% com a GLP Copenhageni.

Tanto nas primeiras quanto nas segundas amostras de soros os valores de Vp+ mantiveram-se altos, independentemente do antígeno empregado, tendo a GLP Copenhageni e a GLP Patoc apresentado nas primeiras amostras 98,7% e nas segundas amostras 98,9% e 98,8%, respectivamente.

Os valores de Vp- foram baixos nas primeiras amostras de soros apresentando 69,0% para GLP Copenhageni e 65,9% para GLP Patoc. Houve um aumento desses valores nas segundas amostras que foram de 100% para GLP Copenhageni e de 80,5% para GLP Patoc.

Os valores de Kappa tendo-se como referência os resultados de MAT, nas primeiras amostras, foram de 0,42 para GLP Copenhageni, com concordância considerada moderada, e de 0,37 para GLP Patoc, com concordância considerada fraca. Nas segundas amostras a concordância obtida foi quase perfeita, com índices de 0,97 para GLP Copenhageni e 0,82 para GLP Patoc.

Tabela 3 - Valores relativos (%) da Sensibilidade (Sr), Falso negativo (F-), Especificidade (Er), Falso positivo (F+), Eficiência (Ef), Valores preditivos positivo (Vp+) e negativo (Vp-), observados no dot-ELISA segundo os antígenos utilizados em amostras de soros dos Grupos 1, 2, 3 e controle.

Antígenos Característica (%)	1ª amostra		2ª amostra	
	GLP Copenhageni	GLP Patoc	GLP Copenhageni	GLP Patoc
Sr	85,5	83,3	100	92,2
F-	14,4	16,6	-	7,7
Er	96,6	96,6	96,6	96,6
F+	3,3	3,3	3,3	3,3
Ef	88,3	86,7	99,1	93,3
Vp+	98,7	98,7	98,9	98,8
Vp-	69,0	65,9	100	80,5

A comparação dos resultados dos testes de dot-ELISA e de ELISA IgM (realizado na rotina do setor de Leptospirose do Instituto Adolfo Lutz - SP), utilizando as primeiras amostras de soros dos Grupos 1, 2 e 3, está representada na **Tabela 4**.

No Grupo 1, ELISA- IgM forneceu 9 resultados positivos entre as 30 amostras analisadas, enquanto que no dot-ELISA, 23 e 27 soros apresentaram reação positiva, utilizando GLP Copenhageni e GLP Patoc, respectivamente.

No Grupo 2, o ELISA-IgM foi capaz de detectar anticorpos em 23 das 30 amostras de soro, enquanto que no dot-ELISA, utilizando qualquer um dos dois antígenos, todas as 30 amostras apresentaram resultados positivos.

No Grupo 3 as amostras não foram subdivididas em A e B, já que o MAT não foi incluído nessa avaliação. No ELISA-IgM, 12 das 30 amostras de soro apresentaram resultado positivo. No dot-ELISA, quando realizado com GLP Copenhageni, 24 das 30 amostras de soro apresentaram resultado positivo, porém, quando realizado com GLP Patoc 18 das 30 amostras apresentaram resultado positivo.

Estes dados mostraram que o dot-ELISA foi capaz de fornecer resultados positivos mais precocemente do que o ELISA-IgM.

Tabela 4 - Resultados das reações de dot-ELISA (dot - enzyme-linked immunosorbent assay) e de ELISA IgM (enzyme-linked immunosorbent assay) aplicadas às primeiras amostras de soros de pacientes dos Grupos 1, 2 e 3.

		GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
DOT - ELISA POS/N*	ELISA IgM POS/N*	1ª Amostra	1ª Amostra	1ª Amostra
		9/30	23/30	12/30
GLP Copenhageni		23/30	30/30	24/30
		76,6 %	100 %	80,0%
GLP Patoc		27/30	30/30	18/30
		90,0 %	100 %	60,0 %

* POS/N = n° de resultados positivos sobre n° de soros examinados

Para garantir a ausência de falsos positivos, decorrentes do fator reumatóide, no teste para detecção de anticorpos IgM aqui estudado, uma amostragem de 30 soros positivos foram absorvidos com *RF absorbens*® para avaliação da possível interferência do fator reumatóide na detecção de anticorpos da classe IgM. Todos mantiveram a positividade no teste de dot-ELISA depois da absorção, mostrando que a positividade era específica para GLP e não devido ao fator reumatóide.

5. Discussão

A leptospirose é uma antropozoonose presente em praticamente todas as regiões do planeta. Incide com maior frequência nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem a transmissão da doença e a manutenção da cadeia epidemiológica. Provoca sérios danos à saúde humana e veterinária, acarretando conseqüentemente problemas econômicos e sociais.

Na década passada, a leptospirose foi reconhecida globalmente como uma importante doença infecciosa reemergente, ocorrendo tanto em países desenvolvidos e industrializados, como nos países em desenvolvimento e regiões rurais.

No Brasil, nos últimos dez anos, ocorreram 60.573 casos de leptospirose com 6.778 óbitos (<http://portal.saude.gov.br>). Desses casos, 7.757 ocorreram no Estado de São Paulo (<http://www.cve.saude.sp.gov.br>)

Devido à baixa sensibilidade e especificidade da visualização direta das leptospirosas em campo escuro e da cultura em meios especiais, além da demora desta última em fornecer um resultado, os testes sorológicos têm sido muito importantes para o diagnóstico da leptospirose humana.

O teste sorológico de referência é o teste de aglutinação microscópica (MAT), porém como necessita de leptospirosas vivas e de técnicos especializados para sua realização, muitos outros testes têm sido desenvolvidos como alternativa. Estes testes utilizam diferentes preparações antigênicas para a detecção de anticorpos, principalmente da classe IgM.

Alguns autores têm demonstrado que a detecção de anticorpos da classe IgM é mais eficiente que da classe IgG no diagnóstico da leptospirose (ADLER et al.,

1980; SILVA et al.,1995; SILVA et al., 1997). No presente estudo esse dado foi confirmado, pois os resultados obtidos com o dot-ELISA IgG mostraram baixa reatividade em soros positivos verdadeiros e altas taxas de reações inespecíficas. Por esse motivo, a padronização do uso da GLP no teste de dot-ELISA IgG foi descontinuada.

A identificação de antígenos de leptospiras, expressos durante a infecção, tem implicações importantes, principalmente para o desenvolvimento de novos exames sorodiagnósticos e estratégias imunoprotetoras.

A GLP é uma glicolipoproteína que tem sido bastante estudada, principalmente com o objetivo de estabelecer quais os efeitos que esta toxina causa no organismo durante a infecção por leptospiras. Porém, o emprego da GLP como antígeno, em um teste imunodiagnóstico, não tem sido relatado na literatura até o momento, sendo, portanto, o presente estudo inédito. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se esta toxina induz resposta imune humoral em pacientes infectados por *Leptospira* sp e em caso positivo, estudar a possibilidade de utilizá-la como antígeno em testes sorológicos.

O emprego da GLP como antígeno em dot-ELISA, como teste alternativo ao MAT, mostrou ser viável pelas taxas de positividade, de 100%, encontrado nos indivíduos infectados, confirmados sorologicamente, independente do título do MAT.

O teste de dot-ELISA utilizando a GLP mostrou resultados altamente precoces, pois foram observados positividade de 76,6 e 90% para GLP Copenhageni e Patoc, respectivamente, para as primeiras amostras do Grupo 1, que apresentaram resultados ainda negativos no MAT. Resultados positivos foram observados em algumas amostras colhidas a partir do terceiro dia da doença. Estes dados são muito importantes, já que a rapidez no diagnóstico está associada a

melhores respostas terapêuticas, reduzindo assim o tempo de internação hospitalar e conseqüentemente os custos, além de antecipar o retorno do infectado às atividades produtivas.

Essa precocidade do dot-ELISA na detecção de anticorpos IgM anti GLP pode também ser observada quando se comparou os resultados com o teste de ELISA IgM utilizado atualmente como teste de triagem no setor de Leptospirose do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Somente 9 das trinta amostras (30%) de soro colhidas na primeira semana da doença (Grupo 1), apresentaram resultado positivo no ELISA IgM, taxa essa bem menor que a obtida com o dot-ELISA (76,6% e 90,0% respectivamente para a GLP Copenhageni e a GLP Patoc).

Outros autores também têm relatado índices semelhantes de precocidade, mas os dados não são comparáveis devido à heterogeneidade dos grupos de pacientes estudados, dos métodos de laboratório e da diversidade de antígenos empregados (PAPPAS et al., 1985; RIBEIRO et al., 1996; WINSLOW et al., 1997, YASUDA et al., 1991).

O Grupo 3, que consiste de amostras de soros de pacientes infectados por leptospirosas pertencentes a outros sorogrupos que não *Icterohaemorrhagiae*, foi dividido em A e B, tendo as primeiras amostras apresentado resultados negativos no MAT no Grupo A e positivos no Grupo B. As segundas amostras foram todas positivas no MAT tanto no Grupo A como no B, caracterizando assim todos os pacientes do Grupo como casos confirmados sorologicamente para leptospirose. Os resultados mostraram que a GLP é gênero-específica, tendo reagido com todos os sorogrupos estudados, quando utilizada a GLP Copenhageni no teste de dot-ELISA IgM, apresentando reação cruzada entre os diferentes sorogrupos dentro do gênero *Leptospira* sp.

A avaliação relativa do dot-ELISA mostrou que este teste apresenta alta capacidade diagnóstica, tendo-se como referência o teste de MAT.

A sensibilidade relativa do dot-ELISA foi máxima, já que apresentou taxa de 100% nas segundas amostras para GLP Copenhageni.

A especificidade relativa do dot-ELISA foi alta para ambos os antígenos empregados, com taxa de 96,6%, devido ao baixo índice de falso positivo, correspondente a um único soro dentre os 30 do Grupo controle (3,3%).

A eficiência relativa mostrou ser alta no dot-ELISA utilizando GLP, tendo apresentado taxas de 88,3% e 86,7% para as primeiras amostras, aumentando para 99,1% e 93,3% para as segundas amostras utilizando GLP Copenhageni e Patoc, respectivamente.

Os valores de Vp+ foram altos tanto para GLP Copenhageni quanto para GLP Patoc, variando de 98,7 a 98,9 entre as primeiras e as segundas amostras. Já, para os valores baixos de Vp- das primeiras amostras, deve-se considerar que os resultados negativos desse grupo dependem de variável não relacionada à capacidade de detecção do teste e sim da precocidade da coleta do sangue do paciente. Assim, considerando-se as segundas amostras, Vp- apresentou excelente resultado, com índice de 100%.

Esses resultados demonstram que dot-ELISA utilizando a GLP como antígeno é excelente para ser utilizado como teste de triagem no diagnóstico da leptospirose, pois apresenta sensibilidade máxima, alta especificidade e detecção precoce da infecção.

Pappas et al. (1985), quando introduziu o dot-ELISA IgM no diagnóstico da leptospirose, utilizando antígenos extraídos pelo etanol, de cepa patogênica e

saprófita, encontraram taxas menores de sensibilidade e especificidade (91,2% e 81,3% respectivamente), do que do dot-ELISA IgM aqui estudado.

Silva et al (1997), que utilizaram sonicados de diferentes sorovares na padronização do teste de dot-ELISA para o diagnóstico da leptospirose, encontraram taxas de 98% de sensibilidade e 100% de especificidade na detecção de anticorpos IgM, sendo semelhantes às taxas encontradas no presente estudo. Entretanto para obtenção do antígeno, os autores utilizaram 5 sorovares de leptospiras patogênicas, o que demanda mais custo e risco ao operador.

O teste de dot-ELISA IgM aqui padronizado forneceu desempenho diagnóstico superior a vários testes utilizados no diagnóstico da leptospirose, relatados na literatura.

O teste de Hemaglutinação indireta tem sido considerado o menos sensível, apresentando valores inferiores a 80% (BAJANI et al., 2003; EFFLER et al, 2002). Outros testes, tais como, Contraimuno eletroforese, Látex e ELISA IgM, têm apresentado índices de eficiência satisfatórios, porém inferiores aos aqui obtidos, variando de 89,8% a 97,9% (MYERS, 1987; PREGNOLATO, 2001; Smits et al., 2000; YASUDA et al., 1991). Essa variação de eficiência não depende somente da metodologia aplicada, mas também do antígeno utilizado no teste.

A avaliação da concordância entre os testes dot-ELISA e MAT, foi feito por meio do índice Kappa, que varia de 0 a 1, sendo 1 a expressão da exata concordância entre os testes. Nas primeiras amostras a GLP Copenhageni apresentou índice interpretado como moderado enquanto que a GLP Patoc apresentou índice interpretado como fraco. Já nas segundas amostras, o índice de ambos os antígenos foi interpretado como quase perfeito. Essa baixa concordância nas primeiras amostras entre os testes de MAT e dot-ELISA, não se refere ao mau

desempenho deste último, e sim à baixa capacidade do MAT em detectar anticorpos em amostras colhidas precocemente.

Comparando-se os dados das tabelas 1, 2, 3 e 4 conclui-se que a GLP Patoc mostrou um desempenho diagnóstico inferior ao observado com a GLP Copenhageni, apesar de ter apresentado maior precocidade na detecção de anticorpos nas primeiras amostras do Grupo 1. Esse antígeno apresentou menores valores relativos de sensibilidade, tanto nas primeiras como nas segundas amostras. Além disso, os dados da tabela 2 demonstram que a GLP Patoc não foi eficiente na detecção de todos os representantes dos sorogrupos patogênicos prevalentes no Estado de São Paulo, apresentados no Grupo 3. Entre os representantes dos sorogrupos estudados, em relação às segundas amostras, esse antígeno não foi capaz de detectar infecções por Batavie e Grippytyphosa, e detectou parcialmente infecções por Cynopteri e Australis. Os soros com anticorpos contra os representantes dos sorogrupos Autumnalis, Sejroe, Ballum, Hebdomadis e Canicola apresentaram resultados positivos com GLP Patoc. Os demais sorogrupos não foram avaliados por serem constituídos apenas de um representante dentro do Grupo.

Observou-se uma relação discreta entre os títulos do MAT e a positividade do dot-ELISA utilizando GLP Patoc, com aumento da positividade concordando com a elevação dos títulos do MAT, sendo de 100% a partir de 3200. Porém essa observação deverá ser confirmada em estudos posteriores, utilizando amostragens maiores de soro.

A GLP Copenhageni detectou anticorpos em todas as segundas amostras de soros do Grupo 3, independente do provável sorogrupo infectante. Provavelmente

esta GLP está presente em todos os sorogrupos estudados, que representam os mais freqüentes no Estado de São Paulo.

Essas avaliações não foram realizadas nas primeiras amostras de soro, já que os resultados negativos poderiam ser decorrentes da precocidade da coleta de sangue e não do provável sorogrupo infectante ou do título do MAT, como já comentado anteriormente.

Yasuda et al. (1991) utilizando extrato antigênico tratado com Triton X 100 a 4% de sorovar Icterohaemorrhagiae e de sorovar Patoc, na Contraimunoeletroforese, também não obtiveram resultados satisfatórios com este último, sugerindo que não seja utilizado o antígeno extraído de sorovar Patoc.

A padronização do uso da GLP no teste de dot-ELISA IgM mostrou que este antígeno é altamente imunogênico, podendo ser empregado com sucesso no diagnóstico da leptospirose, apresentando estabilidade de cerca de 9 meses a 4°C.

O dot-ELISA utilizando a GLP mostrou ser um teste de grande importância na saúde pública e factível para todos os tipos de laboratórios, desde os de grande porte até os menores e de poucos recursos. O teste apresenta alta taxa de positividade, não necessita de manipulação de cepas patogênicas vivas e apresenta praticidade na realização do teste. A leitura é visual, porém objetiva, feita sem a necessidade de equipamento especializado. É de baixo custo, utilizando pouca quantidade de antígeno.

6 CONCLUSÕES

6. Conclusões

- A GLP é um antígeno reconhecido por soros de pacientes com leptospirose, tanto na fase aguda quanto na fase de convalescença da doença;
- O dot-ELISA IgG não forneceu resultados satisfatórios.
- Os testes de dot-ELISA IgM utilizando GLP extraída de sorovar Copenhageni ou de sorovar Patoc apresentaram sensibilidade maior do que o teste de referência MAT, detectando anticorpos mais precocemente. Apresentaram, também, altos índices de especificidade, tendo cada antígeno reagido falso-positivamente com apenas uma amostra (3,3%)
- Apesar da GLP Patoc ter apresentado reatividade mais precoce do que a GLP Copenhageni, esta última apresentou maiores valores de sensibilidade, reagindo com todos os sorovares aqui estudados.
- A GLP extraída de sorovar Copenhageni pode ser usada como antígeno no teste de dot-ELISA para diagnóstico sorológico de leptospirose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ADLER, B. et al. Detection of specific antileptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.** v. 11, p. 425-427, 1980.

AHMAD, S. N.; SHAH, S. H.; AHMAD, F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **J. Postgrad. Med.** v. 51, p. 195-200, 2005.

ALSTON, J. M.; BROOM, J. C. **Leptospirosis in man and animals.** Edinburg, Livingstone, 1958, 367 p.

ANDRADE, J.; BRANDÃO, A. P. Contribuição ao conhecimento da epidemiologia da leptospirose humana, com especial referência ao Grande Rio, Brasil, no período de 1970 a 1982. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz;** v.82, n. 1, p. 91-100, 1987.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. (eds.). **Statistical Methods in Medical Research.** Blackwell Science, 3rd edition, Oxford, UK, 1994, 620 p.

BAJANI, M. D. et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 2, p. 803-809, 2003.

BARANTON, G.; OLD, I. G. The Spirochaetes: a different way of life. **Bull. Inst. Pasteur.** v. 93, p.63-95, 1995.

BARNETT, J.K. et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infect. Immun.** v. 67, n.2, p. 853-861, 1999.

BHARTI, A.R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.** v. 3, p.757-771, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**
Informação e documentação: referências : elaboração. Rio de Janeiro, 2002.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index
Medicus, 2006.
Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/browser.cgi
www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.htm

BRENDLE, J. J.; ROGUL, M.; ALEXANDER, A. D. Deoxyribonucleic acid hybridization among selected leptospiral serotypes. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 24, p. 205-214, 1974.

BURTH, P. et al. Purification and Characterization of Na,K-ATPase Inhibitor Found in a Endotoxin of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 4, p. 1557-1560, 1997.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Leptospirose. Dados estatísticos Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 17 dez. 2006.

CHAPMAN, A.J.; ADLER, B.; FAINE, S. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **J.Med.Microbiol.** v. 25, p. 269-278, 1998.

CHO S.N.; UHM, J.R; KIM, J.D. Comparative analysis of Lipopolysaccharide and Lipid antigens of *Leptospira interrogans* serovars. **Y. Med. J.** v. 33, n. 1, p.24-31, 1992.

CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. **FEMS Microbiol. Letters**,v. 138, p. 211-214, 1996.

COSTA, S.; TROISIER, J. Un cas de spirochétose ictero-hémorragique.**Bull. Soc. méd. Hôp. Paris.** v.40, p. 1635, 1916.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O. R.; LEVETT, P. N. Assessment Of The Efficacy Of An IgM-Elisa And Microscopic Agglutination Test (Mat) In The Diagnosis Of Acute Leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 61, n. 5, p. 731–734, 1999.

DAWSON, B. et al., Infective jaundice. **Brit. Med. J.** v.10, p.90, 1917.

DIAMENT, D. et al. Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 4, p. 1677-1683, 2002.

DOBRINA, A. et al. *Leptospira icterohemorrhagiae* and Leptospire Peptidoglycans Induce Endothelial Cell Adhesiveness for Polymorphonuclear Leukocytes. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 63, n. 8, p. 2995-2999, 1995.

DORIGATTI, F. et al. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 18, p. 909-914, 2005.

EFFLER, P. V. et al. Evaluation of the Indirect Hemagglutination Assay for Diagnosis of Acute Leptospirosis in Hawaii **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 3, p.1081–1084, 2000.

FAINE, S. et al. ***Leptospira and Leptospirosis***. 2° ed. Melbourne, Austrália, MediSci, 1999, 296 p.

FENOLL, A.; JADO, I.; VICIOSO, D.; CASAL, J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, n. 3, p. 764-766, 1997.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Sorologia: importância e parâmetros. *In: Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2ª ed., Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 2001. p 1-8.

FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3303–3310, 2001.

GSELL, O. The history of leptospirosis: 100 years **Zbl. Bakt. Hyg.** v. 257, p. 473-478, 1984.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun.** v. 69, p. 4958-4968, 2001.

GUSSENHOVEN, G. C. et al. LEPTO Dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, n. 1, p. 92-97, 1997.

HAAPALA, D. K. et al. Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of *Leptospira*. **J. Bacteriol.** v. 98, p. 421-428, 1969.

HOVIND-HOUGEN, K. Leptospiraceae, a new family to include *Leptospira* Noguchi 1917 and *Leptonema* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 29, p. 245-251, 1979.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica) **J. Exp. Med.** v. 26, p. 341-353, 1917.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection and especific therapy of Weil's disease (spirochetosis icterohaemorrhagica). **J. Exp. Med.** v. 23, p. 377-402,1916.

ITO, T.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. **Vet. Microbiol.** v. 15, p. 89-96, 1987.

KADIS, S.; PUGH, W. L. Urea Utilization by *Leptospira*. **Infect. Immun.** v.10, n.4, p.793-801, 1974.

LEVETT, P. N.; WHITTINGTON, C. U. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.** v.36, n.1, p.111–141, 1998.

LEVETT, P. N. et al. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 8, n. 2 , p. 349–351, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n. 2, p.296-326, 2001.

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin m antibodies in acute leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 66, n. 6, p. 745–748, 2002.

MACEDO SANTOS, R. T. et al. Glicolipoproteina de *Leptospira interrogans* Sorogrupo Icterohaemorrhagiae: distribuição em fígado e rim de cobaias experimentalmente infectadas. **Rev Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 31, n. 4, p. 235-241, 1989.

MAGALDI, A.J. et al. Non oliguric acute renal failure after experimental leptospirotic infection-effect of the glycolipoprotein (GLP) extrated from *Leptospira interrogans*. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 10, p. 636 A, 1999.

MARTIN, L.; PETIT, A. Sero-diagnostic de la Spirochétose icterohemorrhagiae. **Bull. Mem. Soc. Med. Paris.** v. 42 p. 672-675, 1918.

MERIEN, F. et al. Identification of a 36kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 18, p.17-22, 2000.

MILNER, R. A. et al. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **J. Clin. Microbiol.** v. 22, n. 4, p. 539-542, 1985.

MYERS, D. M. Serodiagnosis of human leptospirosis by counterimmunoelectrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, n. 5, p. 897-899, 1987.

NALLY, J. E. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Pathol.** v. 164, p. 1115-1127, 2004.

NOGUCHI, H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae* (Inada & Ido) **J. Exp. Med.** v. 27, p. 575-592, 1918.

PAPPAS, A. A. et al. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA comparison with the microscopic agglutination test. **Am. J. Med. Hyg.** v. 34, p. 346-354, 1985.

PEREIRA, M. M. et al. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. **Exp. Toxic. Pathol.** v. 49, p. 505-511, 1997.

PRIYA, C. G. et al. Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis. **J. Med. Microbiol.** v. 52, p.667-673, 2003.

RAMADASS, P. et al. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.42, n.2, p.215-219, 1992.

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

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

ROMERO, E. C.; CALY, C. R.; YASUDA, P. H. The persistence of leptospiral agglutinins titers in human leptospirosis sera diagnosed by the microscopic agglutination test. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 40, n. 3, p. 183-184, 1998.

ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C. M.; YASUDA, P.H. Human Leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** v.45,n. 5, p. 245-248, 2003.

SAKATA, E. E. et al. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de caso de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 34, p. 217-221, 1992.

SACKETT, D. L.; HAYNES, B. R.; GUYATT, G. H.; TUGWELL, P. (Eds.) **Clinical Epidemiology – A Basic Science for Clinical Medicine.** 2nd edition, Little Brown and Company, Boston, 1991, 441 p.

SCHUFFNER, W.; MOCHTAR, A. Versuche zur aufteilung von Leptospirenstamm, mit einleitenden bemerkungen über den verlauf von agglutination und lysis. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser.** v 101, p. 405-413, 1927.

SEIJO, A. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. **Emerg. Infect. Dis.** v.8, n. 9, p. 1004-1005, 2002.

SHIMID, G. P et al. Newly recognized *Leptospira* species (“*Leptospira inadai*” serovar lyme) isolated from human skin. **J. Clin. Microbiol.** v. 24, p. 484-486, 1986.

SILVA, A. R. M. B. et al. Aspectos epidemiológicos das leptospiroses humanas no Grande Rio, Brasil. **Bol. Ofic. Sanit. Panameric.** v. 77, n.2, p.122-133. 1974.

SILVA, M. V. et al. Imunodiagnóstico da Leptospirose humana através do teste de ELISA-IgM, empregando-se diferentes preparações antigênicas a partir de sorotipos prevalentes de *Leptospira interrogans*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 32, n. 4, p. 233-239, 1990.

SILVA, M. V. et al. Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. **J. Trop. Med. Hyg.** v. 98, p. 268-272, 1995.

SILVA, M. V. et al. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 56, n. 6, p. 650-655, 1997.

SMITS, H. L. et al. International multicenter evaluation of the clinical utility of a Dipstick Assay for Detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Serum Specimens. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. 9, p. 2904–2909, 1999.

STIMSON, A M. Note on a organism found in yellow-fever tissue. **Public. Hlth. Rep. Wash.** v. 22, p. 541, 1907.

STOKES, A; RYLE, J. A. A note on Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica) as it has occurred in the Army Flanders. **Brit. Med. J.** v.2, p.413, 1916.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.** v. 79, n.2, p. 237-248,1973.

SULZER, C. R. et al. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 2, n. 3, p. 218–221, 1975.

TAHILIANI, P. et al. Gel purified lipI32: A prospective antigen for detection of leptospirosis. **J. Postgrad. Med.** v.51, p.164-168, 2005.

TAKASE, H.; YANAGAWA, R. Opsonic effect of Monoclonal antibodies against *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Vet. Microbiol.** v. 16, p. 167-180, 1988.

TERPSTRA, W. J.; LIGTHART, G. S.; SCHOONE, G. J. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human Leptospirosis. **J.Gen. Microbiol.** v.131, p.377-385, 1985.

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

VINH, T. et al. Immunochemical studies of opsonic epitopes of the lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Immun. Med. Microbiol.** v. 8, p. 99-108, 1994.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE S. Ultrastructure and Chemical Composition of Lipopolysaccharide Extrated from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **J. Gen. Microbiol.** v. 132, p. 103-109, 1986.

VIJAYACHARI, J. P. *Leptospira interrogans* serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands. **Med. Microbiol.** v.52, p. 913-918, 2003.

VOLINA, E. G.; LEVINA, L. F.; SOBOLEVA, G. L. Phospholipase activity and virulence of pathogenic Leptospirae. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.**, v. 2, p. 163-169, 1986.

WINSLOW, W. E.; MERRY, D. J.; PIRC, M. L.; DEVINE, P. L. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin m antibody in diagnosis of human leptospiral infection. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, n. 8, p. 1938–1942, 1997.

YANAGIHARA, Y. et al. Phospholipases of *Leptospira* I. Presence of phospholipase A1 and lysophospholipase in *Leptospira biflexa*. **Microbiol. Immunol.**, v. 28, n. 7, p. 747-756, 1984.

YASUDA, P. H. et al. Avaliação da contraímunoelctroforese com antígenos dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Patoc no diagnóstico sorológico da leptospirose humana. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 36, n. 6, p. 497-502, 1991.

YASUDA, P.H. et al. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 37, p. 407-515, 1987.

YOUNES-IBRAHIM, M. et al. Inhibition of Na,K-ATPase by endotoxin extrated from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopatology of leptospirosis. **C. R. Acad. Sci. (Paris)**, v. 318, p. 619-625, 1995.

YOUNES-IBRAHIM, M. et al. Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 213-231, 1997.

ZOCHOWSKI, W. J.; PALMER, M. F.; COLEMAN, T. J. An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK. **J. Clin. Pathol.** v. 54, p. 25-30, 2001.

Anexo A1

Reagentes e soluções

NBT

NBT.....	0,5 g
N,N-dimetilformamida (DMF) 70%.....	10 mL

BCIP

BCIP.....	0,5 g
N,N-dimetilformamida (DMF) 100%.....	10 mL

Tampão 3

Tris HCl 1M.....	50 mL
NaCl 3M.....	16,7 mL
H ₂ O.....	500 mL

PBS

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O.....	0,345 g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O.....	1,406 g
NaCl.....	8,52 g
H ₂ O.....	1000 mL

Anexo A2

Cálculos estatísticos

Tabelas para os cálculos estatísticos do dot-ELISA em relação ao teste de referência MAT

1ª amostras de soro utilizando GLP de sorovar Copenhageni

	Caso confirmado (MAT)		
Dot-ELISA	+	-	total
+	77 (VP)	1 (F+)	78
-	13 (F-)	29 (VN)	42
total	90	30	120 (N)

VP= verdadeiro positivo, F- = falso negativo, F+ = falso positivo,
VN= verdadeiro negativo, N=nº total de amostras

2ª amostras de soro utilizando GLP de sorovar Copenhageni

	Caso confirmado (MAT)		
Dot-ELISA	+	-	total
+	90(VP)	1(F+)	91
-	0 (F-)	29(VN)	29
total	90	30	120(N)

VP= verdadeiro positivo, F- = falso negativo, F+ = falso positivo,
VN= verdadeiro negativo, N=nº total de amostras

1ª amostras de soro utilizando GLP de sorovar Patoc

	Caso confirmado (MAT)		
Dot-ELISA	+	-	total
+	75(VP)	1(F+)	76
-	15 (F-)	29(VN)	44
total	90	30	120(N)

VP= verdadeiro positivo, F- = falso negativo, F+ = falso positivo,
VN= verdadeiro negativo, N=nº total de amostras

2ª amostras de soro utilizando GLP de sorovar Patoc

	Caso confirmado (MAT)		
Dot-ELISA	+	-	total
+	83(VP)	1(F+)	84
-	7 (F-)	29(VN)	36
total	90	30	120(N)

VP= verdadeiro positivo, F- = falso negativo, F+ = falso positivo,
VN= verdadeiro negativo, N=nº total de amostras

Fórmulas para obtenção dos índices de avaliação do dot-ELISA em relação ao teste de referência MAT**Sensibilidade – Sr**

$$Sr = \frac{\text{verdadeiros-positivos}}{\text{verdadeiros-positivos} + \text{falso-negativos}}$$

Especificidade – Er

$$Er = \frac{\text{verdadeiros-negativos}}{\text{falso-positivos} + \text{verdadeiros-negativos}}$$

Valor preditivo positivo – Vp+

$$Vp+ = \frac{\text{verdadeiros-positivos}}{\text{verdadeiros-positivos} + \text{falso-positivos}}$$

Valor preditivo negativo – Vp-

$$Vp- = \frac{\text{verdadeiros-negativos}}{\text{verdadeiros-negativos} + \text{falso-negativos}}$$

Eficiência – Ef

$$Ef = \frac{\text{verdadeiros-positivos} + \text{verdadeiros-negativos}}{N}$$

Quadro de classificação do índice Kappa

Valor de Kappa	Concordância
0	
0,00 – 0,20	Ruim
0,21 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeita

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Sorologia: importância e parâmetros. *In: Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2ª ed., Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 2001.