

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



Dissertação

**ELISA de captura de antígeno para o
diagnóstico de Leptospirose**

Flávia Aleixo Vasconcellos

Pelotas, 2007

FLÁVIA ALEIXO VASCONCELLOS

**ELISA de captura de antígeno para o
diagnóstico de Leptospirose**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Agrícola da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências
(área do conhecimento: Imunologia
Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Guimarães Aleixo

Pelotas, 2007

]

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V331e Vasconcellos, Flávia Aleixo

ELISA de captura de antígeno para o diagnóstico de leptospirose / Flávia Aleixo Vasconcellos ; orientador José Antônio Guimarães Aleixo. – Pelotas, 2007. –54f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Anticorpos monoclonais.
4.IgY.5.Estreptavidina 6.Biotina. I.Aleixo, José Antônio
Guimarães. II.Título.

CDD: 614.56

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

Prof. Dr. Fabio Pereira Leivas Leite

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Prof. Dr. José Antonio Guimarães Aleixo

A solução é voltar ao marco zero.

Desaprender para aprender.

Deletar para escrever em cima.

*Houve um tempo em que eu pensava que, para isso, seria preciso nascer de novo,
mas hoje sei que dá pra renascer várias vezes nesta mesma vida.*

Basta desaprender o receio de mudar.

(Martha Medeiros)

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, através do Centro de Biotecnologia, pela oportunidade de aprendizado e crescimento que me proporcionou.

Ao meu orientador Professor Dr. José Antonio Guimarães Aleixo pela confiança, incentivo, paciência com atitudes bem delimitadas profissionalmente e controle emocional familiar necessário.

Às minhas colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada: Cláudia Fernandes, pela confiança e acolhida no Centro de Biotecnologia antes mesmo do início e no decorrer deste trabalho, Mariana Coutinho pela ajuda nas fases mais delicadas, Núbia Seyffert e Ângela Moreira, por compartilharem comigo as dificuldades, inseguranças e principalmente os bons resultados.

Aos estagiários do Laboratório de Imunologia Aplicada: Leonardo Monte, Gabriela Hädrich, Carla Sehn, Carla Ciochetto e Clarice Dias, pela valiosa ajuda nas tarefas do dia-a-dia.

À Auxiliar de Laboratório Michele Santos e à secretária Alegani Monteiro, pela incansável maneira de ajudar, embasar e manter a rotina organizacional dos laboratórios e do meu desempenho acadêmico, respectivamente.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular pela boa vontade em sempre colaborar. Ao Éverton da Silva pela maneira amigável, capaz e solícita de ajudar no cultivo das cepas de *Leptospira*, e pelo incentivo pessoal e desempenho profissional, principalmente na finalização do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia: Talita Ross, Andréa Rocha, Luana Dummer, Fabrício Conceição, e em especial à Carina Moraes, pelo convívio profissional e principalmente pelas palavras amigas sempre existentes de incentivo pessoal.

Aos demais colegas do Centro de Biotecnologia e outros programas de pós-graduação, pelo convívio agradável, pelos momentos de descontração em festas e em nossos jogos semanais de vôlei.

Ao Hemocentro Regional de Pelotas pelo fornecimento dos soros humanos usados neste trabalho.

Ao conjunto Agrotécnico Visconde da Graça na pessoa do professor Marcos Anciuti pelo fornecimento dos animais, e em determinada etapa do projeto, o acolhimento em suas dependências.

Ao Prof. Dr. Claudiomar Brod, Coordenador do Centro de Controle de Zoonoses da Universidade Federal de Pelotas, pelo fornecimento de soros humano e animal, previamente testados por metodologia padrão, usados neste trabalho.

À Capes pelo incentivo científico, através de apoio financeiro.

À minha mãe Heloísa por ter me ensinado a perseguir meus objetivos e me ajudar a concretizá-los de maneira incondicional, dando suporte físico e emocional para chegar aonde cheguei.

Ao meu pai Paulo por ter acreditado na minha capacidade de seguir meu caminho sozinha, e por me amparar de onde esteja.

À minha filha Isabel por dar sentido à minha vida, sem nunca me deixar faltar um sorriso meigo, mesmo sem entender o que se passava, e ainda por vezes demonstrar a satisfação em ver o computador desligado.

Ao Otávio pelo incentivo, amizade, paciência nas ansiedades, conselhos, crédito na minha capacidade de escolha e segurança na minha forma profissional de chegar a resultados.

Aos meus amigos de fora do laboratório, alguns mais perto e outros mais distantes, que sempre me proporcionaram momentos de descontração, palavras de confiança, perseverança e tranquilidade para chegar até aqui.

Muito Obrigada!

RESUMO

VASCONCELLOS, Aleixo Flávia. **ELISA de captura de antígeno para o diagnóstico da leptospirose**. 2007. 54f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* que pode afetar diversos órgãos vitais como pulmões, fígado e rins. A doença caracteriza-se por uma fase inicial bacterêmica de aproximadamente uma semana, seguida de uma fase imune na qual anticorpos específicos são detectados no sangue e leptospirosas são eliminadas na urina. Os sinais clínicos da fase inicial da leptospirose podem ser confundidos com diversas doenças febris, o que torna o diagnóstico laboratorial extremamente importante para decidir sobre o início do tratamento com antibióticos. Os testes laboratoriais existentes para o diagnóstico na fase inicial da doença são todos baseados na detecção de IgM e apresentam baixa sensibilidade. Assim, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico precoce da leptospirose. Neste trabalho foram utilizados anticorpos monoclonais (MAbs) e anticorpo policlonal (IgY) para padronizar três formatos de ELISA de captura de antígeno para uso na detecção direta de leptospirosas no sangue durante a fase aguda da doença. O limite de detecção de leptospirosas em soro humano experimentalmente contaminado variou entre 10^5 e 10^7 células por mililitro nos diferentes formatos. O formato que apresentou melhor desempenho detectou 10^5 leptospirosas por mililitro de soro, e utilizou como anticorpo de captura um MAb contra LipL32, a principal proteína de membrana externa de leptospirosas patogênicas, e como anticorpo de detecção IgY biotinilada, produzida contra um sorovar patogênico de *Leptospira interrogans*. Embora este formato não apresente ainda a sensibilidade adequada para detectar o nível de leptospirosas circulantes no sangue na fase inicial da doença, ele possui potencial para ser aperfeiçoado de forma a atingir aquele nível.

Palavras-chaves: Leptospirose, anticorpos monoclonais, IgY, estreptavidina, biotina.

ABSTRACT

VASCONCELLOS, Aleixo Flávia. **Antigen capture ELISA for the diagnosis of leptospirosis**. 2007.54f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* that can affect vital organs such as lungs, liver and kidneys. The illness is characterized by an acute bacteremic phase of approximately one week, followed by an immune phase in which specific antibodies are found in blood and leptospires are eliminated in urine. Clinical signs in the initial phase of leptospirosis can be confused with other feverish diseases, making laboratory diagnosis of extreme importance to start antibiotic treatment. The existing laboratory tests for early diagnosis of leptospirosis are based on IgM detection and are of low sensitivity. Thus, there is an urgent need for development of new diagnostic strategies for use in the acute phase of leptospirosis. In the present work monoclonal antibodies (MAbs) and polyclonal IgY were used in the standardization of three different antigen capture ELISA formats for direct detection of leptospires in blood during the acute phase of the disease. Detection limit of leptospires in human sera experimentally contaminated ranged from 10^5 to 10^7 cells per millilitre in the different formats. The ELISA format with the best performance was able to detect 10^5 leptospires per millilitre of human sera, using as capture antibody a MAb against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic leptospires, and as detection antibody biotinilated polyclonal IgY against a pathogenic serovar of *Leptospira interrogans*. Although this format did not present the adequate sensitivity for detection of circulating leptospires at the levels existing in blood in the initial phase of the disease, it can be improved in order to do so.

Key words: Leptospirosis, monoclonal antibodies, IgY, estreptavidin, biotin.

Lista de Figuras

Figura 1-	Avaliação da pureza de diferentes purificações de IgY por SDS-PAGE.....	26
Figura 2-	Reatividade da IgY com leptospiros patogênicos e saprófitas em ELISA indireto.....	27
Figura 3 -	Perfil da reatividade antigênica das leptospiros patogênicos e saprófitas com IgY em Western blot.....	27
Figura 4-	Reatividade da IgY biotinilada, com leptospiros patogênicos e saprófitas em ELISA indireto.....	29
Figura 5-	Reatividade do MAb 1D9 biotinilado com LipL32 recombinante em ELISA indireto.....	29
Figura 6-	Limite de detecção de <i>L. interrogans</i> L1 130 no ELISA de captura de antígeno usando MAb anti-LipL32 na captura e IgY na detecção.....	30
Figura 7-	Limite de detecção de <i>L. interrogans</i> L1 130 no ELISA de captura de antígeno usando MAb anti-LipL32 na captura e IgY biotinilada na detecção.....	31
Figura 8-	Limite de detecção de <i>L. interrogans</i> L1 130 no ELISA de captura de antígeno usando MAb anti-LigA e LigB na captura e MAb 1D9 biotinilado na detecção.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1- Índice de aditividade (%) de anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa específicas de leptospiros patogênicas.....	28
---	----

Lista de símbolos e abreviações

Lig	<i>Leptospiral Immunoglobulin-like</i>
LPS	lipopolissacarídeo
mL	mililitro(s)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
µg	micrograma(s)
µl	microlitro(s)
°C	grau(s) Celsius
ELISA	<i>Enzyme-linked immunossorbent assay</i>
nm	nanômetro
UV	ultravioleta
M	molar
min	minutos
h	hora
mg	miligramas
g	força da gravidade
NI	não idêntico
SDS	dodecil sulfato de sódio
PVDF	difluoreto de polivinilideno
PEG	polietilenoglicol
V	volts
mA	miliampere
BSA	albumina sérica bovina
DNA	ácido desoxirribonucléico
mM	milimolar
kDa	kilodalton
DTT	ditiotreitól
PBS	tampão fosfato salino
DMSO	dimetilsulfóxido
OPD	orto-fenilenodiamina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	10
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais das leptospiros e da leptospirose	12
1.2 Sintomatologia da leptospirose	13
1.3 Diagnóstico laboratorial da leptospirose	14
1.4 Membrana externa da <i>Leptospira</i>	16
1.5 Anticorpos Monoclonais	18
1.6 Anticorpos Policlonais (IgY)	19
2 OBJETIVO	21
2.1 Geral	21
2.2 Específico	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Cultivo de leptospiros	22
3.2 Produção de IgY	22
3.3 Anticorpos monoclonais	23
3.4 Biotinilação de anticorpos	23
3.5 ELISA de captura de antígeno	24
3.6 Limite de detecção	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Produção de IgY	26
4.2 Índice de aditividade dos anticorpos monoclonais	28
4.3 Biotinilação de anticorpos	29
4.4 ELISA de captura de antígeno	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS	37
8 APÊNDICES	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leptospirosas e da leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, que são transmitidas direta ou indiretamente entre os animais e o homem (FAINE et al, 1999). Esta importante zoonose possui distribuição global, sendo mais comum em países de clima tropical e temperado (BHARTI et al, 2003). O número de casos da leptospirose humana no mundo não é precisamente conhecido. A incidência pode variar desde aproximadamente 0.1-1 caso por 100.000 pessoas por ano em zonas de clima temperado até 10-100 casos por 100.000 pessoas nos trópicos úmidos. Durante surtos e em grupos de risco de alta-exposição a incidência da doença pode alcançar mais de 100 casos por 100.000 pessoas (WHO, 2003).

Nos países desenvolvidos a leptospirose adquiriu um *status* de doença ocupacional, acometendo principalmente veterinários e outros profissionais que trabalham diretamente com animais e seus subprodutos. Nos últimos anos, o surgimento de casos relacionados com esportes aquáticos e atividades de lazer nestes países fez ressurgir o interesse pela enfermidade. Por outro lado, em países em desenvolvimento, como o Brasil e os demais países da América Latina, a doença assume um caráter endêmico, principalmente na periferia das grandes cidades, onde a população está exposta aos fatores de risco, uma vez que vive em locais com precário saneamento básico, propício a enchentes e ao acúmulo de lixo, que favorecem a proliferação de roedores (KO et al., 1999). No período de 2004 a 2006 foram notificados 39.494 casos de leptospirose no Brasil, sendo 10.341 confirmados, e a taxa de letalidade foi de 11% (SINAN, 2007).

O homem é um hospedeiro acidental na leptospirose. A infecção ocorre através do contato com água, urina e tecidos animais contaminados com o agente, e a transmissão de humano para humano ocorre muito raramente (BOLIN; KOELLNER, 1988). Os reservatórios da enfermidade são animais domésticos e selvagens, embora roedores sinantrópicos, como o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), possam albergar a bactéria viável nos túbulos renais durante anos. Uma mesma espécie animal pode albergar diferentes sorovares leptospirais, dependendo da região geográfica em que se encontra. A biodiversidade das leptospiros pode ser influenciada pelas variações climáticas, interações bióticas e atividades antropogênicas (VINETZ et al., 1996).

Quanto à sistemática, coexistem dois tipos de classificação para as leptospiros, a sorológica e a genotípica (FAINE et al., 1999). A classificação sorológica é a mais amplamente utilizada em todo o mundo nos laboratórios de referência para a leptospirose. A unidade sistemática básica nesta classificação das leptospiros é o sorovar. Já foram descritos mais de 230 sorovares patogênicos e mais de 60 sorovares saprófitas, que estão agrupados em 25 sorogrupos diferentes. Por outro lado, a classificação genotípica por ser mais atual, ainda está restrita a poucos laboratórios. Ela divide as leptospiros em 17 espécies genômicas de acordo com o perfil obtido na hibridização de DNA (MOREY et al., 2006). Por esta nova metodologia de classificação, sorovares patogênicos e saprófitas podem estar contidos dentro de uma mesma espécie genômica, e um mesmo sorovar, dependendo da cepa, pode fazer parte de mais de uma espécie genômica (BRENNER et al., 1999).

1.2 Sintomatologia da leptospirose

A penetração do microrganismo se dá pela pele lesada ou mucosa da boca, narinas e olhos, podendo também ocorrer através da pele íntegra, quando imersa em água por longo tempo (BHARADWAJ, 2004). As infecções por leptospiros podem ocorrer de forma assintomática ou com poucos sintomas. As manifestações clínicas, quando ocorrem, podem ser semelhantes a outras doenças virais e bacterianas, como influenza, dengue, febre tifóide, hepatite viral, infecções por

Rickettsia spp e outras. A forma leve da doença pode incluir febre de começo repentino, calafrios, cefaléia e mialgias (LEVETT, 2001).

Além disso, a leptospirose apresenta duas formas graves, a síndrome de Weil e a Síndrome Hemorrágica Pulmonar Severa (SPHS). A síndrome de Weil pode apresentar taxa de mortalidade de 10% e causa icterícia, falência hepática e renal. Já a SPHS possui taxa de mortalidade de mais de 50% e pode causar insuficiência respiratória, arritmias e estado mental alterado (DUPONT et al., 1997). Por ter sintomas parecidos com influenza, o paciente muitas vezes demora a procurar atendimento médico e, quando procura, é necessário que o diagnóstico confirmatório de leptospirose seja imediato para que o tratamento seja iniciado o mais rapidamente possível.

O curso clínico da leptospirose é caracterizado por um pequeno período de incubação (7-14 dias) seguindo duas fases clínicas distintas. A leptospiremia ocorre durante a primeira fase da doença e desaparece no final da primeira semana de leptospirose aguda. A segunda fase ou fase imune é caracterizada pela presença de anticorpos no soro e eliminação de espiroquetas na urina de indivíduos infectados (FAINE et al., 1999).

1.3 Diagnóstico laboratorial da leptospirose

O cultivo e isolamento do agente a partir do sangue, urina e tecidos de indivíduos doentes é o padrão ouro do diagnóstico laboratorial da leptospirose. Este método possui algumas limitações como, por exemplo, a necessidade de coletar-se a amostra de sangue antes da administração de antibióticos ao paciente. Apesar de o método apresentar um diagnóstico bastante confiável, os cultivos devem ser observados por pelo menos 16 semanas, já que o tempo necessário para o crescimento das leptospiros pode variar de 7 dias a várias semanas, de acordo com o sorovar infectante e o número inicial de bactérias viáveis (FAINE et al., 1999; SILVA et al., 2007).

O diagnóstico sorológico da leptospirose usualmente é feito através da demonstração de anticorpos contra leptospiros no soro através do teste de aglutinação microscópica (MAT) e de ensaios imunoenzimáticos. O MAT é o método

de referência para diagnóstico sorológico da leptospirose, sendo capaz de detectar anticorpos contra sorovares específicos, embora reações cruzadas possam ocorrer entre dois ou mais sorovares. Resultados falso-negativos podem ocorrer no MAT se houver ausência do sorovar causador da enfermidade na bateria de diagnóstico; o uso de soros pareados para verificação de soroconversão aumenta significativamente a sensibilidade e a especificidade do teste (WHO, 2003).

Ensaio imunoenzimático para detectar anticorpos anti-leptospiras em amostras biológicas, que utilizam como antígenos células inteiras ou proteínas recombinantes, estão disponíveis comercialmente ou em desenvolvimento. Por outro lado, a proteína da membrana externa LipL32, específica de leptospiras patogênicas (HAAKE et al., 2000), foi utilizada como antígeno em ELISA para o diagnóstico sorológico de leptospirose em caninos (DEY et al., 2004) e em bovinos (BOMFIM et al., 2005). Estes testes foram mais sensíveis e específicos do que a MAT.

O diagnóstico laboratorial indireto de doenças infecciosas, que se baseia na detecção dos anticorpos produzidos contra o agente infeccioso, tem a limitação de requerer um tempo de cerca de sete dias para que a concentração de anticorpos atinja um nível detectável (FAINE, 1999). A detecção direta de leptospiras em material clínico por microscopia de campo escuro é uma ferramenta que pode ser utilizada para o diagnóstico da leptospirose em laboratórios por técnicos especializados, porém esta não é uma técnica confiável já que outras espiroquetas podem estar presentes no material analisado (%) ou, mesmo tratando-se de leptospiras, pode ser que elas não ocasionem doença (WHO, 2003).

Imunoensaios também foram desenvolvidos para a detecção de leptospiras em amostras de origem clínica. Um radioimunoensaio (RIA) foi capaz de detectar 10^4 a 10^5 leptospiras/mL, enquanto um ELISA detectou 10^5 leptospiras/mL (ADLER, 1982). Outro RIA foi mais sensível do que microscopia de campo escuro, mas menos sensível do que o cultivo quando testado com urina de suínos para o diagnóstico da leptospirose (CHAPPEL, 1994/1995). Um ELISA sanduíche que usa anticorpos biotinilados foi capaz de detectar 10^4 leptospiras do sorovar Hardjo em urina bovina experimentalmente contaminada (10^6 /ml), mas foi menos sensível com outros sorovares (CHAMPAGNE et al., 1991). Um anticorpo anti-*L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae marcado com substância luminescente (WAITKINS, 1984), usado em ELISA para detectar leptospiras em sangue humano e urina, foi capaz de

detectar 10^5 e 10^6 células/ml, respectivamente (PALMER; HOOKEY, 1992). Um ensaio imunomagnético de captura de antígeno usado combinado à imunoensaio com substrato fluorescente, detectou 10^2 leptospiros/ml em urina de bovinos infectada com sorovar Hardjo (YAN et al., 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo utilizada experimentalmente na detecção de leptospiros (MÉRIEN et al, 1992; REITSTETTER, 2006; JOUGLARD et al., 2006), porém exige mão de obra especializada e infra-estrutura laboratorial específica, além de frequentemente sofrer a interferência de contaminantes e inibidores provenientes da amostra. Para eliminar estes problemas e concentrar as leptospiros presentes na urina de bovinos foi utilizada a separação imunomagnética com esferas cobertas com MAbs específicos para *L. interrogans* sorovar Hardjo (TAYLOR et al., 1997).

Evidencia-se assim a necessidade de desenvolver testes imunoquímicos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da leptospirose na fase inicial da doença. Estes testes certamente devem ser baseados na detecção de antígenos circulantes, uma vez que a detecção de anticorpos específicos apresenta baixa sensibilidade nesta fase. A descoberta recente de diversas proteínas de membrana externa, existentes apenas em leptospiros patogênicas, permite a obtenção de anticorpos específicos para uso nestes testes. Recentemente, foram produzidos diversos anticorpos monoclonais contra estas proteínas que poderão ser usados individualmente ou combinados, inclusive com anticorpos policlonais, no desenvolvimento dos testes (COUTINHO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; SEYFFERT, 2007).

1.4 Membrana externa de *Leptospira*

Por estarem expostas ao sistema imune dos indivíduos infectados, as estruturas da membrana externa das bactérias são alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico. O lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das leptospiros é atípico, diferindo do LPS de outras bactérias Gram-negativas em propriedades bioquímicas, físicas e biológicas (FAINE et al., 1999). Como o LPS é uma estrutura altamente imunogênica, inicialmente pensava-

se que ele era o único antígeno importante nas leptospiros e que estas estimulavam uma resposta protetora exclusivamente humoral (FAINE et al., 1999). Atualmente se sabe que também existem várias proteínas expostas na superfície da membrana que interagem com o sistema imune (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; CULLEN et al., 2005), e que embora o LPS continue sendo a estrutura mais imunogênica, não é a única a estimular respostas imunes. Além disso, o LPS gera uma resposta sorovar-específica e, assim, apresenta limitações quando utilizado como antígeno para detecção de anticorpos anti-leptospiros em testes sorológicos.

Visando o desenvolvimento de um teste diagnóstico que detecte antígenos circulantes, o conhecimento e a utilização de estruturas protéicas presentes na membrana externa das leptospiros para a produção dos anticorpos, tanto monoclonais como policlonais, é fator essencial para o sucesso do teste. Recentemente foram identificadas várias proteínas da membrana externa (OMPs) das leptospiros que são altamente imunogênicas. As OMPs de leptospiros foram divididas em 3 classes (CULLEN et al., 2003). A maior classe de OMPs é composta pelas lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL36, LipL48 e LipL41. LipL32 é uma proteína de 32kDa e é muito abundante em leptospiros patogênicas, não existindo em saprófitas (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; MATSUNAGA et al., 2005; CULLEN et al., 2005). Além de ser a proteína mais reconhecida pelo soro de pacientes infectados com leptospirose (HAAKE et al., 2000) ela possui atividade de hemolisina (HAUK et al., 2005).

As proteínas LipL41 e LipL21, também somente detectadas em sorovares patogênicos, e a LipL32, são expressas tanto durante a infecção quanto durante o cultivo em laboratório (CULLEN et al., 2003). Já a LipL36 está ancorada à face interna da membrana externa e somente é expressa *in vitro*, portanto não tem aplicação em testes de diagnóstico (HAAKE et al., 2000).

A segunda e terceira classes de proteínas são compostas por apenas um representante cada uma. A OmpL1 (segunda classe) é uma proteína transmembrana com função de porina, e a P31_{LipL45} (terceira classe) é uma proteína periférica da membrana que usa o canal de secreção das lipoproteínas para se lançar nas membranas interna e externa da bactéria (CULLEN et al., 2003).

Recentemente, uma quarta classe de proteínas de membrana foi descrita. Três proteínas foram identificadas nesta classe: Lig A (PALANIAPPAN et al., 2002),

Lig B e Lig C (MATSUNAGA et al., 2003). As Ligs (*leptospiral immunoglobulin-like proteins*) são proteínas com domínios repetidos em *tandem*, semelhantes às imunoglobulinas, e por isso foram assim denominadas (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). Este é um conjunto interessante de proteínas que por analogia com proteínas similares, como a intimina e a invasina existentes em outras bactérias (LUO et al., 2000; HAMBURGER et al., 1999), possuem funções de adesão e invasão celular (MATSUNAGA et al., 2003). Sua expressão ocorre principalmente *in vivo*, onde é estimulada pela osmolaridade sangüínea (MATSUNAGA et al., 2005), e é marcadamente atenuada após algum tempo em cultivo. As proteínas LigA e LigB estão expostas na superfície bacteriana e a expressão delas está correlacionada com a virulência das cepas de *Leptospira* (CHOY et al.; 2007).

O sistema imune dos pacientes infectados com leptospirose responde a essas proteínas de forma muito efetiva e, por isso, elas têm sido consideradas para uso no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, tanto para detecção de anticorpos (OKUDA et al., 2005; FLANNERY et al., 2001) como para a produção de anticorpos para uso em sua detecção (LÜDTKE et al., 2003; COUTINHO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; SEYFFERT, 2007).

1.5 Anticorpos Monoclonais

O anticorpo monoclonal (MAb) reconhece um único epítopo em um antígeno, este fato pode influenciar tanto positivamente quanto negativamente um teste de diagnóstico. A influência é positiva no que diz respeito à especificidade do teste que só reconhecerá antígeno que contém aquele epítopo; a influência negativa se dá em relação à sensibilidade do teste, que não será capaz de reconhecer variantes do mesmo antígeno ou se o epítopo for expresso em pouca quantidade na superfície do patógeno. Por outro lado, um anticorpo policlonal, por reconhecer vários determinantes antigênicos, geralmente apresenta um sinal mais forte em testes de diagnóstico, mas perde em especificidade (CAMPBELL, 1991).

A tecnologia de produção de MAbs foi desenvolvida na primeira metade da década de setenta (KOHLENER e MILSTEIN, 1975) e desde então os MAbs têm sido largamente empregados em métodos de diagnóstico (BERRY, 2005), como produtos

terapêuticos (CAMPBELL, 1991; BERRY, 2005) e como reagentes em pesquisa. Além disso, MAbs são muito úteis na identificação de epítomos ou proteínas para uso em vacinas recombinantes (BERRY, 2005).

O uso dos MAbs é justificado uma vez que os hibridomas que os produzem, originários da fusão de um linfócito B secretor de anticorpos com uma célula de mieloma múltiplo, possuem muitas vantagens em relação aos animais usados para obter os anticorpos policlonais. Hibridomas podem ser facilmente congelados, estocados e descongelados vários anos depois de sua obtenção sem alterações das suas características. A produção de MAbs também é vantajosa pelo fato de utilizar camundongos, que são de fácil manuseio quando comparados a animais maiores normalmente utilizados no preparo de soros policlonais. Anticorpos policlonais são inconstantes, no sentido de que as características dos anticorpos purificados refletem o exato momento no qual o sangue foi retirado do animal. Apesar de serem muito mais baratos e fáceis de obter (CAMPBELL, 1991).

Dessa maneira, os MAbs contra algumas proteínas da membrana externa de leptospiros patogênicos como LipL32 (LÜDTKE et al., 2003; FERNANDES et al., 2007), LigA e LigB (SEYFFERT, 2007) constituem uma importante ferramenta que pode facilitar o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos para leptospirose.

1.6 Anticorpos Policlonais (IgY)

As aves possuem três classes de imunoglobulinas que são análogas às imunoglobulinas dos mamíferos e que se denominam IgA, IgM e IgY. Anticorpos policlonais (IgY) produzidos em ovos de galinhas são uma interessante alternativa na produção de anticorpos. A IgY é uma imunoglobulina análoga à IgG dos mamíferos e é composta de duas cadeias leves e duas pesadas, estas últimas contêm um domínio variável e quatro domínios constantes. O peso molecular da IgY é de aproximadamente 167 kDa. O ponto isoelétrico varia entre 5,7 e 7,6. A IgY é transferida do sangue para o ovo através de um processo mediado por receptores específicos (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004).

A IgY apresenta várias vantagens quando comparada à IgG: sua produção é mais barata devido a alta concentração na gema do ovo, o animal que a produz

não precisa ser sacrificado, não apresenta reações cruzadas com os fatores reumatóides e heteroaglutininas do soro humano, não ativa o sistema complemento dos mamíferos e apresenta menor fluorescência inespecífica nas preparações imunofluorescentes . Além disso, a distância filogenética que separa os mamíferos das aves permite que se possa obter IgY contra proteínas altamente conservadas nos primeiros, e que seria difícil de produzir em coelhos, por exemplo. Finalmente, diversos estudos têm demonstrado que a IgY possui afinidade e sensibilidade similar a IgG dos mamíferos (CHACANA et al., 2004).

Devido a estas qualidades a IgY é um anticorpo que apresenta grande potencial para ser usado na padronização de testes imunológicos, principalmente quando for difícil a produção de anticorpos em mamíferos ou quando o formato do teste exige o emprego de anticorpos de diferentes espécies (CHACANA et al., 2004).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Desenvolver ELISA de captura de antígeno para o diagnóstico laboratorial da leptospirose baseado em anticorpos policlonais e monoclonais contra leptospiros patogênicas.

2.2 Específicos

- Produzir anticorpos policlonais (IgY) utilizando células inteiras de um sorovar patogênico de *Leptospira*, para uso em ELISA de captura de antígeno.
- Padronizar diferentes formatos de ELISA de captura de antígeno utilizando a IgY e anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de leptospiros patogênicas.
- Determinar o limite de detecção de leptospiros nos diferentes formatos de ELISA padronizados, utilizando soros experimentalmente contaminados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo de Leptospiras

As cepas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1 130 (KO et al., 1999) e *L. biflexa* sorovar Patoc utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Centro de Biotecnologia (Cenbiot) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As bactérias foram cultivadas em caldo EMJH (meio Ellinghausen e McCullough modificado por Johnson e Harris) (Difco Laboratories, USA) por 6 a 7 dias em estufa bacteriológica com temperatura entre 28 e 29°C (FAINE, 1999). Após atingir a densidade de 1 a 2 x 10⁸ leptospiras/mL, verificada por contagem em câmara de Petroff-Hauser (Thomas Scientific), os cultivos foram centrifugados a 13.000rpm durante 30 minutos, as células foram ressuspensas em PBS (tampão fosfato salino) estéril, de forma a obter 1x10⁸ leptospiras/mL e inativadas a 56°C por 16-18 h (SURUJBALLI; ELMGREN, 2000).

3.2 Produção de IgY

Um cultivo de *L. interrogans* L1 130, com densidade de 1x10⁸ células/mL, foi inativado por calor e utilizado para imunizar via intramuscular duas galinhas poedeiras da raça White Leghorn com 22 semanas de idade. O protocolo de imunização incluiu uma injeção inicial de 125 µl do cultivo inativado + 125 µl de adjuvante de Freund completo e, após 15, 30 e 45 dias, a repetição de injeções da mesma quantidade de cultivo em adjuvante de Freund incompleto. A coleta dos ovos foi iniciada no terceiro dia após a última dose e se prolongou por 30 dias. Os ovos foram mantidos refrigerados a 4°C até serem utilizados para purificação da IgY pelo

método descrito por Akita e Nakai (1993) (Apêndice I). A concentração de IgY na preparação final foi determinada por espectrofotometria a 280nm, utilizando o valor 1,36 como coeficiente de extinção (CARLANDER, 2002). A pureza das preparações foi investigada por SDS-PAGE (Apêndice III-a), usando acrilamida a 10%, e a reatividade da IgY com *L. interrogans* L1 130 e *L. biflexa* Patoc foi verificada através de ELISA indireto (Apêndice II) e Western blot (Apêndice III-b).

3.3 Anticorpos monoclonais

MAbs específicos para as proteínas LipL32, LigA e LigB da membrana externa de leptospiros patogênicas, produzidos no Laboratório de Imunologia Aplicada do Cenbiot-UFPEL (LÜDTKE et al., 2003; FERNANDES et al., 2007; SEYFFERT, 2007), foram também utilizados no ELISA de captura de antígeno. Os MAbs foram selecionados com base nos índices de aditividade (IA) obtidos a partir de um ELISA competitivo que utiliza células inteiras de leptospiros como antígeno, uma adaptação do método originalmente descrito para mapear epítomos em antígenos puros (FRIGUET et al., 1983). Neste método inicialmente é determinada a curva de saturação de uma quantidade fixa de antígeno (1×10^7 leptospiros/poço) com cada MAb em ELISA indireto. A seguir, é feita a competição dos MAbs pareados, em diluições de saturação, pelo antígeno fixado na placa de ELISA. O resultado obtido neste último ELISA foi analisado de acordo com a fórmula $\{[2A_{1+2}/(A_1+A_2)]-1\} \times 100$, onde A1, A2 e A₁₊₂ são, respectivamente, os valores de absorbância do MAb 1 testado individualmente, do MAb 2 testado individualmente e dos dois MAbs testados juntos.

3.4 Biotinilação de anticorpos

A IgY e um Mab anti-LipL32(1D9) foram conjugados com biotina usando o método descrito por NERURKAR et al. (1994). Inicialmente, 1mg de imunoglobulina foi dissolvido em 1mL de PBS 0,15M; pH 7,2 e clarificado por centrifugação a 4000g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra bicarbonato de sódio (0,1M; pH 8,2) por 16h a 4°C, novamente clarificado e misturado com 1mL de uma

preparação recente de N-hidroxy succinimidobiotin em DMSO (dimetilsulfóxido) (1mg/mL). A mistura foi agitada gentilmente a temperatura ambiente por 4h e, após, foi dialisada contra PBS por 16h. Nova clarificação por centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi estocado a - 20°C. O grau de biotinilação dos anticorpos (moléculas de biotina por molécula de anticorpo) foi determinado através do EZ Biotin Quantitation Kit (Pierce, Rockford, USA). Os dois tipos de anticorpos biotinilados foram então titulados em ELISA indireto usando como antígeno leptospiros inativadas (Apêndice IV) ou proteína recombinante (Apêndice V).

3.5 ELISA de captura de antígeno

Foram padronizados três formatos de ELISA de captura com as seguintes diferenças fundamentais:

- Formato A: Anticorpo de captura MAb 1D9 (anti-LipL32), anticorpo de detecção IgY, e conjugado de imunoglobulina de coelho anti-IgY peroxidase (Sigma, EUA) (Apêndice VI).
- Formato B: Anticorpo de captura MAb 1D9, anticorpo de detecção IgY biotinilado e conjugado streptavidina-peroxidase (Apêndice VII).
- Formato C: Anticorpo de captura MAb 1B12 e 3D10 (anti-LigA e anti-Lig B), anticorpo de detecção MAb 1D9 biotinilado e conjugado streptavidina-peroxidase (Apêndice VIII).

A concentração adequada dos conjugados e dos anticorpos de captura e de detecção utilizados em cada formato foi determinada através de titulação em *checkerboard*, usando como antígenos cultivos inativados por calor das leptospiros Fiocruz L1 130 e Patoc na concentração de 10^8 células/mL. Nos três formatos de ELISA foram utilizados volumes de reagentes de 100µL e incubações de 1h na temperatura ambiente em cada etapa. A etapa de sensibilização das placas de ELISA (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) com o anticorpo de captura foi realizada a 4° C por 16h, seguida de bloqueio com BSA 0,5% em PBS. Todos os reagentes foram diluídos em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), e entre as

diversas etapas dos ensaios foram realizadas 3 lavagens das placas com PBS-T, exceto após a etapa de reação do conjugado em que foram feitas 5 lavagens. A solução cromógena utilizada para revelar a presença da enzima foi constituída de ortofenilenodiamina (2mg/mL) e peróxido de hidrogênio (5%) em tampão fosfato citrato (0,2M, pH 4,0). A reação enzimática ocorreu no escuro por 15 minutos, ao fim dos quais a placa foi lida a 450nm em um leitor de ELISA (Titertek Multiscan MCC/340).

3.6 Limite de detecção

Para a determinação do limite de detecção dos três formatos de ELISA padronizados foram utilizados cultivos de *L. interrogans* L1 130 inativados por calor (56°C/14h). Os cultivos foram diluídos em base 2 em PBS e em um *pool* de soros de indivíduos sadios (negativos na MAT).

4 RESULTADOS

4.1 Produção de IgY

O rendimento de IgY por gema de ovo ficou em 31,7mg (média de 3 purificações). A pureza das preparações foi investigada por eletroforese em SDS-PAGE, sendo observadas bandas com peso molecular de 67kDa e 25kDa (condições redutoras) e de 167kDa (condições não redutoras) correspondentes à IgY (Fig. 1).

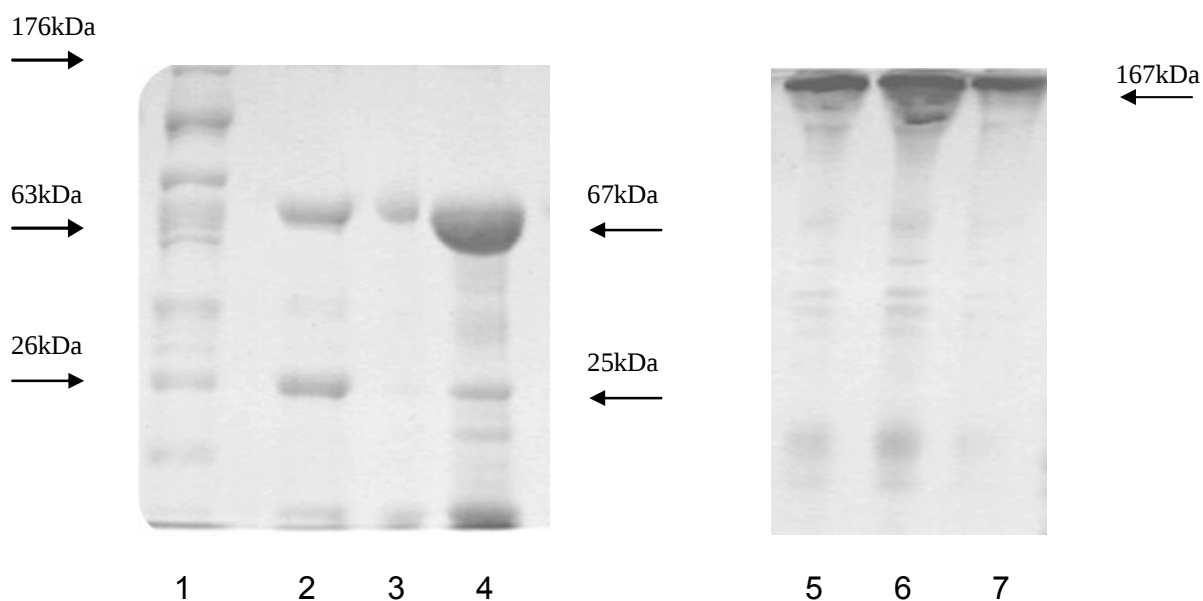


Figura 1 - Avaliação da pureza de diferentes purificações de IgY por SDS-PAGE. Linha 1- marcadores de peso molecular; linhas 2,3,4- preparações de IgY em condições redutoras; linhas 5,6,7,8- preparações de IgY em condições não redutoras.

Nos demais testes de avaliação das preparações foi verificado, inicialmente através de ELISA indireto, que a IgY produzida reagiu com a mesma intensidade tanto com a *Leptospira* patogênica como com a saprófita (Fig. 2). O perfil de reatividade antigênica das duas leptospirosas com a IgY, investigado por Western blot, também foi bastante similar (Fig. 3)

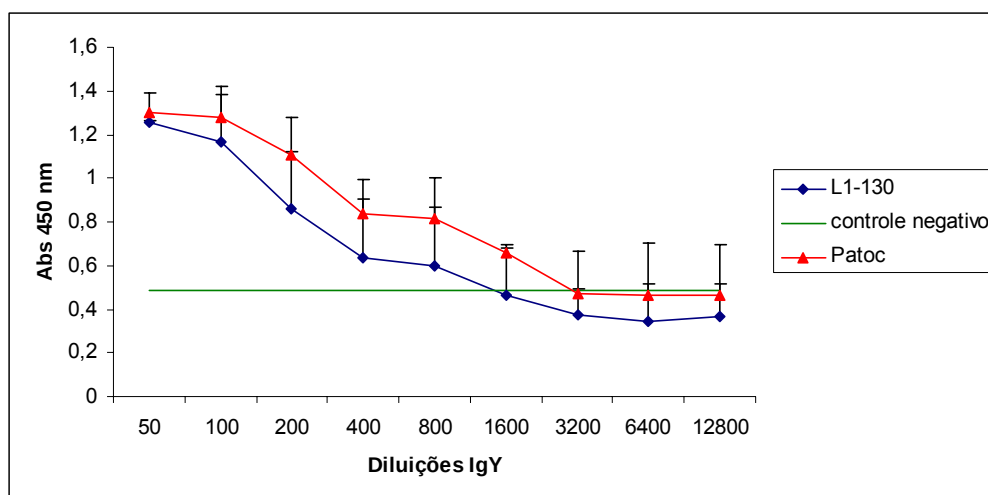


Figura 2 - Reatividade da IgY com leptospirosas patogênicas e saprófitas em ELISA indireto. Valores médios de resultados obtidos com 3 preparações. Concentração/cavidade= 10^7 leptospirosas. Conjugado= Ig de coelho anti-IgY-peroxidase diluído 1:2000. Controle negativo (sem leptospirosas): Abs=0,436.

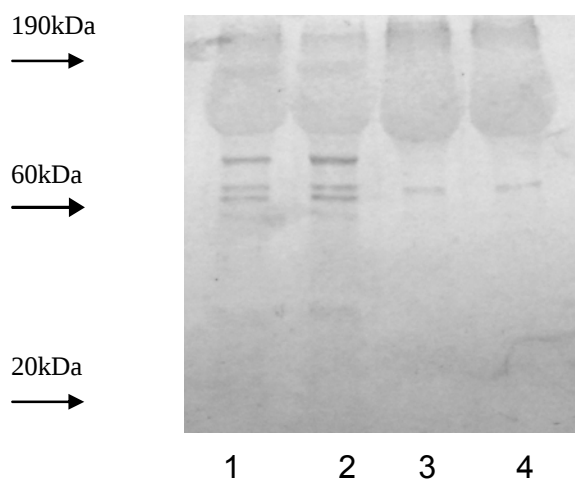


Figura 3 - Perfil da reatividade antigênica das leptospirosas patogênicas e saprófitas com IgY em Western blot. Linha 1, 2 - *L. biflexa* sorovar Patoc; linhas 3, 4 - *L. interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1 130.

4.2 Índices de aditividade dos anticorpos monoclonais

Para determinar os índices de aditividade com vistas a sua seleção para uso no ELISA de captura de antígeno, os MAb's disponíveis contra as proteínas de membrana externa LipL32 (1D9), LigA (1B12, 1C7, 1B4, 1D1) e LigB (3D10, 1G7, 5F12, 3E4, 3F12, 4C2), foram testados pareados em um ELISA competitivo com células inteiras de *L. interrogans* L1 130 como antígeno. Este índice fornece informações sobre como a reação de um MAb com um antígeno é afetada pela reação de outro MAb. Os melhores índices de aditividade foram obtidos com os MAb's 3D10, 1B12, 1B4 e 1D9 (Tab.1). Embora o MAb 1B4 tenha mostrado boa aditividade com 3D10 ele não apresentou boa estabilidade na armazenagem refrigerada ou congelada e, por isso, seu uso foi descontinuado. Assim, foram selecionados para uso no ELISA os MAb's 1D9, 1B12 e 3D10.

Tabela 1 - Índices de aditividade (%) de anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa específicas de leptospiros patogênicas^a.

MAb (Proteína)	1B12 (LigA)	1C7 (LigA)	1B4 (LigA)	1D1 (LigA)	1D9 (LipL32)
3D10 (LigB)	46	28	36	20	148
1G7 (LigB)	25	27	32	18	NR
5F12 (LigB)	31	17	29	12	NR
3E4 (LigB)	20	21	27	11	NR
3F12 (LigB)	30	2	27	6	NR
4C2 (LigB)	17	13	31	28	NR
1B4 (LigA)	NR	NR	NR	NR	45

^a ELISA competitivo com *L. interrogans* L1 130 como antígeno. Resultado são médias de 3 experimentos independentes. NR= não realizado.

4.3 Biotinilação de anticorpos

O processo de biotinilação da IgY e do MAb 1D9 foi eficaz e o número de moléculas de biotina por molécula de anticorpo ficou em 0,87 e 2,81, respectivamente. A titulação dos anticorpos biotinilados em ELISA indireto com os antígenos correspondentes indicou que a IgY pode ser diluída 1:8000 (Fig. 4) e o MAb 1D9 1:2000 (Fig. 5) para uso no ELISA de captura de antígeno.

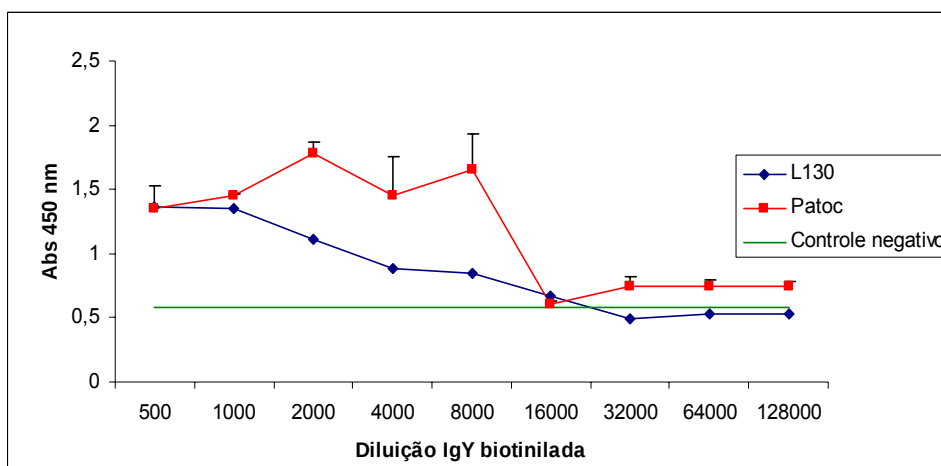


Figura 4 - Reatividade da preparação de IgY biotinilada com leptospiros patogênicos e saprófitas em ELISA indireto. Valores médios de resultados obtidos com 3 preparações. Concentração/cavidade= 10^7 leptospiros. Conjugado streptavidina-peroxidase diluído 1:1500. Controle negativo (sem leptospiros): Abs= 0,618.

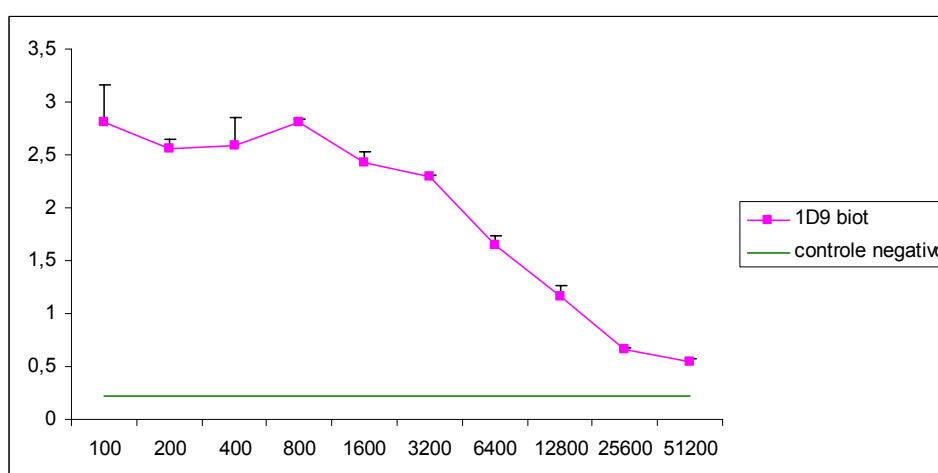


Figura 5 - Reatividade do MAb 1D9 biotinilado com LipL32 recombinante em ELISA indireto. Valores médios de resultados obtidos em duas titulações. LipL32/cavidade= 0,3 μ g. Conjugado= streptavidina-peroxidase diluído 1:1500. Controle negativo (BSA)= Abs 0,214.

4.4 ELISA de captura de antígeno

Foram testados três formatos diferentes de ELISA de captura de antígeno na tentativa de identificar aquele capaz de detectar o menor número de leptospiros no sangue de indivíduos com suspeita de leptospirose.

No formato A (Apêndice VI), que utilizou o MAb 1D9 (anti-LipL32) como anticorpo de captura e a IgY como anticorpo de detecção, o limite de detecção ficou em 10^6 - 10^7 leptospiros/mL em PBS ou soro humano (Fig. 6).

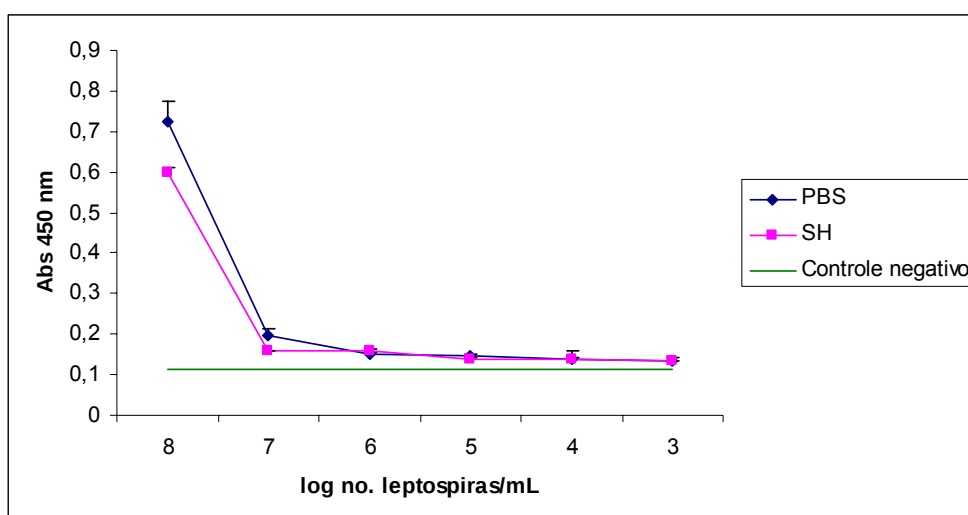


Figura 6 - Limite de detecção de *L. interrogans* L1 130 no ELISA de captura de antígeno usando MAb anti-LipL32 na captura e IgY na detecção. Anticorpo de captura= 0,2µg/cavidade. Anticorpo de detecção= diluído 1:300. Absorbâncias dos controles negativos com *L. biflexa* Patoc (10^8 células/mL): Soro=0,108; PBS=0,095. Resultados são médias de três experimentos independentes.

O formato B (Apêndice VII), que utilizou o MAb 1D9 (anti-LipL32) como anticorpo de captura e a IgY biotinilada como anticorpo de detecção, foi capaz de detectar entre 10^6 e 10^5 leptospiros/mL em PBS ou soro humano (Fig. 7).

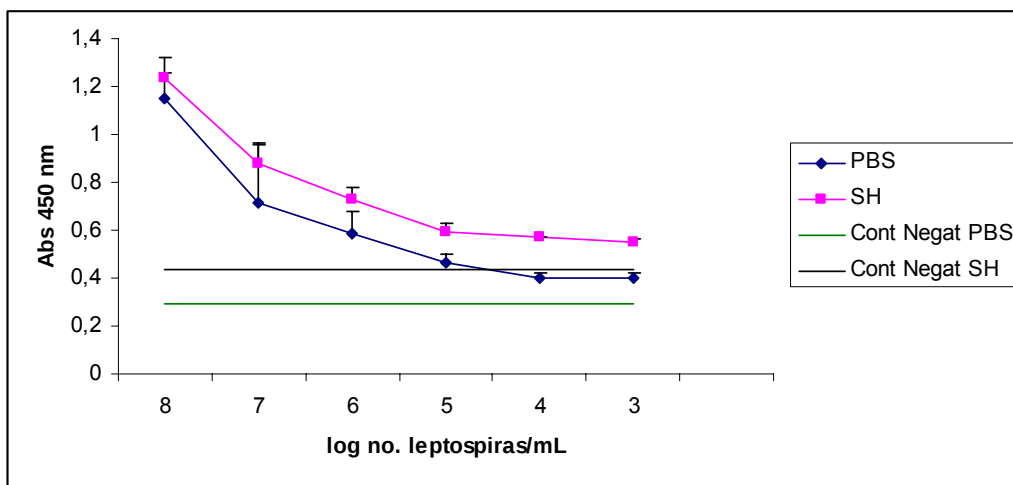


Figura 7 - Limite de detecção de *L. interrogans* L1 130 no ELISA de captura de antígeno usando MAb anti-LipL32 na captura e IgY biotinilada na detecção. Anticorpo de captura= 0,2µg/cavidade. Anticorpo de detecção= diluído 1:8000. Absorbâncias dos controles negativos com *L. biflexa* Patoc (10^8 células/mL): Soro=0,435; PBS=0,290. Resultados são médias de três experimentos independentes.

O formato C (Apêndice VIII), que utilizou os MAbs 1B4 (anti-LigA) e 3D10 1D9 (anti-LigB) como anticorpos de captura e o MAb 1D9 (anti-LipL32) biotinilado como anticorpo de detecção, detectou entre 10^6 e 10^7 leptospiros/mL em PBS ou soro humano (Fig. 8).

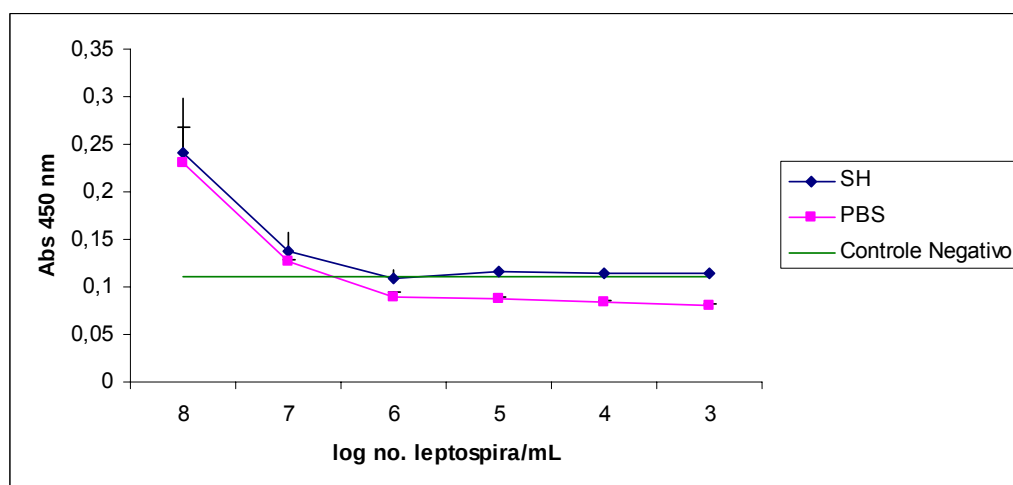


Figura 8 - Limite de detecção de *L. interrogans* L1 130 no ELISA de captura de antígeno usando MAb anti-LigA e LigB na captura e MAb 1D9 biotinilado na detecção. Anticorpos de captura= 0,2µg/cavidade. Anticorpo de detecção= diluído 1:2000. Absorbâncias dos controles negativos com *L. biflexa* Patoc (10^8 células/mL): Soro= 0,111; PBS=0,084. Resultados são médias de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico da leptospirose é complicado porque as leptospiras podem afetar uma grande variedade de órgãos, resultando em diversas formas de apresentação que vão desde infecções sub-clínicas até as que levam a falha renal aguda e hemorragia pulmonar (FAINE et al, 1999). Por isso, o diagnóstico laboratorial da leptospirose é extremamente importante, especialmente na fase inicial da doença, para que se inicie o mais cedo possível o tratamento com antibiótico específico que assegure um prognóstico favorável.

O diagnóstico laboratorial da leptospirose usualmente se baseia na demonstração de anticorpos no soro sangüíneo através de ensaios como MAT ou ELISA. Em geral, estes ensaios diagnósticos têm baixa sensibilidade na fase inicial das infecções porque há necessidade de um período, cerca de 10 dias, para que a resposta imune seja montada e uma concentração detectável de anticorpos seja atingida no soro (FAINE et al, 1999). Neste período as leptospiras encontram-se circulando no sangue e sua detecção através de imunoensaios é uma alternativa que deve ser investigada para o diagnóstico precoce da leptospirose.

Neste trabalho foram testados três formatos distintos (A, B e C) de ELISA de captura de antígeno para detecção de leptospiras em soro humano experimentalmente contaminado. O formato A utilizou como anticorpo de detecção um anticorpo policlonal (IgY) obtido a partir de galinhas imunizadas com uma cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A IgY foi escolhida porque não apresenta reações cruzadas com anticorpos de mamíferos, interferindo assim pouco nos ensaios, além de acumular-se em grande quantidade na gema do ovo de onde pode ser facilmente purificada (CARLANDER, 2002). O rendimento médio da IgY produzida (31,7mg/gema) foi similar ao citado em outros trabalhos (CARLANDER, WILHELMSON, LARSSON, 2001; CARLANDER, WILHELMSON, LARSSON, 2002),

e o processo de purificação utilizado permitiu a obtenção de um anticorpo com um grau de pureza adequado. No entanto, foi verificado em ELISA indireto e Western blot que o perfil de reatividade da IgY com as leptospiros usadas na imunização e com outra saprófita foi muito similar. Este resultado era esperado uma vez que as leptospiros, independente de serem patogênicas, possuem muitas estruturas imunogênicas similares na sua superfície, entre elas o LPS, que geram anticorpos que reagem cruzadamente (FAINE et al., 1999). Para solucionar este problema geralmente se adsorve o soro com o organismo que apresenta reação cruzada a fim de remover os anticorpos contra antígenos comuns (GARVEY, CREMER, SUSSDORF, 1977). Porém, esta é uma prática bastante trabalhosa e que nem sempre produz o resultado esperado, sendo assim decidiu-se usar a IgY apenas como anticorpo de detecção. Como anticorpo de captura foi utilizado o MAb 1D9, um anticorpo que possui uma alta afinidade por LipL32 (COUTINHO et al., 2007), a proteína de membrana externa mais abundante nas espécies patogênicas de *Leptospira*. A utilização deste MAb tornou o ensaio altamente específico mesmo com o uso da IgY como segundo anticorpo, e permitiu a detecção de cerca de 10^6 leptospiros por mililitro de soro. O nível de detecção deste ELISA, contudo, não é aceitável uma vez que nas formas leves de leptospirose a densidade de leptospiros no sangue é de 10^3 - 10^4 por mililitro (TRUCCOLO et al., 2001).

O formato B foi padronizado com o objetivo de melhorar a sensibilidade do ELISA. Este formato utilizou a IgY biotinilada, juntamente com um conjugado estreptavidina-peroxidase, numa tentativa de aumentar a quantidade de enzima no complexo antígeno-anticorpo e, assim, amplificar o sinal do produto da reação enzimática. Esta estratégia já foi usada para aumentar a sensibilidade de uma variedade de ensaios imunoquímicos e moleculares com sucesso (ZHOU, 2001; KITTIGUL et al., 1998) porque a estreptavidina possui quatro sítios de ligação com alta afinidade pela biotina e esta, por sua vez, pode ser facilmente conjugada à proteínas e ácidos nucleicos para atuar como marcador (BURNS, 2005). O processo de biotinilação utilizado foi capaz de adicionar cerca de 1 molécula de biotina por molécula de IgY, configurando um resultado pouco eficiente em comparação com o recomendado que é de 3 a 8 moléculas (BURNS, 2005). Embora tenha aumentado o sinal da reação enzimática e o limite de detecção tenha melhorado neste formato de ELISA, ficando em 10^5 leptospiros por mililitro de soro (reduziu 1 log), ele não atingiu

ainda o nível de leptospiras encontradas no sangue nas formas leves de leptospirose. A utilização de uma IgY com um maior número de moléculas de biotina poderá tornar este formato de ELISA capaz de atingir o limite de detecção adequado para uso na fase inicial da leptospirose.

A disponibilidade de um painel de MAbS contra LigA, LigB e LipL32, proteínas da membrana externa de leptospiras patogênicas, levou-nos a padronização de um terceiro formato de ELISA de captura de antígeno (formato C). Com base nos índices de aditividade, que fornece informações sobre a interferência que a reação de um MAb com seu antígeno exerce sobre a reação de outro MAb (COUTINHO et al., 2007), foram selecionados para uso no ELISA os MAbS 1B12 (LigA), 3D10 (LigB) e 1D9 (LipL32). Os MAbS 1B12 e 3D10 foram utilizados como anticorpos de captura e o 1D9, por ser dirigido contra LipL32, a proteína de membrana externa mais abundante, foi utilizado como anticorpo de detecção. O MAb 1D9 foi marcado com biotina para usar o sistema streptavidina-biotina na revelação do complexo antígeno-anticorpo. Embora a biotinação do MAb tenha sido mais eficiente do que a da IgY, obteve-se cerca de 3 moléculas de biotina por molécula de anticorpo, o limite de detecção deste ELISA foi de 10^6 a 10^7 leptospiras por mililitro de soro, o mais alto entre os três formatos padronizados. A baixa sensibilidade deste formato é provavelmente devida à menor concentração de anticorpo de detecção retido na superfície da bactéria. É sabido que ELISAs no formato sanduíche, ou duplo sítio, que usam MAbS como anticorpo de detecção geralmente são menos sensíveis do que aqueles que usam soros policlonais, uma vez que perdem efeito de amplificação da reação final produzido pelo último (CROWTHER, 2001). A melhoria da sensibilidade de ELISA de captura de antígeno baseado em MAbS pode também ser obtida usando na detecção uma mistura de MAbS contra diferentes antígenos.

O desenvolvimento de testes mais sensíveis para o diagnóstico laboratorial precoce da leptospirose tem se baseado principalmente em ensaios de detecção de IgM, usando como antígenos células inteiras ou proteínas recombinantes (SEHGAL et al., 1999; FLANNERY et al., 2001; McBRIDE et al., 2005), e em ensaios de PCR usando diferentes genes como alvo da amplificação (REITSTETTER, 2006; JOUGLARD et al., 2006). No entanto, a maioria dos ensaios de IgM propostos possuem baixa sensibilidade (<50%) na fase inicial da doença, enquanto o ensaio de

PCR, embora altamente sensível, requer laboratório adequadamente equipado, o que os torna não apropriados para a rotina dos laboratórios das regiões onde a leptospirose é mais prevalente. A abordagem de detecção de antígenos leptospirais diretamente em fluídos biológicos (soro sanguíneo) através de um ELISA de captura de antígeno investigada neste trabalho mostrou potencial para chegar a um teste sensível para uso na fase inicial da doença. O formato B, com MAbs na captura e IgY biotinilada na detecção, pode ser aperfeiçoado para atingir o limite de detecção adequado através do uso de uma variedade maior de MAbs para captura, uma IgY com maior grau de biotinilação ou ainda o uso proteína A para exposição mais efetiva das porções ligantes dos anticorpos monoclonais usados na captura do antígeno.

6 CONCLUSÕES

- IgY policlonal contra *Leptospira* spp. produzida, foi purificada e quantificada para uso como anticorpo de detecção em ELISA de captura de antígeno para o diagnóstico de leptospirose.
- Dentre os três formatos de ELISA de captura de antígeno padronizados para uso no diagnóstico precoce de leptospirose, o que usa um anticorpo monoclonal específico para leptospirosas patogênicas na captura e IgY biotinizada na detecção foi o que apresentou melhor desempenho.
- Os três formatos de ELISA de captura testados apresentaram limites de detecção de leptospirosas em soro humano, experimentalmente contaminado, não adequados para uso em diagnóstico precoce da leptospirose.

7 REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; FAINE, S. Evidence that leptospiral lipopolysaccharide is not an important protective antigen. **Journal Medical Microbiology**, v. 15, p. 259-262, 1982.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal Immunological Methods**, v. 160, p. 207-214, 1993.
- BERRY, J. D. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 193-211, 2005.
- BHARADWAJ, R. Leptospirosis - a Reemerging Disease? **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 136-138, 2004.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.
- BOMFIM, M. R.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 89-94, 2005.
- BOLIN, C. A.; KOELLNER, P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. **The Journal of Infectious Diseases**, v.158, n.1, p. 246-247, 1988.
- BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S.. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839-858. 1999.
- BURNS, R. **Immunochemical protocols**, Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005, 317p.
- CAMPBELL, A. M.; **Monoclonal and Immunosensor Technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991, 427p.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody *in vitro* and *in vivo*** Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala Sweden. 2002. 53f. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Medicine) in Clinical Chemistry , Uppsala University.

CARLANDER, D.; WILHELMSON, M.; LARSSON, A. Limited day to day variation of IgY levels in eggs from individual laying hens. **Food Agriculture Immunology**, v.13, p. 87-92, 2001.

CHAPPEL, R. J.; ADLER, B.; BALLARD S. A.; FAINE, S.; JONES, R. T.; MILLAR, B. D. and SWAINGER, J. A. Enzymatic radioimmunoassay for detecting *Leptospira interrogans* serovar pomona in the urine of experimentally-infected pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 10, p.270-286, 1984/85.

CARLANDER, D.; WILHELMSON, M.; LARSSON, A. Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, v.1119, p.1-15, 2002.

CHACANA, P.A.; TERZOLO, H. R.; CALZADO, E. G.; SCADE, R. Tecnologia IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina **Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)**, v. 85, n.5, p. 179-189, 2004.

CHAMPAGNE, M. J.; HIGGINS, R.; FAIRBROTHER, J. M.; DUBREUIL, D. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. **Canadian Journal of Veterinary Research**, n. 55, p. 239-245. 1991.

CHOY, H. A.; KELLEY, T. CHEN, L.; MOLLER, A.; K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441- 2450, 2007.

COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; FERNANDES, C. P. H.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; HAAKE, D. A.; KO A. I.; DELLAGOSTIN O. A.; ALEIXO, J. A. G. Evaluation of the anti-LipL32 monoclonal antibodies potential for use in leptospirosis immunodiagnostic tests. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v. 28, n. 3, p. 279 -288, 2007.

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**, v. 149. New Jersey: Human Press, 2001, 413p.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v. 71, n.5, p. 2414 – 2421, 2003.

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

CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.; ADLER, B. . Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4853 – 4863, 2005.

DEY, S; MOHANA, C. M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A. M.; NACHIMUTHUB K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.103, p. 99–106, 2004.

DUPONT, H.; DUPONT-PERDRIZET, D.; PERIE, J. L.; ZEHNER-HANSEN, S.; JARRIGE, B.; DAIJARDIM, J.B.; Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. **Clinical and Infectious Disease**, v. 25, n.3, p. 720 – 724, 1997.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira* and Leptospirosis**. 2.ed., Melbourne , Austrália: MedSci, 1999, 272p.

FERNANDES, C. P. H.; SEIXAS F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; McBRIDE, A. J.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal Antibodies Against LipL32, the Major Outer Membrane Protein of Pathogenic *Leptospira*: Production, Characterization, and Testing in Diagnostic Applications. **Hybridoma**, v. 26, n. 1, 2007.

FLANNERY, B. ; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3303 – 3310, 2001.

FREIRE, R. B.; FREIRE, M. F. I.; BERBARA, R. L. Elisa de captura com IgY para quantificação de acetato de lupeol em *Vernonia scorpioides* lam. Pers (asteraceae). **Ciência Rural (Santa Maria)**, v. 34, n. 4, p. 1069-1074, 2004.

FRIGUET, B.; DJAVADI-OHANIAN, L.; PAGES, J.; BUSSARD, A.; GOLDBERG, M. E.. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the β -subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. **Journal of Immunological Methods**, v.60, p. 351-358,1983.

GARVEY, J. S.; CREMER, N. E.; SUSSDORF, D. H.; **Methods in Immunology**, 3ed. Reading, USA: W. A. Benjamin, Inc, 1977, 545p.

HAAKE, D.A.; CHAO, G.; ZUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P.N.; BOLIN, C. A.. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 is a Lipoprotein Expressed During Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2276-2285, 2000.

HAMBURGER, Z. A., BROWN, M. S., ISBERG, R. R., BJORKMAN, P. J. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. **Science**, v. 286, p. 291-295, 1999.

HAUK, P.; NEGROTTO, S.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A. ; GENOVEZ M. E. ; WARD R. J.; SCHATTONER M. ; GOMÉZ R. M.; HO P. L.; Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p.1341–1347, 2005.

JOUGLARD, S. D. D.; SIMIONATTO, S.; SEIXAS, F. K.; NASSI, F. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires **Canadian Journal Microbiology**, v. 52, p. 747-752, 2006.

KITTIGUL, L.; SUTHACHANA, S.; KITTIGUL, C.; PENGGRUANGROJANACHAI, V. Immunoglobulin M-capture Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** v. 59, n. 3, p. 352-356, 1998.

KO, A.I.; REIS, M.G.; DOURADO, C.M.R.; JOHNSON, W.D.; RILEY, L.W.; and the Salvador Leptospirosis study group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature** p. 256 – 495, 1975.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LÜDTKE, C. B.; COUTINHO, M. L.; JOUGLARD, S. D. D.; MOREIRA, C. N.; FERNANDES, C. P. H.; BROD, C. S.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal antibodies against an outer membrane protein from pathogenic *Leptospira*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 1-4, 2003.

LUO, Y.; FREY, E. A.; PFUETZNER, R. A.; CREAGH, A. L.; KNOECHEL, D. G.; HAYNES, C. A. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, p. 1073-1077, 2000.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 49, p. 929–945, 2003.

MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X.; HAAKE, D.. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins Lig A and Lig B and the extracellular release of Lig A. **Infection and Immunity**, v.1, n. 73, p. 70-78, 2005.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRON, I. S.. Polymerase Chain. Reaction for Detection of *Leptospira* spp in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.9, p. 2219-2224, 1992.

McBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, p. 376-386, 2005.

MOREY, R. E.; GALLOWAY R. L.; BRAGG S. L.; STEIGERWALT A. G.; MAYER L. W.; LEVETT P. N. Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA Gene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10 , p. 000, 2006.

NERURKAR, L. S.; NAMBA, M.; BRASHEARS, G.; JACOB, A. J.; LEE, Y. J.; SEVER, J. L. Rapid Detection of Herpes Simplex Virus in Clinical Specimens by Use of a Capture Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbente Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 1,, p. 109-114, 1984.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis**, Surveillance and Control. Malta, WHO Library , 2003(2004).

OKUDA, M.; SAKAI, Y.; MATSUUCHI, M.; OIKAWA, T.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; IWATA, H.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; ONISHI, T.; INOKUMA, H.. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 3, p. 249-254, 2005.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.; JUSUF, S. S. D.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSOM, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic Lig A protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 70, p. 5924-5930, 2002.

PALMER, M.; HOOKEY J. The chemiluminescent detection of leptospiral antigen. **Zentralblatt Fur Bakteriologie**, v. 277, n. 3, p. 300-308, 1992.

REITSTETTER, R. E. Development species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 31–39, 2006.

SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SUGUNAN, A. P. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n.2, p. 161-164, 1999.

SEYFFERT, N. **Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e LigB de leptospiros patogênicas: produção e caracterização**, Brasil. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SINAN (SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO). Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>

SILVA E. F.; BROD C. S.; CERQUEIRA G.M.; BOURSCHEIDT D.; SEYFFERT N.; QUEIROZ A.; SANTOS C. S.; KO A. I.; DELLAGOSTIN O. A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology**, v.121, p. 144–149, 2007.

SURUJBALLI, O.; ELMGREN, C.; Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 149-159, 2000.

TAYLOR, M.J.; ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.M.; YAN, K.T.; MCDOWELL, S.W.J.; MACKIE, D.P.; Magnetic immuno capture PCR assay (MIPA): detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 135-145, 1997.

TRUCCOLO, J.; SERAIS, O. L.; MERIEN, F.; PEROLAT P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 317-321, 2001.

VINETZ, J. M.; GLASS, G. E.; FLEXNER, C. E.; MUELLER, P.; KASLOW, D. C. Sporadic urban leptospirosis. **Annual International Medicine**, v. 25, p. 794-798, 1996.

WHO. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. **World Health Organization**, 2003, 109p.

YAN, K.-T.; ELLIS W. A., MONTGOMERY J. M.; TAYLOR M. J.; MACKIE D. P.; J. MCDOWELL S. W. Development of an immunomagnetic antigen capture system for detecting leptospires in bovine urine. **Research in Veterinary Science**, v. 64, p.119-124,1998.

ZHOU, E. M.; RIDD, D.; RIVA, J.; FERNANDO, L.; CLAVIJO, A.. Development and evaluation of na IgM-capture ELISA for detection of recent infection with bluetongue viruses in cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 91, n. 2, p. 175-182, 2001.

APÊNDICE I

PURIFICAÇÃO DE IGY

- 1- A gema (10mL) foi separada da clara, manualmente, diluída 1:10 com água destilada e colocada a 4°C por 6 horas, sob agitação.
- 2- Após a incubação, a preparação foi centrifugada por 25 min a 4°C a 1000g para remoção de grânulos e lipídeos.
- 3- O sobrenadante foi recolhido, foi adicionado 19% (p/v) de sulfato de sódio e mantido por 2 horas a temperatura ambiente (TA).
- 4- A mistura foi centrifugada a 20°C por 30 min a 3000g.
- 5- O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em TRIS-HCl 60 mM pH 8,0 (aproximadamente 10 mL/gema); foi adicionado 14% (p/v) de sulfato de sódio e incubado por 2 h a TA.
- 6- A preparação foi centrifugada a 20°C por 30 min a 3000g.
- 7- O precipitado foi ressuspendido em PBS pH 7,4 (5mL/gema) e dialisado contra o mesmo.
- 8- Concentrou-se em PEG (polietilenoglicol) 30% até o volume desejado.
- 9- A concentração de IgY na preparação foi determinada por espectrofotometria a 280nm, usando como coeficiente de extinção o valor 1,36 (CARLANDER, 2002).

APÊNDICE II

ELISA INDIRETO

Reatividade das preparações de IgY com leptospiros patogênicos e saprófitas

- 1- As suspensões de *Leptospiras* (1×10^8 /mL) patogênica e saprófita, foram inativadas a 56°C/14 h e então adicionadas (100µL/cavidade) a uma placa para ELISA de poliestireno (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) previamente sensibilizada com poli-L-Lisina 2,5%.
- 2- Os anticorpos policlonais IgY produzidos foram diluídos (base 2) entre 1:50-1:12800 em PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST) e adicionados (100µL) às cavidades.
- 3- Foi adicionado (100µL/cavidade) o conjugado de imunoglobulina de coelho anti-IgY de galinha peroxidase diluído em PBST (1:2000)).
- 4- Após, foi adicionado 100µL/cavidade de solução cromógena {100mL de tampão fosfato citrato (0,2 M pH 4,0) + 40mg de OPD + 40µl de água oxigenada 30 vol}.
- 5- Depois de 15 minutos no escuro, a absorbância das reações foi determinada em leitora de microplacas a 450nm.

OBSERVAÇÕES:

- Cada período de incubação foi realizado por 1h a 37°C. Ao término das incubações as cavidades foram lavadas 3 vezes com 200µL de PBST.
- Como controle negativo foram usadas cavidades à quais foram adicionados todos os reagentes, exceto as leptospiros

APÊNDICE III (a)

ELETROFORESE

Avaliação da pureza de diferentes purificações de IgY por SDS-PAGE

(gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)

- 1- As preparações da IgY contra leptospiros patogênicas foram aquecidas a 100°C por 8 minutos em tampão de amostra (0,25M Tris-HCl, 10%SDS, 0,5% azul de bromofenol e 50% glicerol) em condições redutoras e não redutoras (com e sem DTT).
- 2- Alíquotas de 3 µL foram aplicadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) .
- 3- As condições de corrida eletroforética foram: DDP- 150v, corrente elétrica- 400mA e tempo de 1:30h.
- 4- O gel de poliacrilamida foi corado com Coomassie-blue.

APÊNDICE III (b)

WESTERN BLOT

Reatividade antigênica das leptospiros patogênicas e saprófitas com IgY

- 1- Suspensões de leptospiros contendo 1×10^9 leptospiros/mL foram inativadas por calor (56°C , 14 h) e aquecidas a 100°C por 8 minutos em tampão de amostra (0,25M Tris-HCl, 10%SDS, 0,5% azul de bromofenol e 50% glicerol).
- 2- As leptospiros em tampão de amostra foram aplicadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS e separadas eletroforéticamente.
- 3- Ao término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham) em tampão de transferência por 1,5 horas com a fonte ajustada para DDP (diferença média de potencial elétrico) = 100V e C (corrente) = 400mA.
- 4- Após, as membranas foram bloqueadas com Blotto (5% de leite em pó desnatado em PBS) por 1h.
- 5- A IgY foi diluída (1:300) em PBS e incubada com a membrana por 1h TA.
- 6- Conjugado anti-IgY de galinha produzido em coelho com peroxidase foi utilizado diluído (1:2000) em PBS.
- 7- A revelação foi desenvolvida com solução cromógena (1% de cloronaftol e peróxido de hidrogênio pH 7,6).
- 8- Ao término das incubações as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos cada vez.

APÊNDICE IV

ELISA INDIRETO

Verificação da Biotinilação da IgY

- 1- As suspensões de *Leptospiras* (1×10^8 /mL) patogênica e saprófita, foram inativadas a 56°C, 14 h e adicionada a uma placa de ELISA de poliestireno (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) (100µL/cavidade) previamente sensibilizada com poli-L-Lisina 2,5% por 1h.
- 2- O anticorpo policlonal IgY biotinilado, foi diluído em PBS com concentrações entre 1:500- 1:12800 e adicionado (100µL) às cavidades.
- 3- Foi adicionado 100µl de conjugado streptavidina-peroxidase, diluído 1:1500 em PBST.
- 4- Após foi adicionada com 100µL/cavidade da solução cromógena {100mL de tampão fosfato citrato (0,2 M pH 4,0) + 40mg de OPD + 40µl de água oxigenada 30 vol}.
- 5- Depois de 15 minutos no escuro, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

OBSERVAÇÕES:

- Cada período de incubação foi realizado por 1h a 37°C. Ao término das incubações as cavidades foram lavadas 3 vezes com 200µL de PBS com 0,05% de Tween(PBST).
- Como controle negativo foram usadas cavidades à quais foram adicionados todos os reagentes, exceto as leptospiras.

APÊNDICE V

ELISA INDIRETO

Verificação da Biotinilação do MAb 1D9

- 1- A placa para ELISA de poliestireno (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) (100 μ L/cavidade) foi sensibilizada com 3 μ g/mL da proteína recombinante LipL32, diluída em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 por 1h .
- 2- O anticorpo monoclonal 1D9 biotinilado foi diluído entre 1:100- 1:51200 em PBS e adicionado (100 μ L) às cavidades.
- 3- Foi adicionado 100 μ l de conjugado streptavidina-peroxidase diluído 1:1500 em PBST.
- 4- Após foi adicionada a solução cromógena {100mL de tampão fosfato citrato (0,2M pH 4,0) + 40mg de OPD + 40 μ l de água oxigenada 30 vol}.
- 5- Depois de 15 minutos no escuro, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

OBSERVAÇÕES:

- Cada período de incubação foi realizado por 1h a 37°C. Ao término das incubações as cavidades foram lavadas 3 vezes com 200 μ L de PBS com 0,05% de Tween(PBST).
- Como controle negativo foram usadas cavidades à quais foram adicionados todos os reagentes, exceto a proteína recombinante.

APÊNDICE VI

ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO FORMATO A

- 1- Sensibilizar uma placa de microtitulação (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) com 2µg/mL do MAb anti-LipL32 1D9 (100µL/cavidade) em tampão carbonato bicarbonato por 18h a 4°C.
- 2- Lavar 3 vezes com PBST.
- 3- Bloquear 1 h a 37°C com 100µl PBST contendo 0,5% de soro albumina bovina (BSA).
- 4- Lavar 3 vezes com PBST.
- 5- Adicionar 100µl/cavidade das diluições de leptospiros patogênicas diluídas em PBS e soro humano por 1 h a 37°C.
- 6- Lavar 3 vezes com PBST.
- 7- Adicionar 100µl/cavidade de IgY anti- *L. interrogans* diluída 1:300 (preparação usada 119 mg/mL) em PBST c/ 0,5% BSA.
- 8- Lavar a placa 5 vezes com PBST.
- 9- Adicionar 100µl/cavidade do conjugado de imunoglobulina de coelho anti IgY de galinha, diluído 1:2000 em PBST c/ 0,5% BSA, por 1h a 37° C.
- 10- Lavar a placa 3 vezes com PBST.

11- Adicionar 100µl/cavidade de solução cromógena {100mL de tampão fosfato citrato (0,2 M pH 4,0) + 40mg de OPD + 40µl de água oxigenada 30 vol} e deixar no escuro por 15 min.

12- A leitura da reação foi feita em leitor de placas de ELISA a 450 nm.

OBSERVAÇÕES:

- Controle negativo: com *L. biflexa* Patoc (10^8 células/mL)

APÊNDICE VII

ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO FORMATO B

- 1- Sensibilizar uma placa de microtitulação (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) com 100 µl/cavidade do MAb anti-LipL32 1D9 (IgG2b, 2µg/mL) em tampão carbonato bicarbonato por 18h a 4°C.
- 2- Lavar 3 vezes com PBST.
- 3- Bloquear por 1 h a 37°C com PBST contendo 0,5% de BSA (200µl/cavidade).
- 4- Lavar 3 vezes com PBST.
- 5- Adicionar 100µl/cavidade das diluições de leptospiros patogênicas diluídas em PBS e soro humano por 1 h a 37°C.
- 6- Lavar 3 vezes com PBST.
- 7- Adicionar 100µl/cavidade de IgY biotinilada diluído 1:8000 em PBST c/ 0,5% BSA.
- 8- Lavar 3 vezes com PBST.
- 9- Adicionar 100µl/cavidade de conjugado streptavidina peroxidase, diluído 1:1500 em PBST c/ 0,5% BSA e deixar reagir por 1h a 37° C.
- 10- Lavar 5 vezes com PBST.
- 11- Adicionar 100µl/cavidade de solução cromógena {100mL de tampão fosfato citrato (0,2 M pH 4,0) + 40mg de OPD + 40µl de água oxigenada 30 vol} e deixar no escuro por 15 min .

12- A leitura da reação foi feita em leitor de placas de ELISA a 450 nm.

OBSERVAÇÕES:

- Controle negativo: com *L. biflexa* Patoc (10^8 células/mL)

APÊNDICE VIII

ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO FORMATO C

- 1- Sensibilizar uma placa de microtitulação (Polysorp, Nunc International, Rochester, NY) com 100 µl/cavidade de uma mistura (2µg/mL) dos MAbs anti-LigA (1B12) e anti- LigB (3D10) em tampão carbonato bicarbonato, pH 9,6, por 18h a 4°C.
- 2- Lavar 3 vezes com PBST.
- 3- Bloquear por 1 h a 37°C com PBST contendo 0,5% de BSA (200µl/cavidade).
- 4- Lavar 3 vezes com PBST.
- 5- Adicionar 100µl/cavidade das diluições de leptospiros patogênicas diluídas em PBS e soro humano por 1 h a 37°C.
- 6- Lavar 3 vezes com PBST.
- 7- Adicionar 100µl/cavidade do MAb 1D9 biotinilado, diluído 1:2000 em PBST c/ 0,5% BSA.
- 8- Lavar 3 vezes com PBST.
- 9- Adicionar 100µl/cavidade de conjugado streptavidina-peroxidase, diluído 1:1500 em PBST c/ 0,5% BSA e deixar reagir por 1h a 37° C.
- 10- Lavar 5 vezes com PBST.
- 11- Adicionar 100µl/cavidade de solução cromógena{100mL de tampão fosfato citrato (0,2 M pH 4,0) + 40mg de OPD + 40µl de água oxigenada 30 vol} .

e deixar no escuro por 15 min.

12- A leitura da reação foi feita em leitor de placas de ELISA a 450 nm.

OBSERVAÇÕES:

- Controle negativo: com *L. biflexa* Patoc (10^8 células/mL)