

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Curso de graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIROSE  
HUMANA**

**Ana Sofia Lima Estevão de Oliveira**

**Pelotas, 2014**

**ANA SOFIA LIMA ESTEVÃO DE OLIVEIRA**

**“Desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana”**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, UFPel como requisito parcial à obtenção do título de Biotecnologista.

Orientadora de estágio: Dra. Karla Sequeira Mendonça

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

**O48d            Oliveira, Ana Sofia Lima Estevão de**

**Desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana / Ana Sofia Lima Estevão de Oliveira. – 52f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Alan John Alexander McBride ; coorientadora Karla Sequeira Mendonça .**

**1.Biotecnologia. 2.Leptospirose humana.  
3.Especificidade. 4.ELISA. 5.Diagnóstico. I.McBride, Alan John Alexander. II.Mendonça, Karla Sequeira.. III.Título.**

CDD: 614.56

**ANA SOFIA LIMA ESTEVÃO DE OLIVEIRA**

**“DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIROSE  
HUMANA”**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Pelotas, UFPel como requisito parcial à obtenção do título de  
Biotecnologista.

Data da defesa: 08/12/2014

Banca Examinadora:

---

Professor Doutor Alan John Alexander McBride, Universidade Federal de Pelotas

---

Mestre Marcelle Moura Silveira, Universidade Federal de Pelotas

---

Doutor Sérgio Jorge, Universidade Federal de Pelotas

---

Suplente: Doutora Karla Sequeira Mendonça, Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus avós, José Mário e Maria Ângela, e à minha mãe Maria Angélica e meu irmão José Mário que são minha inspiração e o grande motivo de eu ter chego até aqui.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, a minha família, por tudo que me ensinaram e fizeram por mim desde meus primeiros dias de vida. Tenho muito orgulho de ter nascido numa família de pessoas tão honestas, batalhadoras e determinadas. Devo e dedico cada uma das minhas conquistas, principalmente essa, a vocês.

A todos do laboratório 3 de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, que sempre me ajudaram e me deram forças em tudo o que eu precisei, me acalmando e divertindo nas horas de desespero. Um agradecimento especial a Karla, atual orientadora de estágio, a qual sem ela não conseguiria terminar esse trabalho. Não tenho palavras pra agradecer tudo o que ela fez por mim nesse semestre, se mostrando disponível e pronta pra me ajudar sempre.

Ao meu Orientador, Prof. Alan J. A. McBride, por ter me recebido de braços abertos e ter me dado todas as oportunidades e ensinamentos ao longo da minha Iniciação Científica.

Às minhas amigas e amigos por estarem sempre ao meu lado, me incentivando, dando força em todas as horas, e entendendo minhas ausências, sem vocês tudo seria mais difícil.

E à ATBIOTEC 2014/2 por tudo que vivemos nesses 4 últimos anos, em especial, à Katielle e Maitê, que estiveram comigo diariamente durante toda essa trajetória e que eu vou levar pra sempre. Obrigada por tudo, principalmente pela amizade, que com certeza, não finaliza com o curso.

## Resumo

OLIVEIRA, Ana Sofia Lima Estevão de. **Desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose humana**. 2014. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose infecciosa emergente e negligenciada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Estima-se cerca de 873 mil casos de leptospirose humana anualmente, com índices de letalidade de quase 49 mil. A leptospirose humana é comumente adquirida através de águas contaminadas por urina de animais infectados. Quase todos os mamíferos podem ser reservatórios da doença, no entanto o maior transmissor são os roedores sinantrópicos. Já a transmissão entre humanos é quase inexistente. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é considerado o teste sorológico padrão ouro para o diagnóstico da leptospirose, no entanto é laborioso, demorado e exige amostras pareadas. Além do mais, utiliza bactérias vivas, dificultando a padronização e gerando riscos para quem o manipula. Novos meios de diagnóstico rápido, sensível e que possa ser empregado como teste de rotina para a detecção da leptospirose humana são necessários. Neste presente trabalho, foi avaliado o potencial diagnóstico de um IgG-ELISA e IgM-ELISA utilizando antígeno bruto de *L. interrogans*. Um banco de soros humanos previamente caracterizados por MAT foi testado. Através de análises tipo *checkerboard*, as concentrações ideais de antígeno, soro e anticorpo secundário foram selecionadas para análises de soros individuais. Na análise de soros individuais por IgG-ELISA, o teste demonstrou-se muito específico, com especificidade de 100% e sensibilidade de 83%. Esses valores foram obtidos através de um número limitado de soros e devem ser validados com um número maior. No entanto, mesmo necessitando a utilização de um maior número de soros, os resultados são muito promissores e o teste possui um grande potencial para diagnósticos rápidos e específicos.

**Palavras chaves:** Especificidade; Diagnóstico; ELISA; Leptospirose humana.

## Abstract

OLIVEIRA, Ana Sofia Lima Estevão de. **Development of a diagnostic test of human leptospirosis**. 2014. 52f. Final paper – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leptospirosis is an emerging and neglected infectious zoonotic disease caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. It is estimated about 873,000 cases annually of human leptospirosis, with lethality rates of almost 49,000. Human leptospirosis is often acquired through contaminated water urine of infected animals. Almost all mammals can be reservoirs of disease; however, the greater transmitter are synanthropic rodents. Transmission between humans is almost nonexistent. The microscopic agglutination test (MAT) is considered the gold standard serologic test for the diagnosis of leptospirosis, however is laborious, time consuming and requires paired sera. Moreover, using live bacteria difficult standardization and creating hazards to those who handle. New rapid diagnostic, sensitive and can be used as a routine test for the detection of human leptospirosis are required. In this work, the diagnostic potential of an IgG-ELISA and IgM-ELISA using whole bacteria of *L. interrogans* was evaluated. A bank of human sera previously characterized by MAT was tested. Through checkerboard type analysis, the optimal concentrations of antigen, serum and secondary antibody were selected for analysis of individual sera. In the analysis of individual sera IgG-ELISA, the test proved to be very specific with 100% specificity and 83% sensitivity. These values were obtained using a limited number of sera and should be validated with a larger number. However, even necessitating use of a larger number of sera, the results are very promising and the test has a great potential for rapid and specific diagnosis.

**Key word:** Specificity; Diagnostic; ELISA; Human leptospirosis.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Procedimento de <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e negativo para analisar a concentração ideal dos soros.....	34
<b>Figura 2</b> Procedimento de <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e negativo com concentração de antígeno bruto $10^8$ .....	34
<b>Figura 3</b> Procedimento de <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e negativo com concentração de antígeno bruto $10^7$ .....	35
<b>Figura 4</b> Procedimento de <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e negativo com concentração de antígeno bruto $10^6$ .....	35
<b>Figura 5</b> Procedimento <i>checkerboard</i> para analisar a concentração ideal do anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase.....	36
<b>Figura 6</b> Procedimento <i>checkerboard</i> para analisar a concentração ideal do <i>pool</i> de soros positivos e negativos e do anticorpo secundário anti-IgM conjugado com peroxidase.....	37
<b>Figura 7</b> Procedimento <i>checkerboard</i> para analisar a concentração ideal do <i>pool</i> de soros positivos na concentração de conjugado 1:4.000.....	38
<b>Figura 8</b> Procedimento <i>checkerboard</i> para analisar a concentração ideal do <i>pool</i> de soros positivos na concentração de conjugado 1:6.000.....	38
<b>Figura 9</b> Procedimento <i>checkerboard</i> para analisar a concentração ideal do <i>pool</i> de soros positivos na concentração de conjugado 1:8.000.....	39
<b>Figura 10</b> Procedimento <i>checkerboard</i> para analisar a concentração ideal do <i>pool</i> de soros positivos na concentração de conjugado 1:10.000.....	39
<b>Figura 11</b> Resultados dos 36 soros individuais testados com anticorpo secundário anti-IgG.....	40
<b>Figura 12</b> Resultados dos 36 soros individuais testados com o anticorpo secundário anti-IgM.....	41
<b>Figura 13</b> Gráfico ROC mostrando os diferentes valores de pontos de corte do IgG-	

ELISA.....42

**Figura 14** Gráfico ROC mostrando os diferentes valores de pontos de corte do IgM-

ELISA.....43

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Pontos de corte disponíveis para avaliação, IgG-ELISA.....	43
<b>Tabela 2</b> Pontos de corte disponíveis para avaliação, IgM-ELISA.....	44

## Lista de abreviaturas e siglas

Abs- Absorbância

Elisa- Ensaio imunoenzimático

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Água Oxigenada

LCR--Líquido cefalorraquidiano

Lig- *Leptospiral Immunoglobulin-like*

LPS- Lipopolissacarídeo

MAT- Teste de Microaglutinação

MS- Ministério da Saúde

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPD- O-fenilenodiamina

OMP- *Outer Membrane Protein* (Proteína de membrana externa)

PCR- *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia de polimerase)

PBS-T- *Phosphate buffered saline* (Solução salina de fosfato tamponada com adição de 0,05% de Tween)

ng- Nanograma

nm- Nanômetro

µl- Microlitro

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>17</b>
2.1	Epidemiologia.....	17
2.2	Microbiologia, Genoma e Taxonomia.....	19
2.3	Transmissão.....	21
2.4	Manifestações Clínicas.....	22
2.5	Patogênese.....	23
2.6	Tratamento e Controle.....	23
2.7	Principais diagnósticos laboratoriais.....	25
2.7.1	Isolamento da bactéria.....	25
2.7.2	Testes sorológicos.....	26
2.7.3	PCR.....	28
<b>3</b>	<b>Objetivo.....</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos.....	30
<b>4</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>31</b>
4.1	Banco de Soros.....	31
4.2	Protocolo Padrão de produção de antígeno bruto.....	31
4.3	Protocolo de execução de ELISAs indireto.....	32
<b>5</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>33</b>
5.1	Seleção inicial de antígenos.....	33
5.2	Seleção da concentração ótima de antígeno, soros e anticorpo secundário anti-IgG.....	33
5.3	Seleção da concentração ótima dos soros e anticorpo secundário anti-IgM.....	36
5.4	Estabelecimento do ELISA indireto utilizando o anticorpo secundário anti-IgG testando os soros individuais .....	40

5.5	Estabelecimento do ELISA indireto utilizando o anticorpo secundário anti-IgM testando soros individuais.....	41
<b>6</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>48</b>
	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>49</b>

## 1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose febril aguda, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* que afeta tanto os homens quanto os animais (PANBIO, 2008). É uma doença de importância global e também um problema de saúde pública no Brasil, onde a leptospirose é endêmica em todas as regiões geográficas, e em períodos chuvosos, tem grande potencial de epidemia (SOUZA & ARAUJO, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se 873 mil casos graves de leptospirose anualmente, com cerca de 49 mil mortes (PICARDEAU et al., 2014). Já no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) contabiliza que entre 1999 e 2005 houveram 81.897 casos de indivíduos suspeitos com a doença, onde 22.774 foram confirmados, levando a 2.574 mortes (COSTA, 2014). A incidência da doença nesse período foi de 1,9 em cada 100 mil indivíduos da população. No entanto, o vigilância Leptonet, desenvolvido pela Sociedade Internacional de Leptospirose avalia que esses dados são subestimados devido a dificuldades em confirmação do diagnóstico, devido a semelhanças de sintomas com outras doenças e baixos níveis de detecção da forma leve (SOUZA & ARAUJO, 2011).

A dificuldade de diagnósticos aptos a realizarem testes especializados contribui com a negligência da doença e favorecem com o controle permanecem sem resposta (PICARDEAU et al., 2014). Fica-se, então, evidente a necessidade urgente do desenvolvimento de tecnologias mais eficazes e rápidas para detecção e diagnóstico, que ainda continuam sendo a maior barreira para a vigilância epidemiológica (MCBRIDE, 2005; PICARDEAU et al., 2014). Atualmente, os padrões de referência para o diagnóstico de leptospirose permanecem através da cultura bacteriana e do teste de aglutinação microscópica (MAT) (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Ambos os testes não podem ser utilizados como testes padrões de rotina, pois a cultura da *Leptospira* requer até quatro semanas para obtenção de resultados e nem sempre é sensível, e o MAT, apesar de ser o padrão ouro como teste diagnóstico, além de ser demorado, não é eficaz em pacientes com infecção aguda (WAGGONER et al., 2014; XUE TING, et al., 2014).

Um método para ter um diagnóstico precoce é detectando anticorpos IgM em amostras biológicas que aparecem em três dias após a infecção, e podem persistir por até cinco meses, embora tenha havido relatos de anticorpos IgM que persistem por anos (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Ou através dos anticorpos IgG e IgA que são detectáveis decorridos cinco e oito dias, respectivamente (PANBIO, 2008). A detecção de anticorpos para antígenos específicos da *Leptospira* por um procedimento de ELISA é valiosa para o diagnóstico de infecção aguda e é uma alternativa aceitável como método de diagnóstico rápido e eficiente (PICARDEAU et al., 2014). A presença de um nível significativo ou crescente de IgM é considerado um dado sugestivo de infecção por *Leptospira* spp. (PANBIO, 2008). Além disso, o teste ELISA é relativamente mais barato que o MAT e pode detectar a doença mais cedo. Isto é importante porque o tratamento pode ser administrado na fase aguda, impedindo assim a progressão da doença para estágio grave (XUE TING et al., 2014).

Atualmente, no Brasil, *kits* como *Leptospira* IgM kit com sensibilidade e especificidade de 100% (Abnova), Novex IgG ELISA Kit com 100 % de sensibilidade e especificidade (Novex, Life Technologies), *Leptospira* IgM ELISA com sensibilidade de 96,5% e especificidade de 98,5% (Panbio), Kit SERION ELISA classic *Leptospira* IgG e IgM com sensibilidade de 97% e especificidade de 96% (Virion\ Serion), dentre outros, são constantemente importados. No entanto, esses valores de sensibilidade e especificidade não se repetem em diferentes regiões e isso pode se dar uma vez que a prevalência de sorogrupos de *Leptospira* varia geograficamente, sendo necessário o desenvolvimento de testes com cepas isoladas localmente. Novos ensaios devem ser validados na região geográfica em que serão utilizados, porque a sensibilidade pode ser afetada por diferenças regionais na prevalência do sorotipo (BLACKSELL et al., 2006). Além disso, a maior parte dos *kits* de ELISA comercialmente disponíveis usa a cepa não patogênica *L. biflexa* como antígeno (XUE TING et al., 2014). Idealmente, também deveriam ser feitas a detecção de anticorpos que reagem somente com sorovares patogênicos (SYKES, et al., 2011).



Devido à inexistência de um teste mais sensível e específico para cepas comumente presentes no Brasil, a necessidade de um kit de ELISA nacional contra leptospirose fica evidente. A produção de um teste nacional não só garante uma especificidade e sensibilidade maior às cepas que aqui se encontram como possui uma importância econômica, sendo os testes nacionais mais baratos do que os importados (MCBRIDE et al., 2007; VALVERDE, 2007). Em decorrência disso existe a necessidade do desenvolvimento de novos testes. Esse trabalho foi iniciado na tentativa do estabelecimento de um teste diagnóstico ELISA IgG e IgM para leptospirose humana, que possa ser posteriormente comercializado.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial e tem surgido como uma importante causa de morbidade e mortalidade entre as populações empobrecidas, se tornando um problema de saúde pública emergente (KO et al., 2009; SHARMA et al., 2006). A doença é causada por leptospiras patogênicas transmitidas pelo contato com urina de animais infectados ou água e lama contaminadas pela bactéria. No meio urbano, os roedores são os principais reservatórios, especialmente os roedores sinantrópicos (*SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009*).

A incidência da infecção humana é mais elevada nos trópicos, comparada às regiões temperadas, mas a transmissão ocorre tanto em países industrializados como em países pobres em desenvolvimento (BHARTI et al., 2003; MCBRIDE, 2005). Ainda assim, leptospiras foram detectadas em quase todas as espécies de mamíferos que têm sido examinados e em todos os continentes, exceto a Antártica (ADLER, 2011). Existem registros de surtos em Nicarágua (TREVEJO, 1998), na Ásia (TANGKANAKUL, 2000), Estados Unidos (STERN et al., 2010), na Índia (SHARMA et al., 2006), Brasil (SOUZA et al., 2011), em Porto Rico e na Jamaica (BHARTI et al., 2003).

No Brasil, a leptospirose emergiu como um problema generalizado em favelas urbanas, principalmente após enchentes e inundações, onde se observam a maioria dos casos detectados, devido a falta de saneamento que produz as condições ideais para a transmissão da doença pelos roedores (MCBRIDE, 2005). Esses fatores favorecem a disseminação e a persistência da *Leptospira* spp., aumentando o risco de contato do homem com águas contaminadas e a chance da ocorrência de surtos (ADLER, 2014). Estima-se que a situação da leptospirose urbana torne-se um problema urgente na população das favelas nos próximos 25 anos (MCBRIDE, 2005). Nos últimos anos, no entanto, foi possível observar também surtos durante eventos esportivos, atividades recreativas, turismos e desastres naturais, ressaltando a capacidade da

leptospirose tornar-se um problema em cenários não tradicionais (KO et al., 2009). Surtos em áreas rurais, principalmente em locais de cultura de subsistência, também foram citados (MCBRIDE, 2005).

Ultimamente, vem sendo relatados mais de um milhão de casos da forma grave da leptospirose a cada ano, com taxas de mortalidade superior a 10% (ADLER, 2011; KO et al., 2009), chegando a 20% principalmente em lugares de climas úmidos e quentes (VARNI et al., 2014). No entanto, taxa de mortalidade pode chegar a 70% em casos de leptospirose grave com síndrome pulmonar hemorrágica (ADLER, 2011). De acordo com a OMS estima-se 873 mil casos graves de leptospirose anualmente com chegando a 49 mil óbitos (PICARDEAU et al., 2014). Já no Brasil, o MS contabiliza que entre 1999 e 2005 houveram 81.897 casos de suspeitos infectados por leptospirose, onde 22.774 foram confirmados, levando a 2.574 mortes. A incidência da doença nesse período foi de 1,9 em cada 100 mil indivíduos da população (SOUZA & ARAUJO, 2011). No entanto, esses números não são totalmente confiáveis e são subestimados, pois frequentemente sintomas leves não são detectados ou são atribuídos a outras doenças (KO et al., 2009). Além disso, a qualidade e disponibilidade de testes e de laboratórios de diagnóstico especializados e de sistemas de vigilância variam amplamente entre países e muitas vezes estão ausentes, contribuindo com a negligência da doença (VARNI et al., 2014). Devido a isso, a prioridade imediata deve centrar-se no aumento da capacidade dos serviços epidemiológicos em países em desenvolvimento para condução de investigações de surtos e vigilância ativa e, assim, direcionar as intervenções adequadas para os grupos de risco (MCBRIDE, 2005).

No Brasil, a leptospirose tem grande importância, não só social, como econômica, devido à alta taxa de incidência e internações, com altos custos hospitalares, perdas de dias de trabalho e também por sua letalidade (MCBRIDE, 2005; *SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE*, 2009). Além de constituir um risco de infecção para os seres humanos, a doença é uma das principais causas de perdas econômicas também na produção de animais, principalmente bovinos e suínos através de perdas reprodutivas devido ao aborto e problemas pós-natal

(ADLER, 2011). Para um melhor auxílio e controle da doença, é importante que o MS denuncie os casos à vigilância Leptonet, desenvolvida pela Sociedade Internacional de Leptospirose, no site <http://www.leptonet.net> (MCBRIDE, 2005).

## 2.2 Microbiologia, Genoma e Taxonomia

As leptospiras são espiroquetas, um grupo de bactérias de estrutura fina e helicoidal, com cerca de 0,1µm de diâmetro e comprimento que varia de 6-20µm (BHARTI et al., 2003; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Tem também como característica específica, em uma ou em ambas das extremidades, um formato de gancho ou de interrogação (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). São organismos móveis, impulsionados por um mecanismo flagelar contido inteiramente dentro de um envelope externo (FAINE et al., 1999). São microrganismos aeróbicos e de crescimento lento (KO et al., 2009). Os membros do grupo são diferentes em sua composição em relação aos ácidos nucléicos, química, nutrição, metabolismo e habitats naturais. No entanto, são todos muito suscetíveis a influências ambientais (FAINE, ADLER, BOLIN, & PEROLAT, 1999). São bactérias do filo e classe Spirochaetes, da ordem Spirochaetales, da família Leptospiraceae e do gênero *Leptospira*. O gênero compreende 21 espécies genômicas, sendo 9 patogênicas, 5 intermediárias e 7 saprófitas (KO et al., 2009; ADLER, 2014).

A leptospira tem uma estrutura típica de dupla membrana e partilha as características de ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FRAGA, 2011). A membrana citoplasmática e os peptidoglicanos da parede celular estão intimamente associados e cobertos por uma membrana externa, que está associada ao LPS, principal antígeno da leptospira (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Juntamente ao LPS, estão as proteínas funcionais e estruturais que também fazem parte da membrana externa. Uma grande parte dessas proteínas são as lipoproteínas LipL32, LipL21 e LipL41, as proteínas integrais de membrana, como a OmpL1 e a de secreção, secretin GSPD, as quais têm se mostrado também antigênicas (ADLER, et al., 2010).

Seu genoma consiste em dois cromossomos circulares, CI e CII, que são

altamente conservados. A bactéria caracteriza-se por um teor de guanina mais citosina (G + C) de 35-41% em seu DNA cromossômico (BHARTI et al., 2003). Seu genoma é grande em comparação aos genomas de outras espiroquetas, capacitando a *Leptospira* spp. de viver em diversas condições, tanto dentro de animais hospedeiros como livre no meio ambiente (FAINE et al., 1999; MCBRIDE, 2005). Além disso, possuem mais de 70 genes com funções reguladoras (MCBRIDE, 2005).

Além da *L. biflexa*, os genomas de *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. licerasiae* foram sequenciados, fornecendo informações de características do genoma dos três grupos filogenéticos (ADLER, 2014). A maioria (77-81%) dos genes dos seus genomas não têm ortólogos comparados aos genomas de outras espiroquetas, indicando o elevado grau pelo qual as leptospiros divergiram de outros membros do filo (KO et al., 2009). A comparação dos genomas mostra a existência de cerca de 2.050 genes nucleares em comum. Previsivelmente, a maioria das categorias funcionais que estão envolvidas em funções de manutenção essenciais, tais como metabolismo do DNA e do RNA, processamento e secreção de proteína, manutenção da estrutura da célula, processos celulares e metabolismo energético estão representadas nesse conjunto de genes nucleares (ADLER, 2011).

Informações da sequência do genoma permitiram a introdução de várias abordagens para a classificação por genotipagem de *Leptospira* spp. (KO et al., 2009). Além da classificação genética, ainda podemos utilizar a classificação fenotípica, baseada na sorologia, que reconheceu mais de 230 sorovares entre leptospiros patogênicas. Esta classificação é mantida para fins epidemiológicos (CINCO, 2010). A identificação dos sorotipos e sorogrupos fornece informações sobre a transmissão da doença pelo patógeno. No entanto, ela é realizada em poucos laboratórios de referência a nível mundial. (BHARTI et al., 2003).

### 2.3 Transmissão

Biomassas tropicais são os ecossistemas predominantes, mostrando relatos de surtos de leptospirose em animais que podem ser os principais reservatórios da bactéria (ADLER, 2014). No entanto, ainda são necessárias mais informações para entendermos melhor os múltiplos fatores causais, possivelmente ligados ou associados a determinadas regiões geográficas (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). As condições climáticas nestas áreas geográficas certamente favorecem diferentes mecanismos de transmissão entre animais e de animais para humanos. A presença de casos em humanos indica a presença de animais que espalham as bactérias no ambiente circundante (PETRAKOVSKY et al., 2014)

Os veículos de transmissão da leptospirose podem ser animais silvestres ou domésticos, especialmente roedores e pequenos marsupiais, gado, suínos, cães (BHARTI et al., 2003). Os moradores da cidade também podem ser profissionalmente expostos como trabalhadores de esgoto, açougues, inspetores de carne, veterinários (FAINE et al., 1999). Os moradores rurais estão sempre em risco, especialmente em países tropicais, onde estão em estreito contato com os campos potencialmente contaminados por roedores e animais domésticos, que em um clima quente e úmido, geralmente entram em contato sem considerações de roupa ou calçado de proteção (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Já a transmissão entre humanos é muito rara e de pouca relevância epidemiológica (*SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009*). Os seres humanos são hospedeiros acidentais, assim a *Leptospira* spp. causa manifestações agudas da doença, mas não induz um estado de portador, que é necessário para a sua transmissão. Os seres humanos quase nunca se tornam portadores crônicos, mas sofrem infecções agudas. (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). O contágio transmitido por ingestão de alimentos ou por inalação de partículas transportadas pelo ar em seres humanos também é quase inexistente (KO et al., 2009).

## 2.4 Manifestações clínicas

A infecção por *Leptospira* spp. patogênica em seres humanos pode variar em gravidade de acordo com o sorovar infectante, a carga bacteriana e a competência imunológica do paciente (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Ela produz uma diversificada variedade de manifestações clínicas que variam desde doença febril indiferenciada a icterícia, insuficiência renal, hemorragia pulmonar potencialmente letal e síndrome de Weil (ADLER, 2014). A compreensão dos mecanismos de patogênese da leptospirose é limitada, assim como a compreensão da relação da gravidade da infecção (doença moderada ou severa) com os efeitos diretos do patógeno ou de fatores genéticos do hospedeiro. As manifestações clínicas da leptospirose sugerem que uma variada gama de eventos podem contribuir para infecções agudas e crônicas nos processos de infecções de pessoas e hospedeiros (BHARTI et al., 2003).

O período da doença varia entre 5 a 14 dias. Tal enfermidade apresenta manifestações variáveis, podendo ser assintomática ou com manifestações graves e fulminantes (BHARTI et al., 2003). Inicialmente se tem a fase precoce da doença caracterizada pela febre abrupta, a qual muitas vezes não é possível ser diferenciada de outras doenças febris (FAINE et al., 1999). Essa fase corresponde a 90% das formas clínicas, porém apenas uma pequena parte é notificada nessa parte da doença, devido às dificuldades do diagnóstico clínico e da confirmação laboratorial (SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Na maioria dos pacientes, a doença desaparece após a primeira semana de sintomas (KO et al., 2009). Os sintomas normalmente são acompanhados com dores de cabeça, mal estar, dores musculares, hemorragia subconjuntival, febre, anorexia, calafrios, vômitos e erupções passageiras na boca e na pele (FAINE et al., 1999). É importante observar alguns sinais e sintomas que podem ajudar a diferenciar a fase precoce da leptospirose de outras doenças febris agudas, com as quais podem ser confundida, como o derrame conjuntival que é uma característica específica e é achada em 30% dos pacientes. Geralmente, há uma associação da leptospira com sintomas como intensa mialgia na região lombar e panturrilhas, porém, apenas a análise clínica

dos sintomas da fase é insuficiente na diferenciação da leptospirose de outras doenças (*SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009*). Os sintomas podem coincidir com a fase imune quando os anticorpos começam a ser produzidos, acompanhados pela excreção de espiroquetas na urina (BHARTI et al., 2003).

A doença de Weil representa a forma mais grave da doença. Esta síndrome pode se desenvolver após a fase aguda, ou simplesmente estar presente como uma doença progressiva (ADLER, 2014). Ela é caracterizada por icterícia, insuficiência renal, e hemorragia com um curso clínico variável. A taxa de letalidade pode ser elevada, variando entre 5-15%. A insuficiência renal aguda é relatada em 16-40% dos casos, e é geralmente não oligúrica (BHARTI et al., 2003; ADLER & MOCTEZUMA, 2010)

## **2.5 Patogênese**

As leptospirosas penetram na pele ferida e nas mucosas, e rapidamente estabelecem uma infecção sistêmica, atravessando barreiras do tecido e se disseminando pelo sangue (MCBRIDE, 2005). Essas bactérias mostram um eficiente mecanismo de infecção nas células hospedeiras, infectando-as e se translocando entre as monocamadas de células (BHARTI et al., 2003). Elas não são microrganismos intracelulares facultativos, residindo apenas transitoriamente dentro das células para se espalhar para órgãos-alvo e evitar a destruição imune (KO et al., 2009).

## **2.6 Tratamento e controle**

Atualmente, existem algumas medidas de prevenção eficazes para leptospirose (ADLER, 2014). Casos relatam uma diminuição da contaminação através da utilização de um vestuário apropriado (BHARTI et al., 2003; MCBRIDE, 2005). Em favelas urbanas, existem deficiências de saneamento básico, tais como esgotos abertos, que contribuem à transmissão da leptospirose durante epidemias. A resposta de saúde



pública da leptospirose urbana deve, portanto, corrigir essas deficiências (MCBRIDE, 2005). Medidas de higiene ocupacional são muitas vezes úteis, mas difíceis de implementar pois elas podem dificultar o trabalho ou são inaceitáveis pelos trabalhadores e empregadores (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

É recomendado fortemente o uso de terapias com antibióticos para leptospirose grave (ADLER, 2014). É importante garantir que os antibióticos sejam entregues sem demora e, na dosagem apropriada (MCBRIDE, 2005). Uma combinação de penicilina e estreptomicina tem sido a terapia escolhida para o tratamento de leptospirose aguda, mas ampicilina, amoxicilina, tetraciclina e cefalosporinas de terceira geração, também têm sido utilizados (BHARTI et al., 2003; ADLER, 2014). O tratamento com antibióticos é eficaz dentro dos primeiros 7 a 10 dias de infecção e pode reduzir o avanço dos sintomas e a probabilidade de sequelas (FAINE et al., 1999).

A vacinação é a maneira mais fácil e muitas vezes o único método prático de controle de transmissão por animais (FERREIRA, 2014). No entanto, a sua utilização é limitada pela disponibilidade, custo, qualidade e adequação dos antígenos na vacina em termos de relevância para a espécie e do país (ADLER, 2014). Vacinas comerciais contra *Leptospira* estão disponíveis globalmente para bovinos, suínos e cães. Geralmente, as vacinas contêm dois ou mais sorovares prevalentes do local, não imunizando contra todos os tipos que podem infectar o indivíduo ou animal (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Podem ser de subunidades contendo antígenos purificados e sendo aplicadas juntamente com adjuvantes, ou de bacterinas atenuadas (BACELO et al., 2014). As vacinas para prevenir leptospirose humana estão disponíveis em alguns países e ensaios clínicos de larga escala têm sido relatados em Cuba, Rússia e China (BHARTI et al., 2003).

Vários problemas confrontam o desenvolvimento de uma vacina para prevenir a leptospirose humana. Alguns deles devem as vacinas de bactérias atenuadas fornecerem apenas um curto prazo de proteção. Além disso, os padrões de sorovares variam de acordo com o local, dificultando o desenvolvimento de uma adequada vacina.

Outro problema é o conhecimento incompleto de mecanismos de proteção e imunidade contra a leptospirose. Provavelmente, a maior barreira para vacina antileptospiral é a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina polivalente para leptospirose humana em áreas endêmicas que possuam vários sorovares (BHARTI et al., 2003).

## **2.7 Principais diagnósticos laboratoriais**

É evidente a partir das descrições clínicas de leptospirose que um diagnóstico conclusivo não pode ser feito sem confirmação laboratorial (FAINE et al., 1999). Devido à grande diversidade de sinais clínicos, o diagnóstico de leptospirose é difícil, tornando a doença negligenciada (VARNI et al., 2014). Seu reconhecimento depende de uma variedade de ensaios de laboratório que podem tanto analisar a bactéria inteira como identificar, através de testes sorológicos, anticorpos e antígenos específicos (BHARTI et al., 2003). A detecção de anticorpos específicos é feita pelo MAT, por ensaio indireto de hemaglutinação (IHA), por ensaios imunoenzimático (ELISA) e através da detecção de leptospiras, as quais são detectadas através de microscopia de campo escuro, imunofluorescência ou reação em cadeia de polimerase (PCR) (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A escolha para a utilização de um teste de diagnóstico irá depender de uma série de fatores, incluindo a precisão do diagnóstico, a viabilidade financeira, técnica e prática, e da necessidade de um resultado rápido (PICARDEAU et al., 2014). No entanto, a falta de um teste de laboratório apto a identificar a doença na fase aguda continua a ser a principal barreira para um diagnóstico epidemiológico de vigilância (MCBRIDE, 2005).

### **2.7.1 Isolamento da bactéria**

Leptospiras estão presentes no sangue durante a primeira semana de sintomas da infecção. O diagnóstico através de cultura é definitivo, no entanto raramente é realizado na prática clínica de rotina, pois isso pode levar vários meses e requer

considerável experiência (BOONSILP, 2011, ADLER, 2010 e FANG, 2014). As bactérias podem ser isoladas a partir de sangue e amostras do líquido cefalorraquidiano (LCR) durante os primeiros 7-10 dias da doença, e de urina durante a 2ª e 3ª semana (BHARTI et al., 2003). Para o isolamento de leptospira é necessário que as amostras contaminadas com a bactéria sejam frescas e coletadas antes do tratamento com antibióticos. Dependendo do grau de contaminação, usa-se 5-fluouracil ou outros agentes antimicrobianos para inibir essa contaminação (LEVETT, 2001). Mesmo nas melhores condições, o microrganismo cresce lentamente, sendo necessário fazer durante 13 semanas exames semanais com microscópio de campo escuro até que seja descartado como negativo a bactéria incubada. Detecção direta por microscopia de campo escuro muitas vezes resulta em falsos positivos devido à má interpretação e necessidade de alto grau de experiência (CHAGAS JUNIOR, 2012). Por esta razão, não é considerado útil como um teste de rotina para o diagnóstico de pacientes individuais, mas continua a ser importante para propósitos epidemiológicos (ADLER, 2010 e BARTHI, 2003). A incubação a 28-30°C é preferencialmente utilizada, pois leptospiras não sobrevivem por muito tempo em 37°C em meios de cultura (FAINE, 1999).

### **2.7.2 Testes sorológicos**

O método padrão ouro é a realização do teste de aglutinação microscópica (MAT), e ele é utilizado para testar os anticorpos em soros de pessoas ou animais, ou a especificidade de aglutinação de cepas de *Leptospira* spp. com soros imunes para fins de identificação (FAINE et al., 1999). Tem a vantagem de ser específico para sorovares de leptospiras, ou pelo menos sorogrupos, mas não pode discriminar os anticorpos resultantes da infecção ou de vacinação (ADLER, 2010). Os soros de pacientes reagem em suspensões de antígenos vivos de sorovares e após a incubação, as misturas soro-antígeno são examinadas microscopicamente e, depois de observadas a aglutinação são determinados os títulos de anticorpos em diluições seriadas (LEVETT, 2001). O critério para considerar um resultado indicativo de infecção atual de

leptospirose, é geralmente aceito como um alto título pré-definido de MAT (ADLER & MOCTEZUMA, 2010) e um aumento de quatro vezes no título de anticorpos (BHARTI et al., 2003).

O teste de aglutinação microscópica é um teste complexo de controlar, executar e interpretar, e requer uma competência significativa dos seus manipuladores (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003). Os antígenos utilizados devem incluir sorovares de todos os sorogrupos localmente presentes e as culturas vivas devem ser mantidas viáveis, necessitando verificações periódicas e gerando riscos aos manipuladores (LEVETT, 2001). Estudos indicam que o MAT pode não ser muito qualificado para identificar o sorovar infectante em casos individuais, mas é eficiente na predição de sorogrupos presentes dentro de uma população (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2003). O teste padrão ouro é lido por microscopia de campo escuro e o ponto final é a maior diluição de soro para a qual 50% de aglutinação ocorre. Considerável esforço é necessário para reduzir o efeito subjetivo da variação do observador, mesmo dentro de laboratórios (LEVETT, 2001).

Apesar de muito sensível e específico, o MAT tem muitas desvantagens. Sua interpretação é complicada pelo elevado grau de reações cruzadas que ocorrem entre os diferentes sorogrupos, especialmente em amostras de fase aguda (LEVETT, 2001). Também requer a manutenção de um painel de referência local de culturas de bactérias vivas para o desempenho do ensaio e a utilização de amostras aguda e convalescente para fornecer um diagnóstico confirmado (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; WAGGONER et al., 2014). Essa exposição às bactérias vivas pode ser perigosa para os trabalhadores, que podem terminar se infectando. Além disso, MAT pode não ser útil para a identificação da fase aguda do paciente por causa das amplas necessidades de recursos técnicos e não é aplicável como diagnóstico de rotina em ambiente de laboratório (XUE TING et al., 2014).

Devido à complexidade do MAT, testes de detecção rápida de anticorpos anti-leptospiras em infecção aguda têm sido desenvolvidos (LEVETT, 2001). Testes que

fornecem informações como o isotipo ( IgG ou IgM) do anticorpo, que reage com o antígeno de *Leptospira* estão sendo utilizados, como é o caso do ELISA (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Eles são úteis quando se tenta determinar através do anticorpo presente no soro de um paciente o tipo de infecção presente (atual ou resultante de infecções passadas), e eficiente em áreas do mundo onde a leptospirose é endêmica (FAINE et al., 1999). Estes ensaios têm a vantagem de proporcionar um resultado rápido, sem a necessidade de implantações de cultura (BHARTI et al., 2003).

Por comparação, o ensaio de ELISA que utiliza a imunoglobulina M (IgM) é relativamente mais barato do que MAT e é mais sensível pois a IgM pode ser detectada mais cedo (primeira semana da doença) que a IgG e isto é importante porque a infecção pode ser identificada rapidamente, impedindo assim a progressão da doença em fase grave (XUE TING et al., 2014). Os ensaios baseados no ELISA e testes rápidos possuem suas sensibilidades e especificidades variando de 28-72% e 10-99%, respectivamente. E o desempenho varia significativamente entre regiões geográficas, indicando que estes ensaios precisam ser validados para situações epidemiológicas distintas (CHAGAS-JUNIOR et al., 2009). Ensaios de ELISA foram desenvolvidos utilizando uma ampla variedade de preparações de antígenos para anti-leptospirose com lipoproteínas recombinantes, como LipL32 (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A utilização de proteínas recombinantes tem tido resultados vantajosos no desenvolvimento de testes sorológico (ADLER, 2014).

### **2.7.3 Reação em cadeia polimerase (PCR)**

A PCR possibilita um diagnóstico rápido e direto, na fase inicial e convalescente, e que pode ser detectado através da detecção do DNA de *Leptospira*. Sua limitação é baseada no diagnóstico de leptospirose onde ocorre a incapacidade de identificar o sorotipo infectante (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). As técnicas mais frequentemente utilizadas são os ensaios de PCR em tempo real empregando sondas SYBR *Green* ou TaqMan, que são descritos em amostras de humanos, tais como análises em sangue,

soro ou urina (FERREIRA, 2014). A PCR em tempo real pode diferenciar entre bactérias patogênicas e não patogênicas e possui importantes implicações na assistência ao paciente, pois o diagnóstico pode ser feito cedo (BUDIHAL & PERWEZ, 2014). Além disso, este método pode ser utilizado em doentes que já começaram a se tratar com antibióticos (BHARTI et al., 2003).

Utilizando a técnica de qPCR é possível identificar a fonte de infecção, para distinguir os casos esporádicos de possíveis surtos (FERREIRA, 2014). Os resultados negativos não descartam a leptospirose, pois o número de organismos em uma amostra pode ser baixo, assim os resultados positivos e negativos do teste devem ser sempre interpretados em conjunto com outros métodos de diagnóstico tais como testes de anticorpos de fase aguda e de convalescença, ou o teste padrão MAT (SYKES et al., 2011).

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um teste diagnóstico nacional para leptospirose humana.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Preparação do antígeno bruto (bacterina), de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130
- Padronização do antígeno bruto em testes imunoenzimático de ELISA indireto.
- Determinar, por *checkerboard*, as concentrações ótimas de antígeno, soro humano e anticorpos anti-IgG e anti-IgM para utilização no ELISA.
- Testar soros individuais caracterizados pelo MAT e positivos e negativos para leptospirose humana.

## 4 Metodologia

### 4.1 Banco de soros

Os soros que foram testados nos testes de ELISA e MAT foram obtidos através de doações do instituto Fiocruz com sede na Bahia e de moradores da cidade de Pelotas. Os soros humanos provenientes da cidade de Pelotas, foram coletados em dois bairros específicos (Santa Teresinha e Lindóia), diretamente nos domicílios, após o consentimento de doação do material biológico. As demais amostras biológicas doadas gentilmente pela Fiocruz foram utilizadas para servir de controle no teste de ELISA de antígeno bruto. O MAT foi realizado utilizando 14 cepas de *Leptospira* separadas por duas baterias. Bateria 1: Canicola, Panama, Ponomo, Copenhageni, Cynopteri, Autumnalis, Patoc. Bateria 2: Wolfii, Bataviae, Celledoni, Guaricura, Bratislava, Mozdok 3759 (Isolado local), Tarassovi. Para o ELISA foi utilizado a bacterina de *L. interrogans* de sorovar Copenhageni.

### 4.2 Protocolo padrão da produção de antígeno Bruto

Para a produção de antígeno bruto, foi determinado à densidade celular das culturas a serem utilizadas na bacterina. As culturas que apresentam densidades semelhantes e aparências saudáveis foram combinadas e centrifugadas a 8000 *g* x por 15 minutos a 4 °C. Foi removido então o sobrenadante utilizando uma pipeta plástica. Após essa etapa foi adicionado 1 µL de PBS estéril e ressuspendido o *pellet*, adicionando posteriormente PBS até o volume original da cultura (5 mL). Foi centrifugado e repetido os passos da centrifugação até a adição do PBS ao volume original da cultura mais duas vezes (total de 3 lavagens). Após a remoção do sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em um volume menor que o desejado ao final e determinou-se a densidade celular através da contagem em câmara de Petroff Hausser. O volume final do antígeno foi ajustado e as leptospiros inativadas através de incubação a 56-60 °C por meia hora. Após a incubação foi verificada a integridade da



leptospira por microscopia de campo escuro e posteriormente aliquotada 1mL em tubos individuais, mantendo a -20 °C até a hora do uso.

### **4.3 Protocolo padrão de execução de ELISAs indireto**

Inicialmente placas de poliestireno NUNC polysorp foram sensibilizadas com 50 µL do antígeno da cepa patogênica *L. interrogans* FIOCRUZ L1-130 de sorovar Copenhageni. O antígeno foi diluído no tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e sua concentração ideal foi definida pelo *checkerboard*. Para que ocorresse a sensibilização, a placa foi incubada por 16hrs a 4 °C. Após a primeira etapa, a placa foi lavada 3x com 200 µL de PBS-Tween para posteriormente serem adicionados os soros. Os soros, cuja concentração ótima também foi definida pelo *checkerboard*, foram diluídos em tampão PBS-T e adicionados em triplicatas na placa na concentração de 1:400 (IgM-ELISA) e 1:1600 (IgG-ELISA). 50 µL da diluição foram adicionados por poço, posteriormente foi incubado em estufa por 1 hora a 37 °C. Uma segunda lavagem com PBS-T, e após, adicionados os anticorpos anti-humano podendo ser ele anti-IgG (Rockland) ou anti-IgM (Sigma) conjugados com peroxidase (50 µL por poço) nas concentrações de 1:3000 e 1:10000, respectivamente, e incubados por mais 1 hora a 37 °C. A revelação foi feita com OPD (O- fenilenodiamina) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 15 minutos no escuro, a placa foi lida no leitor de microplacas a 450nm (modelo MR-96A, Mindray).

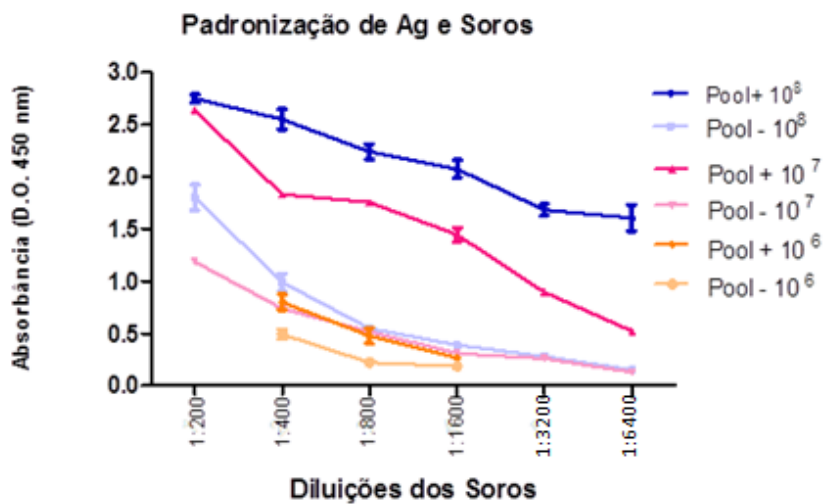
## 5 Resultados

### 5.1 Seleção inicial de antígenos

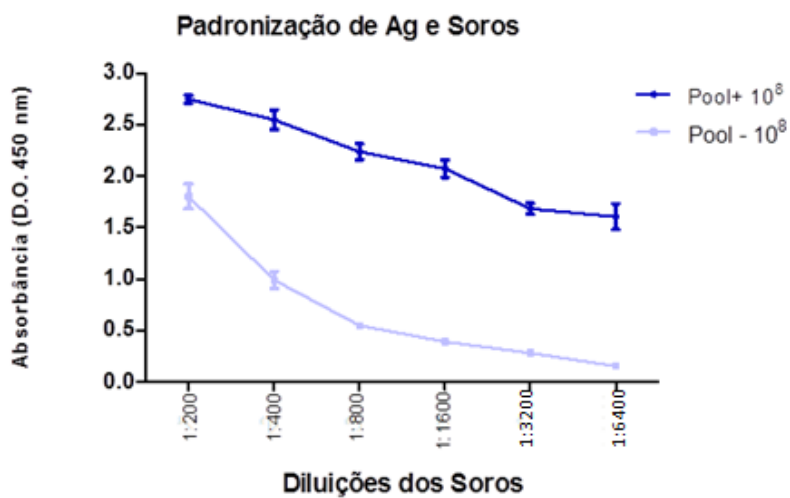
Após a bacterina ter sido inativada a 56-60 °C, foi realizada a contagem através de microscopia de campo escuro, obtendo-se uma concentração total de  $2,35 \times 10^9$  de leptospira. Os antígenos selecionados foram avaliados através de análises de *checkerboard* para o formato ELISA, visando às concentrações ótimas de antígeno, soro e anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanos. Diante dos resultados, o valor ideal escolhido para a concentração foi de  $10^7$ , sendo necessário então, diluir em tampão de sensibilização (tampão carbonato-bicarbonato) mais duas vezes.

### 5.2 Seleção da concentração ótima de antígeno, soros e anticorpo secundário IgG

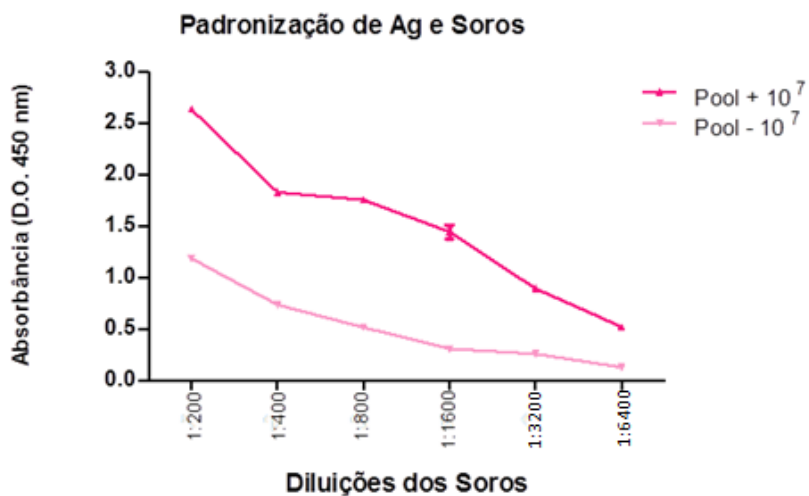
O antígeno bruto na concentração de  $10^7$  foi avaliado em diferentes diluições de *pool* de soros positivos e negativos e diferentes concentrações de conjugados com anticorpos anti-humanos IgG. Efetuaram-se diluições seriadas em escala de razão dois para os *pools* positivos e negativos nas concentrações de 1:200 até 1:6.400. Buscou-se a concentração ótima através de um procedimento conhecido como *checkerboard*, para a obtenção de uma boa especificidade da reação. As concentrações testadas do antígeno bruto foram às concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  e os resultados podem ser observados na Figura 1.



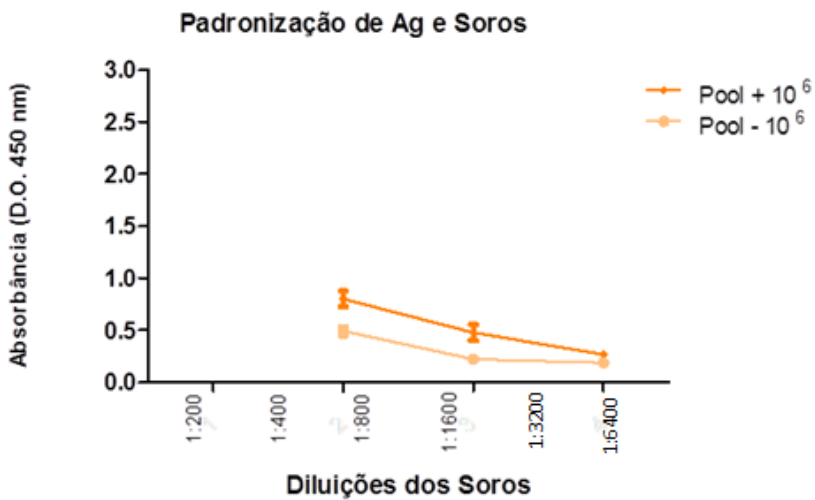
**Figura 1** Elisa com antígeno bruto no procedimento de *checkerboard* com *pool* positivo e negativo e anti-IgG na concentração de 1:2.000. Diluições seriadas em escalas geométricas de razão dois, nas diluições 1:200 até 1:6.400.



**Figura 2** Elisa com antígeno bruto no procedimento de *checkerboard* com *pool* positivo e negativo e anti-IgG na concentração de 1:2.000. Diluições seriadas em escalas geométricas de razão dois, nas diluições 1:200 até 1:6.400 e antígeno bruto na concentração de 10<sup>8</sup>.

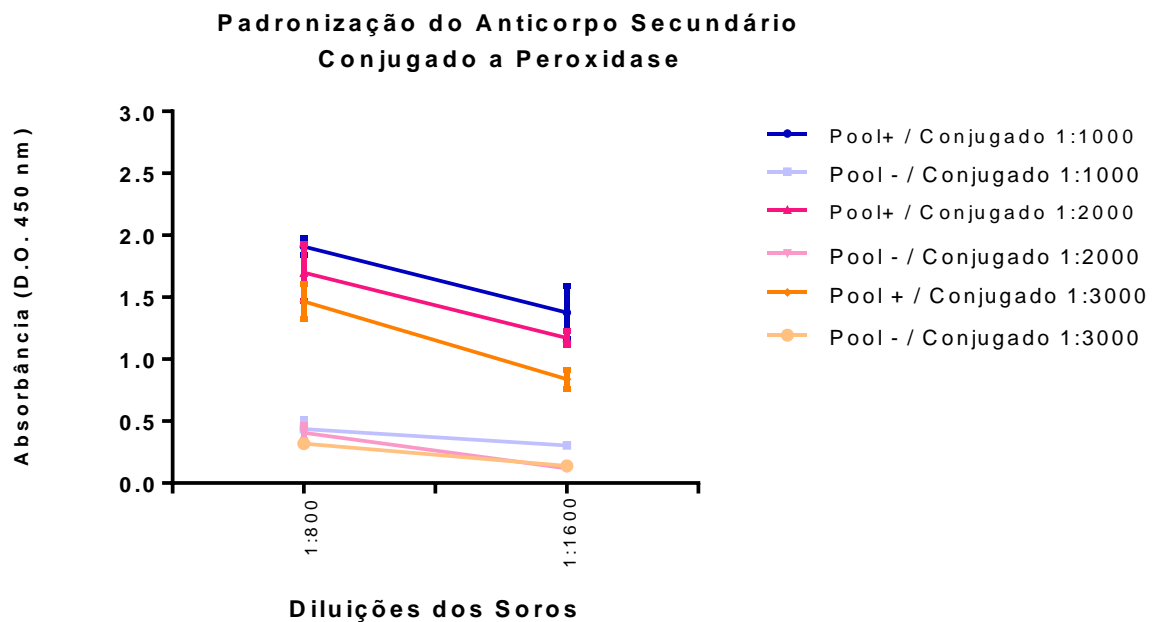


**Figura 3** Elisa com antígeno bruto no procedimento de *checkerboard* com *pool* positivo e negativo e anti-IgG na concentração de 1:2.000. Diluições seriadas em escalas geométricas de razão dois, nas diluições 1:200 até 1:6.400 e antígeno bruto na concentração de  $10^7$ .



**Figura 4** Elisa com antígeno bruto no procedimento de *checkerboard* com *pool* positivo e negativo e anti-IgG na concentração de 1:2.000. Diluições seriadas em escalas geométricas de razão dois, nas diluições 1:200 até 1:6.400 e antígeno bruto na concentração de  $10^6$ .

O valor considerado ideal foi o antígeno na concentração de  $10^7$ , devido aos baixos resultados do  $10^6$  e aos altos valores do  $10^8$  como observado na Fig.1. A concentração ótima do soro de acordo com o teste realizado foi de 1:1.600 e do conjugado 1:3.000, pois ele obteve com precisão uma diferença significativa do *pool* positivo e do negativo, como observados no Fig. 5. Nesse caso, a média da absorvância a 450 nm ( $Abs_{450}$ ) dos soros positivos é de 0,92 e dos soros negativos é de 0,18.

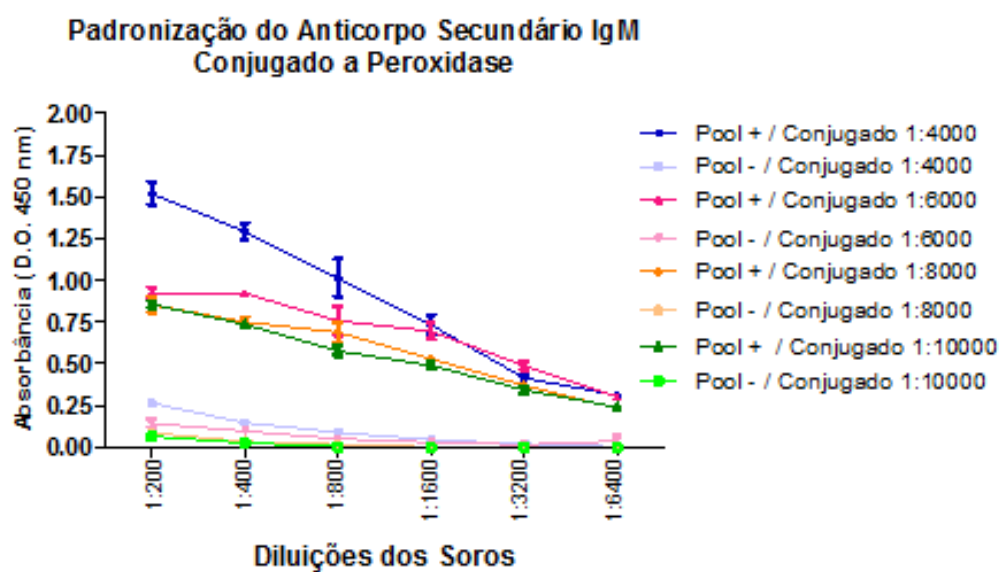


**Figura 5** Procedimento de *checkerboard* para analisar a concentração ideal do anticorpo secundário conjugado a peroxidase. As concentrações testadas foram de 1:1.000, 1:2.000 e 1:3.000.

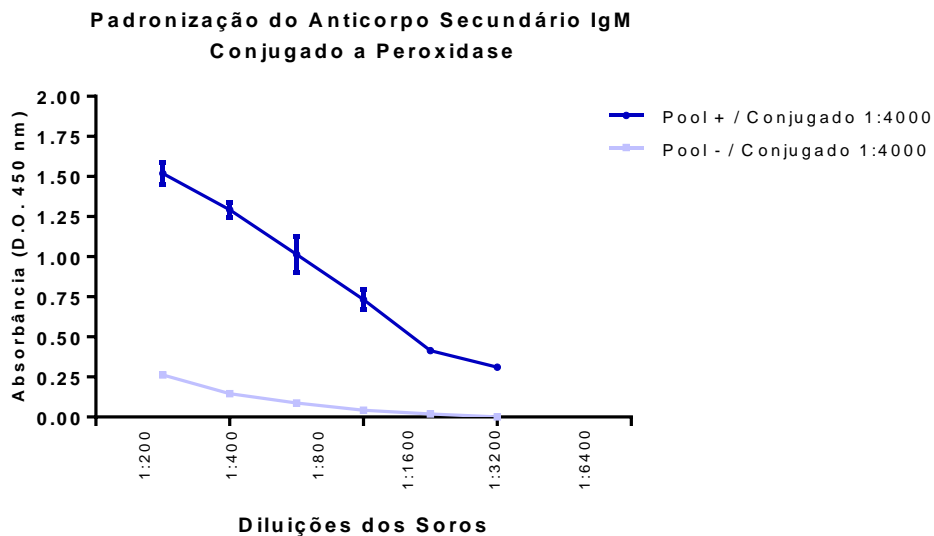
### 5.3 Seleção da concentração ótima dos soros e anticorpo secundário IgM

O antígeno bruto na concentração de  $10^7$ , anteriormente estabelecido como ideal, foi avaliado em diferentes diluições do *pool* de soros positivos e negativos e diferentes concentrações de conjugados com anticorpos anti-humanos IgM. As

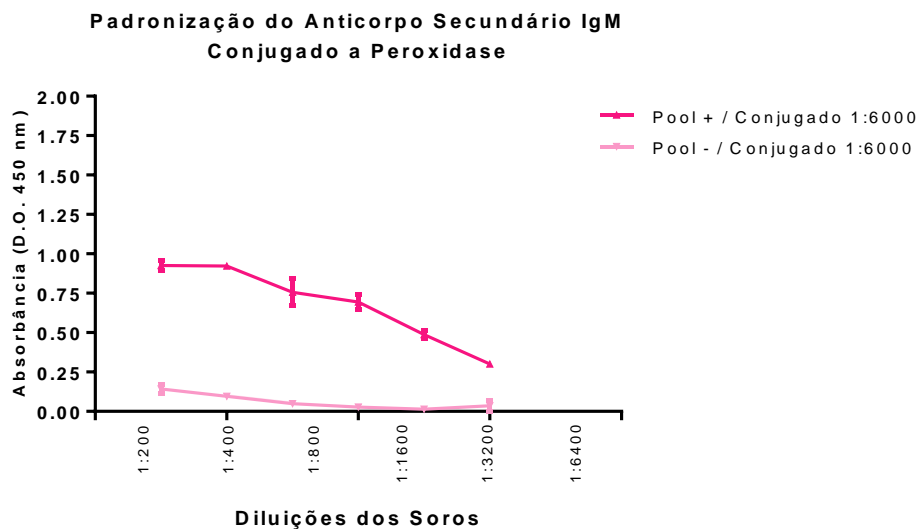
concentrações utilizadas nas diluições seriadas em escala geométrica de razão dois para os soros foram testados nas concentrações de 1:200 a 1:6.400. Já as concentrações testadas do anticorpo secundário foram de 1:4.000, 1:6.000, 1:8000 e 1:10.000. O resultado esperado é chegar à concentração ótima com o anti-IgM através do *checkerboard*, para que se tenha uma boa especificidade da reação como analisados no Figura 6.



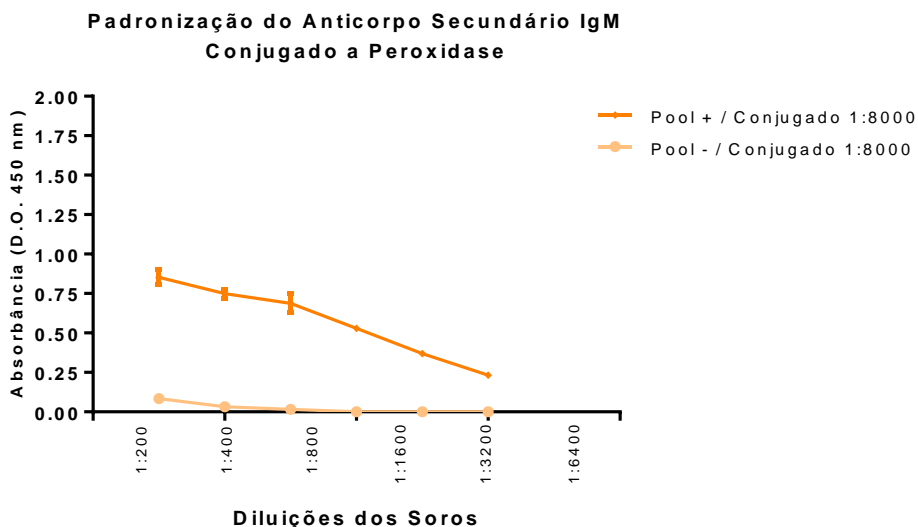
**Figura 6** *Checkerboard* para analisar a concentração ideal do *pool* de soros positivos e negativos nas concentrações de 1:200 até 1:6.400 e em diferentes concentrações de conjugado. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase estão nas concentrações de 1:4.000, 1:6.000, 1:8.000 e 1:10.000.



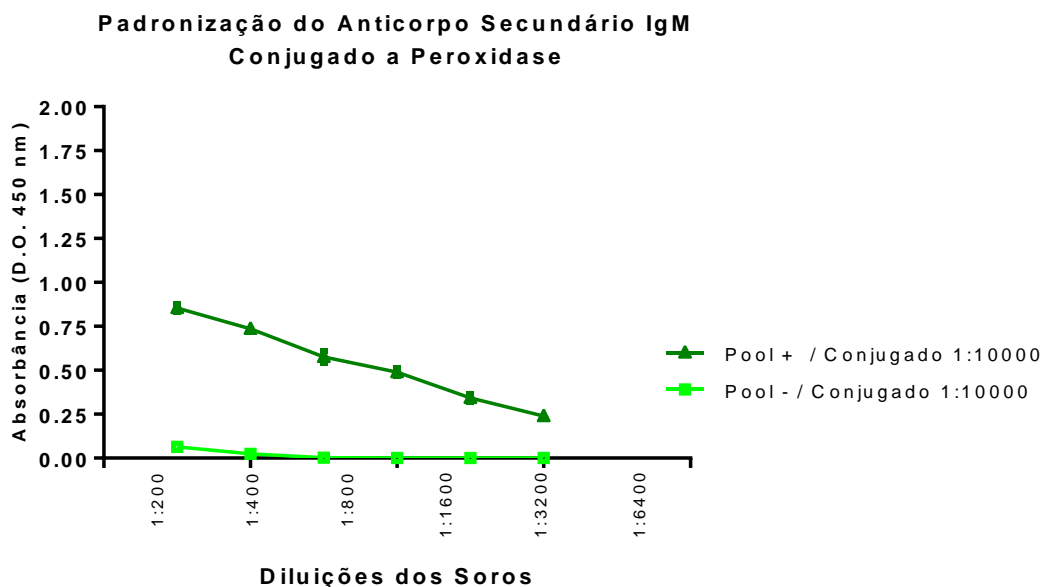
**Figura 7** *Checkerboard* para analisar a concentração ideal do *pool* de soros positivos e negativos nas concentrações de 1:200 até 1:6.400 e em diferentes concentrações de conjugado. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase estão nas concentrações de 1:4.000.



**Figura 8** *Checkerboard* para analisar a concentração ideal do *pool* de soros positivos e negativos nas concentrações de 1:200 até 1:6.400 e em diferentes concentrações de conjugado. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase estão nas concentrações de 1:6.000.



**Figura 9** *Checkerboard* para analisar a concentração ideal do *pool* de soros positivos e negativos nas concentrações de 1:200 até 1:6.400 e em diferentes concentrações de conjugado. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase estão nas concentrações de 1:8.000.



**Figura 10** *Checkerboard* para analisar a concentração ideal do *pool* de soros positivos e negativos nas concentrações de 1:200 até 1:6.400 e em diferentes concentrações de conjugado. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase estão nas concentrações de 1:10.000.

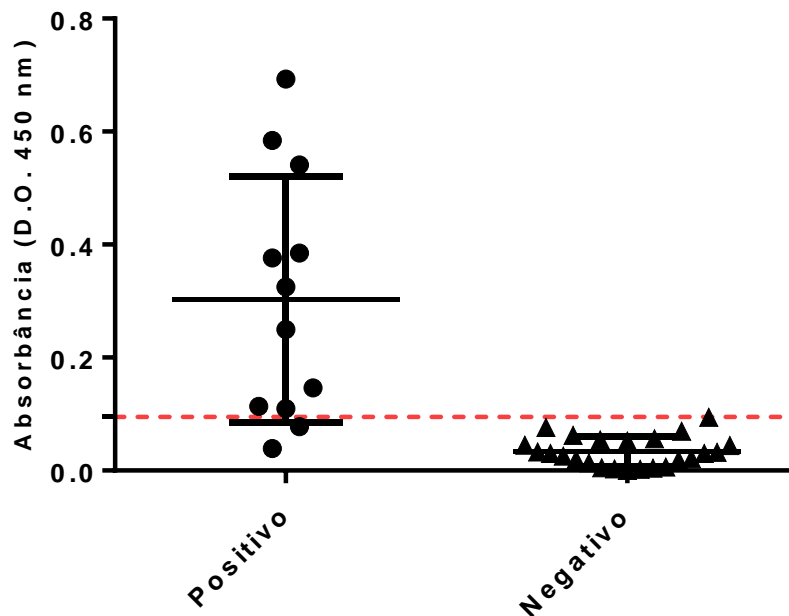
O valor considerado ideal foi o soro na diluição de 1:400 com a concentração do anticorpo secundário anti-IgM de 1:10.000. Esses resultados foram escolhidos, pois



eles obtiveram com precisão uma diferença significativa do *pool* positivo e do negativo, como observados na figura acima (Fig. 6). A média da Abs<sub>450</sub> dos soros positivos foi de 0,78 e dos soros negativos foi de 0,06.

#### 5.4 Estabelecimento do ELISA indireto utilizando o anticorpo secundário anti-IgG testando os soros individuais

Para testar a viabilidade do teste diagnóstico foram utilizados 12 soros, doados pela Fiocruz com sede na Bahia, considerados positivos e 24 soros, coletados através do projeto de vigilância ativa em Pelotas, considerados negativos. As placas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50ng de antígeno bruto na concentração  $10^7$  diluído com o tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As concentrações dos soros foram de 1:1.600 e do anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase de 1:3.000, previamente estabelecidos.

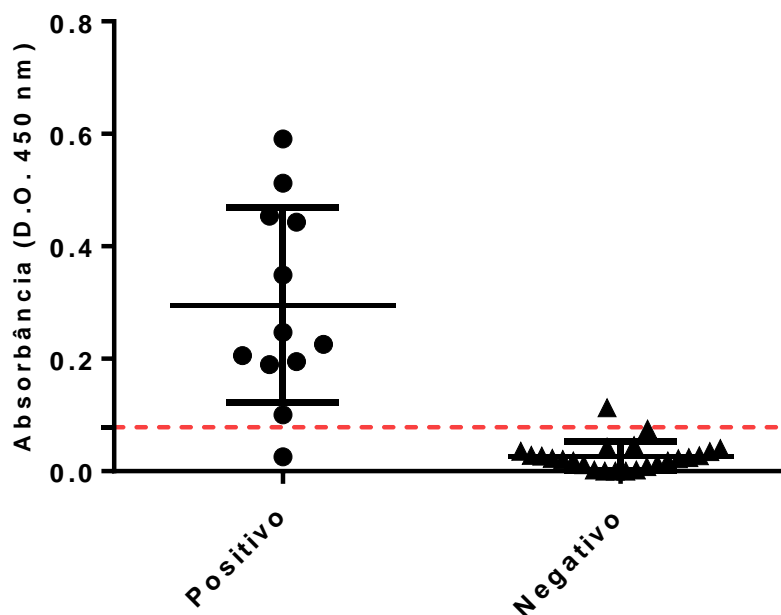


**Figura 11** Resultados dos 36 soros individuais (12 positivos e 24 negativos) testados na diluição de 1:1600 com anticorpo secundário anti-IgG.

O valor do ponto de corte foi de 0,1 (média dos negativos + 2x o desvio padrão) e está representado na Fig. 4 (linha pontilhada vermelha). Com o teste foi possível detectar 10 soros positivos (de 12 previamente confirmados pelo MAT) e 24 soros negativos (de 24 previamente confirmados pelo MAT de título  $\geq 1:100$ ). Com isso, obtiveram-se 83% de sensibilidade e 100% de especificidade.

### 5.5 Estabelecimento do ELISA indireto utilizando o anticorpo secundário anti-IgM testando os soros individuais

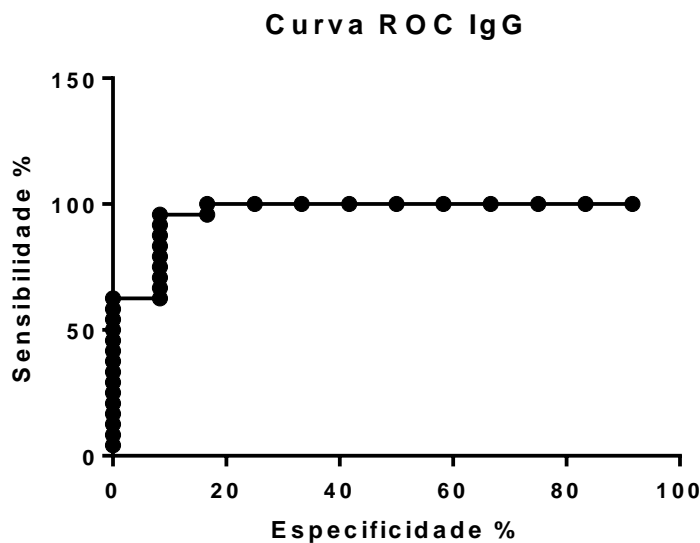
Para testar a viabilidade do teste diagnóstico os mesmos soros positivos e negativos avaliados com o anticorpo anti-humano IgG foram testados com o anticorpo anti-humano IgM. As placas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50ng de antígeno bruto na concentração  $10^7$  diluído com o tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As concentrações dos soros foram de 1:400 e do anticorpo anti-IgM conjugado à peroxidase de 1:10.000 previamente estabelecidos.



**Figura 12** Resultados dos 36 soros (12 positivos e 24 negativos) testados na diluição de 1:400 com o anticorpo secundário anti-IgM.

O ponto de corte teve o seu valor de 0,09 (média dos negativos + 2x o D.P.). Os resultados demonstram 11 soros positivos (de 12 previamente confirmados pelo MAT) e 23 soros negativos (de 24 previamente confirmados pelo MAT de título  $\geq 1:100$ ). Com isso, obtiveram-se 91,7% de sensibilidade e 95,8% de especificidade.

Neste estudo, a análise da curva ROC foi realizada utilizando os resultados encontrados, buscando a melhor especificidade e sensibilidade do teste. O ROC estabelece os melhores valores distinguindo falsos positivos e verdadeiros positivos em relação à doença (DASHTI, 2012). A especificidade e sensibilidade previamente estabelecidas utilizando IgG foi de 100% e 83%, respectivamente. Já utilizando o IgM foi possível verificar 95,8% de especificidade e 91,7% de sensibilidade. No entanto, através da curva ROC, o valor de ponto do corte pode ser selecionado arbitrariamente pelo pesquisador de acordo com seus interesses, como pode ser visto abaixo, na figura 6 e na Tabela 1. Acima do ponto de corte o indivíduo é diagnosticado como positivo para a leptospirose, e abaixo, como negativo.

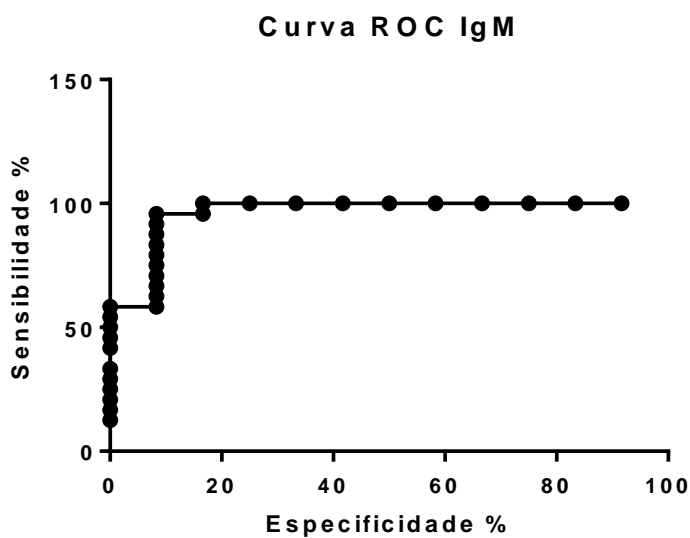


**Figura 13** Gráfico ROC mostrando os diferentes valores de sensibilidade e especificidade de acordo com seus *cut-off*. Gráfico utilizando o anticorpo anti-IgG.

**Tabela 1** Pontos de corte disponíveis para avaliação

Cut-off point	Especificidade	Sensibilidade
< 0.0360	62,50%	100,00%
< 0.07317	91,67%	91,67%
< 0.0770	95,83%	91,67%
< 0.1020	100,00%	83,33%

Como se pode observar, à medida que o *cut-off* diminui, a especificidade diminui também (DASHTI, 2012). Na escolha do valor de corte de 0.0360 a sensibilidade aumenta significativamente, chegando a 100%, no entanto, a especificidade torna-se inadequada para testes diagnósticos em áreas endêmicas.



**Figura 14** Gráfico ROC mostrando os diferentes valores de sensibilidade e especificidade de acordo com seus *cut-off*. Gráfico utilizando o anticorpo anti-IgM.

**Tabela 2** Pontos de corte disponíveis para avaliação.

<b>Cut-off point</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Sensibilidade</b>
< 0.02517	58,33%	100,00%
< 0.06033	91,67%	91,67%
< 0.08783	95,83%	91,67%
< 0.1515	100,00%	83,33%

## 6 Discussão

Devido as manifestações clínicas da leptospirose serem semelhantes a outras doenças infecciosas (febris), a especificidade de qualquer ensaio diagnóstico é muito importante (VALVERDE, 2007). No entanto, a doença continua a ser negligenciada por causa do limitado acesso ao diagnóstico, devido à dependência de métodos padrões trabalhosos e de custo alternativo de venda no mercado (MCBRIDE et al., 2007). O MAT foi classificado como teste padrão ouro por muitos investigadores, no entanto existem muitos critérios diferentes para considerar uma amostra como positiva, e os resultados em soros individuais são inadequados (FLANNERY, 2001). A rápida identificação da doença não é alcançada pelo método de microaglutinação e a necessidade de conhecimento técnico e a manutenção de vários sorovares vivos, para conseguir sensibilidade suficiente, o tornam um teste diagnóstico difícil (EFFLER et al., 2002; MURRAY et al., 2009). Portanto, um teste com base na detecção de anticorpos IgM e IgG específicos seria uma melhor escolha, uma vez que requer apenas uma amostra (VALVERDE, 2007). Além disso, os anticorpos aparecem na fase inicial, sendo um marcador quando associado a sintomas clínicos (VADO-SOLÍS, 2002; DESAKORN et al., 2012).

Autores mostraram que o ELISA obteve uma sensibilidade melhor que outros testes diagnósticos, inclusive em relação ao padrão ouro MAT na fase aguda da doença, facilitando o tratamento adequado, principal motivo da busca de um novo teste diagnóstico (WINSLOW et al., 1997; LEVETT & BRANCH, 2002; VALVERDE, 2007). Testes sorológicos competentes na fase aguda e convalescente, utilizando leptospiras inteiras, estão disponíveis comercialmente e possuem uma sensibilidade de 28-72% (MCBRIDE et al., 2007). No entanto, nem sempre a especificidade e sensibilidade atribuídas aos testes comerciais são as mesmas testadas em diferentes regiões ou com um maior número de soros (ZOCHOWSKI et al., 2001). Algumas vezes, esses valores são menores em relação aos resultados esperados, podendo gerar alguns falsos positivos e negativos. Esta discrepância pode se dar devido às reações cruzadas ou a utilização de sorovares não comumente encontradas na região local (EFFLER et al., 2002; BLACKSELL et al., 2006; VALVERDE, 2007).

Visto isso, testes brasileiros devem ser produzidos, minimizando a necessidade da importação. Então, para que seja possível o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico eficiente em uma variedade de situações epidemiológicas a leptospirose humana, é ideal que o antígeno selecionado seja conservado entre diversas espécies patogênicas de *Leptospira* (GUERREIRO et al., 2001). Em uma iniciativa para reduzir os custos associados com os testes de diagnóstico e melhorar a confirmação dos casos, a Bio-Manguinhos, desenvolveu em 2002 um teste diagnóstico de *Leptospira*, o EIE-IgM-Leptospirose, para o uso em laboratórios de saúde pública (MCBRIDE et al., 2007). No entanto, atualmente, esse teste não está mais sendo comercializado, enfatizando a necessidade de novos testes nacionais.

O ELISA executado nesse trabalho é uma boa alternativa para detecção de anticorpos anti-IgM e anti-IgG contra leptospirose. Não obstante, mais soros devem ser testados para avaliar com superioridade a viabilidade do teste. Tentativas para uma nova padronização do antígeno bruto também seriam interessante, visto que na concentração de  $10^7$  os resultados são muito altos e na concentração de  $10^6$ , muito baixos. O ideal seria que houvesse um meio termo, alcançado, talvez, através de uma sonda ou *tween* para homogeneizar as duas concentrações. Em relação às diluições dos soros do IgG-ELISA, novos resultados devem ser buscados, em razão da diluição de 1:1.600 ser muito trabalhosa para quem manipula. Como visamos um teste comercial, o mínimo de dificuldade no manuseio deve ser buscado, assim como, a busca pelo mais econômico, como altas diluições do conjugado, como relatado em algumas literaturas (DASHTI, 2012; DESAKORN et al., 2012).

No entanto, ainda assim, os resultados obtidos demonstram valores de especificidade mais altos em relação aos encontrados no mercado atualmente. É necessário averiguar em que regiões foram testadas os testes comercialmente disponíveis e quantos soros foram utilizados para viabilizá-lo, pois esses procedimentos interferem nos valores de sensibilidade e especificidade previamente estabelecida. Neste presente trabalho, ambos, IgG-ELISA e IgM-ELISA, se mostraram ser eficientes em soros na fase aguda, superando as limitações do teste padrão ouro MAT. A especificidade do teste é uma característica almejada em áreas endêmicas como é o

caso do Brasil, se tornando esse teste uma ótima opção, habilitado a ser posteriormente comercializado.



## 7 Conclusões

- IgG-ELISA obteve valores de especificidade mais altos comparados ao IgM-ELISA.

- Devido ao IgG ser uma resposta imune mais específica, a maior especificidade do teste IgG-ELISA em relação ao IgM-ELISA já era esperado.

- Para ter uma melhor validação dos resultados, novos testes devem ser realizados, buscando a análise de uma maior quantidade de soros, para que, posteriormente, o teste possa ser comercializado como produto.

## Referências Bibliográficas

- ADLER, B. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 73–81. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.055
- ADLER, B. (2014). *Leptospira and Leptospirosis*.
- ADLER, & MOCTEZUMA, D. L. P. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287–96. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- BACELO, K. L., HARTWIG, D. D., SEIXAS, F. K., SCHUCH, R., MOREIRA, A. D. S., AMARAL, M., COLLARES, T., VENDRUSCULO, C. T., MCBRIDE, A. J. a & DELLAGOSTIN, O. a. (2014). Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. *BioMed Research International*, 2014, 636491. doi:10.1155/2014/636491
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICARDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LOVETT, P.N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance, 3(December), 757–771.
- BLACKSELL, S. D., SMYTHE, L., PHETSOUVANH, R., DOHNT, M., HARTSKEERL, R., Symonds, M., SLACK, A., VONGSOUVATH, M., DAVONG, V., LATTANA, O., PHONGMANY, S., KEOLOUANGKOT, V., WHITE, N. J., Day, Nicholas P J Newton, P. N. (2006). Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* immunoglobulin M antibodies in Laos. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 13(10), 1166–9. doi:10.1128/CVI.00219-06
- BUDIHAL, S. V., & PERWEZ, K. (2014). Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(1), 199–202. doi:10.7860/JCDR/2014/6593.3950
- CHAGAS-JUNIOR, A. D., MCBRIDE, A. J. a, ATHANAZIO, D. a, FIGUEIRA, C. P., MEDEIROS, M. a, REIS, M. G., KO, A. I., MCBRIDE, F. W. C. (2009). An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 12), 1632–7. doi:10.1099/jmm.0.014050-0
- CINCO, M. (2010). New insights into the pathogenicity of leptospire: Evasion of host defences. *New Microbiologica*, 33(4), 283–292.

- COSTA, F. (2014). Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996-2005: a review of data from ministries of health. *NIH Public Access*, 32(3), 169–177.
- DASHTI. (2012). ELISA Cut-off Point for the Diagnosis of Human Brucellosis; a Comparison with Serum Agglutination Test, 37(1).
- DESAKORN, V., WUTHIEKANUN, V., THANAVCHARTWET, V., SAHASSANANDA, D., CHIERAKUL, W., APIWATTANAPORN, A., DAY, N. P., LIMMATHUROTSAKUL, D., Peacock, S. J. (2012). Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 524–7. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0423
- EFFLER, P. V, Bogard, A. K., Domen, H. Y., Katz, A. R., Higa, H. Y., & Sasaki, D. M. (2002). Evaluation of Eight Rapid Screening Tests for Acute Leptospirosis in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1464–1469. doi:10.1128/JCM.40.4.1464-1469.2002
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., & PEROLAT, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*.
- FERREIRA, A. S. (2014). Direct detection and differentiation of pathogenic leptospira species using a multi-gene targeted real time PCR approach. *PloS One*, 9(11), e112312. doi:10.1371/journal.pone.0112312
- FLANNERY, B. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis, 39(9), 3303–3310. doi:10.1128/JCM.39.9.3303
- FRAGA, T. R. (2011). Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(5), 408–19. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x
- GUERREIRO, H., Flannery, B., Mazel, M., Levett, P. N., Matsunaga, J., Galva, M., KO, A. I., Haake, D. A. (2001). Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans, 69(8), 4958–4968. doi:10.1128/IAI.69.8.4958
- KO, A. I., GOARANT, C., & PICARDEAU, M. (2009). Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(10), 736–47. doi:10.1038/nrmicro2208
- LEVETT, P. N. (2001). CONTENT ALERTS Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml> To subscribe to to another

ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>, 14(2).  
doi:10.1128/CMR.14.2.296

- LEVETT, P. N. (2003). Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis, *30333*, 447–452.
- LEVETT, P. N., & BRANCH, S. L. (2002). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin m antibodies in acute leptospirosis, *66*(6), 745–748.
- MATSUNAGA. (2005). Patoghenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. NIH Public Access, *49*(4), 929–945.
- MCBRIDE, A. J. A. (2005). Leptospirosis. Alan J.A. McBride, 376–386.
- MCBRIDE, Pereira, F. a, da Silva, E. D., de Matos, R. B., da Silva, E. D., Ferreira, A. G. P., REIS, M. G., Ko, A. I. (2007). Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Tropica*, *102*(3), 206–11.  
doi:10.1016/j.actatropica.2007.05.002
- MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HOKE, D. E., WUNDER, E. a, HENRY, R., LO, M., ZHANG, K., SERMSWAN, R. W., KO, A. I., Adler, B. (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, *77*(3), 952–8. doi:10.1128/IAI.01370-08
- PANBIO. (2008). LEPTOSPIRA IgM ELISA PANBIO, (vi), 3–6.
- PETRAKOVSKY, J., BIANCHI, A., FISUN, H., NÁJERA-AGUILAR, P., & PEREIRA, M. M. (2014). Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002-2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(10), 10770–89.  
doi:10.3390/ijerph111010770
- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULLOUDIS, A. N., DURSKI, K., & HARTSKEERL, R. a. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *78*(1), 1–8. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012
- SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2009) (pp. 1–34).
- SHARMA, S., VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, A. P., NATARAJASEENIVASAN, K., & Sehgal, S. C. (2006). Seroprevalence of leptospirosis among high-risk population of andaman islands, india, *74*(13), 278–283.

- SOUZA, V., & ARAUJO, W. N. De. (2011). Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil, *45*(6), 1–7.
- SYKES, J. E., HARTMANN, K., LUNN, K. F., MOORE, G. E., & GOLDSTEIN, R. E. (2011). ACVIM Consensus Statement, 1–13. 2010 ACVIM Consensus Statement on leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Prevention.
- TANGKANAKUL, W. (2000). Risk factors associated with leptospirosis in northeastern thailand, 1998, *63*, 204–208.
- TREVEJO, R. T. (1998). Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage—Nicaragua, 1995, (October 1995), 1457–1463.
- VADO-SOLÍS, I. (2002). Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in yucatán, méxico, *44*(6), 335–340.
- VALVERDE. (2007). Development of a Lepto-IgM EIACR test to diagnose leptospirosis in Costa Rica. *48*(3), 295–304.
- VARNI, V., RUYBAL, P., LAUTHIER, J. J., TOMASINI, N., BRIHUEGA, B., KOVAL, A., & CAIMI, K. (2014). Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *22*, 216–22. doi:10.1016/j.meegid.2013.08.002
- WAGGONER, J. J., BALASSIANO, I., ABEYNAYAKE, J., SAHOO, M. K., PINSKY, B. A., MOHAMED-HADLEY, A., LIU, Y., MAGALHA, J. (2014). Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. *PloS One*, *9*(11), e112356. doi:10.1371/journal.pone.0112356
- WINSLOW, W. E., Merry, D. J., Pirc, M. L., & Devine, P. L. (1997). Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin M Antibody in Diagnosis of Human Leptospirosis, *35*(8), 1938–1942.
- XUE TING, T., AMRAN, F., CHEE CHEONG, K., & AHMAD, N. (2014). In-house ELISA screening using a locally-isolated *Leptospira* in Malaysia: determination of its cut-off points. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1), 563. doi:10.1186/s12879-014-0563-7
- ZOCHOWSKI, W. J., PALMER, M. F., & COLEMAN, T. J. (2001). Papers An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK, 25–30.

