

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E DETECÇÃO MOLECULAR DE
LEPTOSPIRAS EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM ESTIRPES
PATOGENICAS DE *Leptospira interrogans* SOROVAR
Pomona e Canicola**

FABIO HIROTO SHIMABUKURO

BOTUCATU – SP
Setembro 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E DETECÇÃO MOLECULAR DE
LEPTOSPIRAS EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM ESTIRPES
PATOGENICAS DE *Leptospira interrogans* SOROVAR
Pomona e Canicola**

FABIO HIROTO SHIMABUKURO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio Langoni

BOTUCATU – SP

Setembro 2007

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SHIMABUKURO, FABIO HIROTO

Título: Avaliação sorológica e detecção molecular de leptospiros em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola

Data: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

**Aos meus Pais e meus Irmãos,
fontes de estímulo, crescimento,
incentivo e força para a minha
caminhada,**

**Ao Espírito Superior,
que rege as nossas vidas, pelas
oportunidades e guia do nosso
destino.**

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos e a tudo que fizeram e fazem parte da minha caminhada por essa vida, que contribuíram ou contribuem para o meu crescimento pessoal, profissional, intelectual e, o mais importante de todos, o espiritual;

Em especial, com grande carinho e consideração, ao Professor Dr. Paulo Francisco Domingues, por acreditar, confiar e compreender a minha caminhada, acima de tudo pela amizade, incentivo, força, sempre solícito e disposto para ajudar sem medir esforços para que tudo isso desse certo;

Ao professor Dr. Hélio Langoni, pelo incentivo, estímulo, confiança e por ter aberto as portas para o meu crescimento, em todos os sentidos;

Aos grandes amigos André Peres Barbosa de Castro, Leila Ullmann, Walkíria Delnero Prado, Tatiana Salerno, Simone Mangia, em especial, a Veruska Maia da Costa e Rodrigo Costa da Silva, pelos auxílios na pesquisa, grande troca de conhecimentos científicos, convivência alegre e saudável, fundamentais no meu crescimento espiritual;

Aos amigos do trabalho, na Prefeitura de São Paulo, Maria de Lourdes Moraes dos Santos, Márcia Aparecida Ridolfi, Helen de Cássia Maradei, Jarede Pereira da Silva Jr., Iara Maria Ferreira Gomes da Silva, Lucimara Meneghetti, Elane Alexandre da Silva, Américo Xavier Cortorpassi, Humberto Celso de Oliveira, Durval de Andrade Teixeira e, em especial, a Dra. Margarida Góes Magalhães, por entenderem o momento que estava e estou passando, me poupando dos desafios do trabalho, e pelo grande apoio;

Ao Professor Dr. Silvio Arruda Vasconcellos e Zenaide Maria de Moraes, por terem, gentilmente, cedido as amostras das estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans*;

Aos Professores Dr. Aristeu Vieira da Silva e Dra. Lídia Raquel de Carvalho, pelo auxílio e consultoria técnica nas análises estatísticas;

Aos amigos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, professores, funcionários, residentes e pós-graduandos, pela ótima convivência, ajuda e troca de conhecimentos;

À FAPESP, pela concessão do auxílio pesquisa, fundamental para a realização deste trabalho; e

À todas as pessoas, amigos, colegas, professores e familiares que não foram citados, mas igualmente, sempre acreditaram, torceram e me apoiaram.

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 -** Sorovares mantidos em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina “Tween 80”, no NUPEZO/FMVZ/UNESP– Botucatu-SP, utilizados na prova de soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratados (SAM) e tratados com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME). Botucatu-SP, 2007 **43**

Lista de Gráficos

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Cinética de anticorpos antileptospiras da soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola. Botucatu-SP, 2007	52
Gráfico 2 -	Cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola. Botucatu-SP, 2007	57
Gráfico 3 -	Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM* em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	59
Gráfico 4 -	Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	61
Gráfico 5 -	Cinética de anticorpos antileptospiras da soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2ME (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona. Botucatu-SP, 2007	64
Gráfico 6 -	Cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona. Botucatu-SP, 2007	66
Gráfico 7 -	Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM* em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	68

Gráfico 8 -	Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	70
--------------------	--	-----------

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de rim e fígado contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$ (linha 1); $2,0 \times 10^3$ (2); $2,0 \times 10^2$ (3); $2,0 \times 10^1$ (4); e $2,0 \times 10^0$ (5) leptospiras/mL, respectivamente. As mesmas amostras rediluídas na proporção 1:2 e retestadas, concentrações $2,0 \times 10^4$ (6); $2,0 \times 10^3$ (7); $2,0 \times 10^2$ (8); $2,0 \times 10^1$ (9); e $2,0 \times 10^0$ (10) leptospiras/mL. Extração e purificação pelo protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K. Botucatu-SP, 2007 **48**
- Figura 2 -** Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de ovário contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$ (linha 1); $2,0 \times 10^3$ (2); $2,0 \times 10^2$ (3); $2,0 \times 10^1$ (4); e $2,0 \times 10^0$ (5) leptospiras/mL. Amostras rediluídas na proporção 1:2 e retestadas, concentrações $2,0 \times 10^4$ (6); $2,0 \times 10^3$ (7); $2,0 \times 10^2$ (8); $2,0 \times 10^1$ (9); e $2,0 \times 10^0$ (10) leptospiras/mL. Extração e purificação pelo protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K. Botucatu-SP, 2007 **49**
- Figura 3 -** Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de sangue total com EDTA contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$ (linhas 1 e 5); $2,0 \times 10^3$ (2 e 6); $2,0 \times 10^2$ (3 e 7); e $2,0 \times 10^1$ (4 e 8) leptospiras/mL. Extração e purificação pelo kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®). Botucatu-SP, 2007 **49**
- Figura 4 -** Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de suspensão de tecidos (rim, fígado e ovário) contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^3$; $2,0 \times 10^2$; e $2,0 \times 10^1$ leptospiras/mL. Linhas C1, C2, C3 e C4 (amostra pura de leptospiras em água ultrapura, nas concentrações respectivas citadas acima); R1, R2, R3 e R4 (rim); F1, F2, F3 e F4 (fígado) e O1, O2, O3 e O4 (ovário). Extração e purificação pelo kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®). Botucatu-SP, 2007 **50**

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita pós inoculação. Botucatu-SP, 2007	51
Tabela 2 -	Ocorrência de resultados falso-negativos no título 50 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com os títulos sorológicos máximos obtidos. Botucatu-SP, 2007	53
Tabela 3 -	Ocorrência de resultados falso-negativos no título 50 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com o período de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	53
Tabela 4 -	Ocorrência de resultados falso-negativos no título 100 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com os títulos sorológicos máximos obtidos. Botucatu-SP, 2007	54
Tabela 5 -	Ocorrência de resultados falso-negativos no título 100 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com período de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	54
Tabela 6 -	Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita. Botucatu-SP, 2007	56

Tabela 7 -	Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) antileptospiras de amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	58
Tabela 8 -	Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Canicola de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	59
Tabela 9 -	Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Canicola de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	60
Tabela 10 -	Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Canicola de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	61
Tabela 11 -	Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2ME (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Botucatu-SP, 2007	63
Tabela 12 -	Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Botucatu-SP, 2007	65

Tabela 13 -	Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	67
Tabela 14 -	Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	68
Tabela 15 -	Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	69
Tabela 16 -	Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007	70
Tabela 17 -	Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita pós inoculação. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu-SP, 2007	91

Tabela 18 -	Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu-SP, 2007	92
Tabela 19 -	Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2ME (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu-SP, 2007	93
Tabela 20 -	Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu - SP, 2007	94

Lista de Abreviaturas e
Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	= porcentagem
2ME	= 2-mercaptoetanol
ASC	= área sob curva
DNA	= ácido desoxirribonucléico
dpi	= dia pós inoculação
EDTA	= ácido etilenodiamino tetra-acético
EMJH	= meio de Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris
g	= grama
log	= logarítmico
M	= molar
mL	= mililitro
°C	= grau Celsius
pb	= pares de base
PCR	= reação em cadeia pela polimerase
PM	= peso molecular
RIFI-IgG	= reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG
RIFI-IgM	= reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM
SAM	= soroaglutinação microscópica
SAM-2ME	= soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2-mercaptoetanol
SAM-IgM	= resultado da diferença entre a SAM e SAM-2ME
SST	= solução salina tamponada de fosfatos
V	= volts
xg	= vezes a gravidade
μL	= microlitro

Sumário

Sumário

1	Introdução.....	29
2	Revisão da Literatura.....	31
3	Objetivos.....	37
4	Material e Métodos	39
4.1	Delineamento experimental.....	40
4.2	Estirpes patogênicas de <i>Leptospira interrogans</i>	41
4.3	Colheita das amostras.....	41
4.3.1	Sangue	41
4.3.2	Amostras teciduais.....	42
4.4	Métodos diagnósticos.....	42
4.4.1	Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	42
4.4.2	Soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME).....	44
4.4.3	Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM e IgG (RIFI-IgM e RIFI-IgG)	44
4.4.4	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	44
4.4.4.1	Extração e purificação de DNA.....	44
4.4.4.2	Amplificação de DNA	45
4.4.4.3	Visualização dos produtos da PCR.....	45
4.4.4.4	Controles.....	46
4.4.4.5	Sensibilidade analítica	46
4.5	Análise estatística	46
5	Resultados.....	47
5.1	Animais de experimentação	48
5.2	Sensibilidade analítica da PCR	48
5.3	Camundongos inoculados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola.....	50

5.3.1 SAM e SAM-2ME (Canicola)	50
5.3.1.1 Resultados falso-negativos na SAM (Efeito prozona).....	53
5.3.2 RIFI-IgM e RIFI-IgG (Canicola).....	54
5.3.3 Comparação dos resultados sorológicos (Canicola)	57
5.3.4 PCR (Canicola)	62
5.4 Camundongos inoculados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona	62
5.4.1 SAM e SAM-2ME (Pomona).....	62
5.4.2 RIFI-IgM e RIFI-IgG (Pomona)	64
5.4.3 Comparação dos resultados sorológicos (Pomona).....	66
5.4.4 PCR (Pomona).....	71
6 <i>Discussão</i>	72
6.1 Animais de experimentação	73
6.2 Sensibilidade analítica da PCR	73
6.3 Camundongos inoculados com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola.....	74
6.3.1 Provas sorológicas.....	74
6.3.2 Resultados falso-negativos na SAM para o sorovar Canicola	76
6.3.3 PCR.....	77
6.4 Camundongos inoculados com <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona	77
6.4.1 Provas sorológicas.....	77
6.4.2 PCR.....	79
6.5 Avaliação da resposta sorológica entre as duas estirpes estudadas	80
7 <i>Conclusões</i>	81
8 <i>Referências Bibliográficas</i>	83
Anexos.....	90
Apêndices.....	98

Resumo

Resumo

SHIMABUKURO, F.H. Avaliação sorológica e detecção molecular de leptospiros em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola. **Botucatu, 2007. 100p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.**

Camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola foram avaliados quanto à produção de anticorpos antileptospiros e distribuição do microrganismo em tecidos, em diferentes momentos após infecção. A técnica de soroaglutinação microscópica foi avaliada após tratamento das amostras de soro com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), e pela comparação do seu resultado com as respectivas amostras não tratadas (SAM) foi possível determinar a presença de anticorpos da classe IgM e, dessa forma, diferenciar a fase da infecção. Pela SAM, não houve reação para qualquer outro sorovar testado, diferente do homólogo inoculado, podendo indicar resposta imunológica específica em camundongos para os sorovares inoculados experimentalmente. Em relação à distribuição do microrganismo nos tecidos, pesquisado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), observou-se que os camundongos infectados não apresentaram fase de leptospiremia, e não houve colonização renal e ovariana, sugerindo que esses animais, talvez, não participem de forma importante na epidemiologia da leptospirose para os sorovares Pomona e Canicola.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*, *Mus musculus*, PCR, reação de imunofluorescência indireta, soroaglutinação microscópica.

Abstracts

SHIMABUKURO, F.H. Serological evaluation and molecular detection of leptospires in tissues of mice, experimentally infected with pathogenic strains of *Leptospira interrogans* serovar Pomona and Canicola. **Botucatu, 2007. 100p. Thesis (Doctor) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Campus of Botucatu, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.**

Experimentally infected mice with pathogenic strains of *Leptospira interrogans* serovar Pomona and Canicola were evaluated to anti-leptospiral antibodies production and to verify the distribution of the microorganism in tissues in different moments of the infection. Microscopic agglutination test was evaluated after treatment of the sera samples with 2-mercatthoethanol (MAT-2ME), and by the comparison of its results with the respective samples not-treated (MAT) was possible to determine the presence of IgM antibodies and, thus, to differentiate the stage of infection. MAT does not present reaction for any other serovar tested, different the homologous serovar inoculated, indicating specific immunological response in mice to the experimentally inoculated serovars. In relation to the distribution of the microorganism in the tissues detected by polymerase chain reaction (PCR), the infected mice didn't present leptospiremia, and there was not renal and ovarian colonization, suggesting that these animals, maybe do not participate of the epidemiology of leptospirosis to the serovar Pomona and Canicola.

Key words: *Leptospira interrogans*, *Mus musculus*, PCR, Indirect fluorescent antibody test, microscopic agglutination test.

Introdução

1 Introdução

Zoonose de distribuição e importância mundial, a leptospirose tem assumido papel relevante entre as enfermidades consideradas emergentes e reemergentes (BHARADWAJ, 2004). O agente etiológico pertence ao gênero *Leptospira*, possuindo inúmeras espécies e sorovariantes (sorovares) (LEVETT, 2001).

Os principais reservatórios são os animais domésticos e silvestres, com destaque para os roedores que representam importante fonte de infecção na maioria dos ciclos epidemiológicos da doença (SEIJO et al., 2002).

Devido à gravidade em humanos e animais de companhia, bem como às perdas econômicas em animais de produção, o diagnóstico rápido e preciso é fundamental como estratégia de controle. A soroaglutinação microscópica (SAM), prova sorológica de referência mundial, embora sensível e específica na detecção de anticorpos antileptospiras, muitas vezes não estabelece diagnóstico conclusivo e definitivo; além de não determinar a fase da infecção ou doença por não diferenciar as classes de anticorpos (BRASIL, 1995; O'KEEFE, 2002; LEVETT, 2004).

Nesse contexto, a pesquisa de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans*, observando a cinética de anticorpos durante diferentes momentos da infecção, avaliada pelas técnicas de reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) e pela soroaglutinação microscópica em soros tratados e não tratados com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME e SAM, respectivamente), assumindo o último como teste de referência; e a pesquisa da distribuição de leptospiras em diferentes tecidos, acompanhando a evolução da infecção, podem ser úteis para a avaliação sorológica e o conhecimento do comportamento desses animais em estudos epidemiológicos.

Revisão da Literatura

2 Revisão da literatura

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa de distribuição mundial, causada por espiroquetídio do gênero *Leptospira*. Ocorrem sob a forma endêmica ou em surtos em humanos em diversos países, principalmente os de clima tropical, subtropical, subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (SEIJO et al., 2002; SACSAQUISPE-CONTRERAS et al., 2003).

Nos países desenvolvidos é considerada zoonose emergente ou reemergente (BHARADWAJ, 2004), ocasionando surtos epidêmicos, principalmente relacionados a determinadas atividades de lazer e esporte (TRUBO, 2001).

O gênero *Leptospira*, segundo proposta do Center for Disease Control dos EUA (CDC), é dividido em 16 genomespécies, compreendendo mais de 200 sorovariantes (sorovares) patogênicos e cerca de 60 sorovares saprófitas, agrupados em 24 sorogrupos conhecidos (LEVETT, 2001).

A doença/infecção acomete diversos animais domésticos e silvestres, que se tornam portadores renais e potenciais disseminadores do agente no ambiente pela eliminação na urina (SHARMA et al., 2003). Embora alguns sorovares tenham predileção por determinados reservatórios ou espécies (BHARTI et al., 2003), todos os animais são suscetíveis à infecção por qualquer uma das variantes sorológicas.

O hospedeiro infectado por um sorovar adaptado (hospedeiro natural), não desenvolve ou apresenta forma discreta da doença. Entretanto, torna-se portador renal por longo período de tempo. Já os animais infectados por um sorovar não adaptado (hospedeiros acidentais) podem apresentar sintomas graves, embora a fase de portador renal, na convalescência, ocorra por período curto (VANASCO et al., 2003).

Os roedores são reservatórios naturais de determinados sorovares patogênicos de *Leptospira* spp., sendo incriminados como principais fontes de infecção em muitos ciclos epidemiológicos da doença. Este fato é aventado em estudos envolvendo cães (LOPES et al., 2005), suínos (SHIMABUKURO et al., 2003) e humanos (JOHNSON et al., 2004), embora, algumas pesquisas indiquem considerações contrárias, de forma geral, ou específica para alguns sorovares (MORALES et al., 1978; SHARMA et al., 2003; BEVILACQUA et al., 2004).

Há três principais roedores sinantrópicos, distribuídos mundialmente, associados à infecção leptospírica: *Rattus norvegicus* (ratazana-de-esgoto), *Rattus rattus* (rato-de-telhado) e *Mus musculus* (camundongo doméstico), constituindo as espécies mais importantes na transmissão do agente para humanos e animais domésticos (SACSAQUISPE-CONTRERAS et al., 2003).

Alterações renais podem ou não estar associadas à leptospirose em algumas espécies de roedores domésticos e silvestres (ROSSETTI et al., 2004), mas estes animais, geralmente, quando infectados por sorovares adaptados, não apresentam a doença, tornando-se cronicamente infectados e eliminando o agente por períodos longos de tempo e mesmo pelo resto de suas vidas (O'KEEFE, 2002).

O hamster (*Mesocricetus auratus*), exceção entre os roedores, tem sido de escolha como modelo biológico para estudos da etiopatogenia (LANGONI et al., 2001; MACEDO et al., 2004), por serem sensíveis às leptospirosas patogênicas e apresentarem sinais clínicos semelhantes aos humanos.

Nesse sentido, o uso de animais de experimentação tem sido útil no estudo de enfermidades infecciosas, como a leptospirose, onde ainda há muitas questões sobre a epidemiologia e etiopatogenia a serem esclarecidas (CAMARGO et al., 1993). Embora pesquisas em animais naturalmente infectados possam ser utilizadas para desvendar algumas dessas dúvidas, elas não conseguem determinar com exatidão o comportamento tanto dos animais infectados como do agente etiológico durante os diferentes estágios de infecção ou doença, sendo necessário estudos continuados sobre o assunto (FREITAS et al., 2004).

Nas pesquisas epidemiológicas, *M. musculus* e *R. rattus* podem representar bons modelos biológicos para estudos de comportamento e cinética de anticorpos (MARINHO et al., 2003; KOIZUMI & WATANABE, 2003), pois exibem certa resistência e estão entre as principais fontes de infecção nos ciclos epidemiológicos da leptospirose. Em especial, o camundongo doméstico parece ter papel importante, apresentando altas taxas de infecção para determinados sorovares (COLLARES-PEREIRA et al., 2000; VANASCO et al., 2003; TURK et al., 2003; ROSSETTI et al., 2004).

Os camundongos estão incriminados como reservatórios para sorovares específicos, como Bim (camundongos domésticos) e Ballum (camundongos silvestres) (BHARTI et al., 2003). Estudos epidemiológicos têm mostrado esta especificidade entre alguns sorovares e espécies de roedores. O sorogrupo

Icterohaemorrhagiae tem sido associado à infecção em *R. norvegicus* e *R. rattus* (MORALES et al., 1978), e o sorogrupo Ballum com *M. musculus* (BHARTI et al., 2003).

Entretanto, a importância dessas espécies e de outros roedores como reservatórios de sorovares considerados não adaptados, não está bem definida, existindo estudos onde o microrganismo não foi detectado nesses animais. Bevilacqua et al. (2004) pesquisando a presença de leptospiros em fragmentos renais e anticorpos antileptospiros em amostras de soro de roedores domésticos e silvestres capturados em um Hospital Veterinário e fragmento de mata nativa da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, não encontraram animais positivos, sugerindo que as espécies silvestres capturadas, aparentemente não representam reservatórios da leptospirose.

Estudo realizado na Colômbia, em granja suína com problemas reprodutivos causado pelo sorovar Pomona e com alta taxa de infestação de ratazanas demonstrou a importância desses roedores na manutenção do sorovar Icterohaemorrhagiae, mas não na epidemiologia do Pomona, embora um animal pesquisado tenha apresentado colonização renal por este sorovar (MORALES et al., 1978).

Devido à gravidade e similaridade de sintomas com outras doenças infecciosas como a dengue, febres hemorrágicas de origem desconhecida e hantavirose em humanos, bem como a importância econômica em animais de produção, o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico para a leptospirose humana e animal tem valor inegável.

A leptospirose pode ser diagnosticada por diversas provas sorológicas e o agente ser detectado em tecidos pelo isolamento em meios de cultura e, mais recentemente, por provas de biologia molecular, especialmente a prova de reação em cadeia pela polimerase (PCR) (FONSECA et al., 2006).

A soroaglutinação microscópica (SAM) é a prova de referência no diagnóstico da leptospirose animal e humana, detectando anticorpos antileptospiros das classes IgM e IgG (CRAWFORD, 1972b), entretanto, sem diferenciá-los. Tal fato tem dificultado a interpretação do seu resultado, sendo necessária a comparação com uma segunda amostra de soro colhidas 10 a 14 dias após a primeira, para acompanhar a elevação de títulos de anticorpos aglutinantes.

Além disso, devido a baixa especificidade antigênica e por apresentarem resposta a antígenos gênero-específicos (FAIRBROTHER, 1985), os anticorpos da classe IgM são responsáveis por reações cruzadas entre sorovares do mesmo sorogrupo e de sorogrupos diferentes, dificultando a distinção do sorovar infectante.

Os anticorpos da classe IgM são associados a fase aguda da doença, enquanto que os da classe IgG, com a fase de convalescência (THIERMANN, 1980). Experimentos demonstraram que a atividade de anticorpos da classe IgM no soro pode ser inativada pela ação do 2-mercaptoetanol (2ME), sem afetar a atividade dos anticorpos IgG (CRAWFORD, 1972a). O 2ME inativa a ação aglutinante da IgM pela redução das pontes dissulfídricas da sua estrutura pentamérica, degradando-a em cinco sub-unidades não aglutinantes (FERRI et al., 1977).

O uso do 2ME tem sido útil para identificar anticorpos da fase aguda e crônica em cães pela SAM (THIERMANN, 1980), para determinar o provável sorovar infectante sem interferência das reações cruzadas em leitões e vacas (AWAD-MASALMEH & WILLINGER, 1983; FAIRBROTHER, 1985), e indicar infecção recente em bovinos (ODONTSETSEG et al., 2005).

Outras provas sorológicas como o ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido amplamente utilizado como teste gênero-específico em pesquisa humana para detecção de anticorpos da classe IgM, apresentando-se mais sensível do que a SAM na fase inicial da doença (RIBEIRO et al., 1995; SAMBASIVA et al., 2003; LEVETT, 2004; OOTEMAN et al., 2006). Entretanto, em alguns casos, o seu uso tem se mostrado limitado pela dificuldade na padronização do antígeno (RIBEIRO, 2003; BHARADWAJ, 2004) e apresenta menor sensibilidade na detecção de anticorpos IgG do que a SAM (BERCOVICH et al., 1990).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) não tem sido um teste amplamente utilizado, embora seja rápido e confiável na detecção de anticorpos antileptospiras (SAMBASIVA et al., 2003). Comparada a soroaglutinação microscópica (SAM) a RIFI tem apresentado sensibilidade e especificidade moderada na fase inicial da leptospirose, mas pode ser útil para diferenciar anticorpos de classes diferentes (APPASSAKIJ et al., 1995).

Em pesquisas epidemiológicas, o ELISA tem sido associado à prova de soroaglutinação microscópica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003) e reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico de leptospirose animal (BANDA-RUIZ et al., 2005).

A comparação entre testes sorológicos e a detecção de leptospiros pelo isolamento em meio de cultura ou pela PCR tem resultado em uma baixa concordância, talvez pelo curto período de eliminação de leptospiros na urina, permanecendo apenas os anticorpos como evidências de uma infecção prévia, principalmente por sorovares não adaptados ao hospedeiro (VANASCO et al., 2003).

Na detecção de leptospiros em amostras clínicas a PCR revelou baixo limiar de detecção, aproximadamente 10 microrganismos por mililitro de amostra (MÉRIEN et al., 1992) e quando comparada a outras técnicas, como imunofluorescência direta, demonstrou uma sensibilidade igual ou superior e especificidade alta (O'KEEFE, 2002).

Em pesquisa realizada em roedores silvestres, o resultado da PCR foi superior à demonstração do agente pelo isolamento em meio de cultura (CHO et al., 1998). A sua utilização em associação com provas sorológicas tem mostrado um papel importante em estudos epidemiológicos da doença por diagnosticar precocemente a infecção na fase inicial quando os anticorpos ainda não são detectados.

Nesse sentido, o conhecimento do comportamento do reservatório/hospedeiro e do agente etiológico, acompanhando os momentos da infecção ou doença por diferentes métodos de diagnóstico podem ser importantes para o esclarecimento da relação hospedeiro-microrganismo e o desenvolvimento de novas técnicas ou variações delas para estabelecer um resultado confiável e preciso.

Objetivos

3 Objetivos

Objetivos Gerais:

- ✓ Determinar a cinética de anticorpos antileptospiras durante diferentes momentos da infecção, avaliada pelas técnicas de soroaglutinação microscópica em soros tratados e não tratados com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME e SAM, respectivamente) e reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG);
- ✓ Determinar a distribuição de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola em diferentes tecidos de camundongos, acompanhando a evolução da infecção.

Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a técnica de soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), comparando-a a SAM e a RIFI-IgM para determinar a presença de anticorpos IgM e diferenciar a fase da infecção;
- ✓ Determinar a distribuição de *L. interrogans* sorovar Pomona e Canicola em tecidos, especialmente dos rins e dos ovários, pela prova de reação em cadeia pela polimerase (PCR);
- ✓ Acompanhar a evolução do estágio de portador renal e/ou reprodutivo para as estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola;
- ✓ Determinar a relação entre as provas sorológicas e a detecção de leptospiras pela PCR em diferentes momentos da infecção.

Material e Métodos

4 Material e métodos

4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 120 camundongos fêmeas Swiss/Uni, isogênicos, albinos, entre quatro e seis semanas de idade, com cerca de 30 a 40g, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB)/UNICAMP-Campinas-SP. A manutenção dos animais inoculados e o processamento das amostras foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)/UNESP–Botucatu-SP, no período de agosto de 2006 a abril de 2007.

A pesquisa foi realizada utilizando-se duas estirpes conhecidamente patogênicas para hamsters de *Leptospira interrogans*, a saber: *L. interrogans* sorovar Canicola, isolada de fígado suíno, em Londrina-PR (FREITAS et al., 2004); e *L. interrogans* sorovar Pomona, estirpe Fromm, mantida no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)/USP–São Paulo-SP, desde o final da década de 1980. Ambas, gentilmente, cedidas pelo citado Laboratório.

Para cada estirpe foram utilizados 60 animais. Cada conjunto de 60 animais foi dividido em três grupos com 20 camundongos cada, 14 inoculados com a respectiva estirpe patogênica e seis inoculados com amostra de meio de EMJH estéril, como controle-negativo. Para acompanhamento sorológico foram colhidas amostras de sangue inicialmente em períodos curtos de dias até a segunda semana, em seguida, semanalmente até o dia 77, e após, a cada 14 dias até o final do experimento (2, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 91, 105, 119, 133, 147, 161, 175).

A pesquisa de leptospiros pela PCR foi realizada inicialmente em períodos curtos de dias até a segunda semana, em seguida, semanalmente até o dia 35, e após, nos dias 91 e 175 pós inoculação (2, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 91 e 175) em amostras sanguíneas; e semanalmente até o dia 35, e nos dias 91 e 175 pós inoculação em amostras teciduais (7, 14, 21, 28, 35, 91 e 175).

Em cada colheita de amostras foram escolhidos, aleatoriamente, cinco animais inoculados com a respectiva estirpe patogênica e dois controles negativos, sem repetição dos animais escolhidos até a colheita do 28º dia pós inoculação (dpi). Após esta data foi realizado o revezamento dos animais para colheita das amostras.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno 41x34x16cm (comprimento x largura x altura) com piso de aço inoxidável gradeado coberto com maravalha autoclavada e fornecimento de ração comercial e água potável, “ad libitum”.

4.2 Estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans*

As estirpes *L. interrogans* sorovar Canicola e *L. interrogans* sorovar Pomona foram mantidas no NUPEZO por passagens alternadas em hamsters e meio de cultura semi-sólido de Fletcher. Para a preparação dos inóculos, as estirpes foram repicadas em meio líquido de EMJH e após o crescimento, as leptospiras foram contadas em microscopia de campo escuro, sendo o volume final do inóculo ajustado para 1,5 a $2,5 \times 10^5$ microrganismos/mL (20 a 30 leptospiras por campo escuro em aumento de 400X, microscópio de campo escuro, Jena-Carl Zeiss®). A infecção experimental foi realizada via intraperitonal, com 0,5mL do inóculo para cada animal.

4.3 Colheita das amostras

4.3.1 Sangue

Foram colhidos 0,5mL de sangue por punção do plexo venoso retro-orbital dos animais, com uso de tubos capilares e em microtubos de plástico de 1,5mL sem EDTA. Quando necessário foi colhido 0,3mL de sangue em microtubo contendo EDTA 10%, na proporção de 20µL/mL de sangue. As amostras de sangue sem EDTA foram dessoradas após retração do coágulo e centrifugação a 2500xg por dez minutos, acondicionando-se os soros em novos microtubos de plástico de 1,5mL, mantidos em freezer a -20°C até o momento da realização das provas sorológicas. As amostras sanguíneas contendo EDTA foram imediatamente congeladas em freezer a -80°C para posterior processamento pela PCR.

4.3.2 Amostras teciduais

As amostras teciduais de rins, fígado e ovários foram obtidas de forma asséptica, após a eutanásia dos animais em câmara saturada de vapor de isoflurano. Em seguida foram maceradas em gral com pistilo, separadamente, e suspensas em água ultrapura, na proporção aproximada de 1:5 para rins e fígado, e 1:10 para ovários, sendo acondicionadas em microtubos de plásticos de 1,5mL e congeladas a -80°C até o momento do processamento.

4.4 Métodos diagnósticos

Todas as amostras sorológicas foram testadas pelas provas de SAM, SAM-2ME, RIFI-IgM e RIFI-IgG para pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM.

4.4.1 Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Para a prova de soroaglutinação microscópica seguiu-se as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995), utilizando-se 24 sorovares de *Leptospira* spp. em culturas vivas com sete dias de crescimento em meio líquido de EMJH, diluídas na proporção 1:3 em solução salina tamponada de fosfatos (SST) 0,01M pH7,2 (Quadro 1).

Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50, e testada para todos os sorovares, considerando-se positivas aquelas que apresentaram 50% ou mais de aglutinação em relação ao controle. As amostras positivas para o título inicial foram novamente diluídas, sucessivamente, na razão dois e testada(s) para o(s) sorovar(es) que reagiu(ram) anteriormente. O título final corresponde à recíproca da maior diluição do soro que apresentava 50% de aglutinação.

Quadro 1 – Sorovares mantidos em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina “Tween 80”, no NUPEZO*/FMVZ/UNESP–Botucatu-SP, utilizados na prova de soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratados (SAM) e tratados com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME). Botucatu-SP, 2007

SOROGRUPO	SOROVAR
Australis	Australis
	Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
	Butembo
Ballum	Castellonis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Whitcombi
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
	Sentot
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae
Javanica	Javanica
Panama	Panama
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo
	Wolffi
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi
Seramanga	Patoc

* NUPEZO – Núcleo de Pesquisas em Zoonoses

4.4.2 Soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME)

Uma alíquota de cada soro reagente na prova de SAM foi tratada com igual volume de 2-mercaptoetanol 0,2M, diluída em SST 0,01M pH7,2, e incubada por duas horas a 37°C (adaptado de Crawford, 1972a) e testada pela SAM, como descrito anteriormente.

4.4.3 Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM e IgG (RIFI-IgM e RIFI-IgG)

A RIFI foi realizada em lâminas para imunofluorescência com 12 círculos, sensibilizados com o antígeno homólogo de cada sorovar inoculado, a partir de cultura pura em meio de EMJH com sete dias de crescimento, diluído na proporção 1:2 com SST 0,01 pH7,2, colocando-se 10µL do antígeno em cada círculo e aspirando-se o excesso após alguns minutos, deixando uma camada fina nos círculos, deixando secar em temperatura de 28°C. Cada amostra de soro foi diluída inicialmente na proporção 1:50 com SST 0,01 pH7,2 e testada nas lâminas sensibilizadas com o antígeno, incubando-se em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com SST 0,01 pH7,2 por dez minutos.

Os conjugados anti-IgG mouse-FITC e anti-IgM mouse-FITC (Sigma-Audrich, EUA), foram diluídos na proporção de 1:50 e 1:30 em solução de azul de Evans, respectivamente. As soluções dos conjugados foram adicionadas às lâminas, incubando-se por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, e após, lavando-se duas vezes com SST 0,01 pH7,2 por dez minutos. As lâminas foram secas e procedeu-se a leitura em microscopia de fluorescência (microscópio Zeiss SH250 - Zeiss®). As amostras reagentes foram diluídas na razão dois, e retestadas conforme descrição anterior, considerando-se como título final, aquele em que as leptospiros ainda eram visualizadas pela fluorescência.

4.4.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

4.4.4.1 Extração e purificação de DNA

A extração e purificação de DNA das amostras sanguíneas e teciduais foram realizadas utilizando-se um kit de extração, GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®), pelo método proporcional (scalable method) com

algumas alterações, conforme instrução do fabricante, e utilizando-se 100µL de amostra de sangue total com EDTA e 125µL da suspensão de amostra tecidual.

4.4.4.2 Amplificação de DNA

Foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Mérien et al. (1992), como segue: 38-57 (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e 348-368 (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') (Dialab®).

A amplificação do DNA foi realizada segundo adaptação do protocolo descrito por Mérien et al. (1992). Cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 5µL de tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 1,5µL de MgCl₂ (1,5M), 8,0µL de solução de deoxinucleotídeos (1,25mM), 0,3µL de *Taq*-polimerase (5U/µL) (Invitrogen®), 5µL de cada oligonucleotídeo (10pM/µL - dialab®), 15,2µL de água ultrapura e 10µL de amostra obtida no final da extração. A preparação foi submetida a 30 ciclos em termociclador, sendo o primeiro a desnaturação a 94°C por três minutos, anelamento a 63°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por dois minutos. Os próximos 29 ciclos consistiram de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 63°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por dois minutos, incluindo-se dez minutos adicionais a 72°C ao final para completar a extensão dos “amplicons”.

4.4.4.3 Visualização dos produtos da PCR

A uma alíquota de 10µL de cada preparação submetida à amplificação foram adicionados 2µL de uma solução de azul de bromofenol (0,15g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 1mg azul de bromofenol + 4g sacarose + 10mL água deionizada). Após homogeneização, a solução foi submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% com tampão tris-borato-EDTA 0,5x (54g Tris-hidroximetil-aminometano-Tris + 27,5g ácido bórico + 20mL solução estoque de EDTA 0,5M + 980mL água deionizada) e corrida a 100V por aproximadamente uma hora. Após a corrida, o gel foi submerso em solução de brometo de etídeo (5µL brometo de etídeo + 20mL tampão tris-borato-EDTA 5x + 80mL água deionizada). Para a visualização das bandas foi usado um transluminador ultravioleta com filtro de 300nm e fotografado com sistema fotográfico Polaroid®.

4.4.4.4 Controles

Para cada sequência de extração e purificação, e PCR das amostras foram utilizados controles. Para as amostras dos órgãos foi utilizada suspensão de fígado e/ou rins, contaminados com *L. interrogans* sorovar Canicola, na concentração de $2,0 \times 10^2$ leptospiros/mL, e para o sangue total, foi utilizado amostras de sangue também com EDTA contaminadas com leptospiros na mesma concentração anterior. Para o controle negativo foi utilizado água ultrapura.

4.4.4.5 Sensibilidade analítica

As técnicas de extração e purificação, PCR e eletroforese foram testadas nas diferentes amostras de tecidos e de sangue total pela contaminação experimental de amostras sabidamente negativas com *L. interrogans* sorovar Canicola, nas concentrações aproximadas de $2,0 \times 10^0$, $2,0 \times 10^1$, $2,0 \times 10^2$, $2,0 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^4$ microrganismos por mililitro de suspensão de cada amostra de órgão e de sangue total com EDTA.

Foram testados dois protocolos adaptados de extração e purificação de DNA: o primeiro utilizando o método do fenol, clorofórmio e proteinase K, segundo Soares (1998) (Anexo 6) e, o segundo, pelo método proporcional (scalable method) do kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®), seguindo instrução do fabricante (Anexo 5).

4.5 Análise estatística

Para a análise estatística, os valores em título foram transformados em valores de log na base 10 e calculando-se as médias e a área sob curva (ASC) da cinética de anticorpos, segundo Triola (2005), sendo os resultados comparados pelo teste t de Student. Para comparação das proporções foi utilizado o teste do Qui-quadrado. Para todas as análises foi considerado um nível de significância $\alpha=0,05$.

Resultados

5 Resultados

5.1 Animais de experimentação

Durante o experimento, os animais inoculados com as estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola não demonstraram suscetibilidade à doença. Não houve óbitos e não foi observada nenhuma alteração clínica e comportamental dos animais. Os animais controles negativos, embora mantidos juntamente com os infectados, não apresentaram positividade sorologicamente ou pela PCR.

5.2 Sensibilidade analítica da PCR

O uso do protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K não permitiu detectar DNA de leptospiros nas amostras contaminadas de sangue total e nas suspensões de fígado e rim. Entretanto, nessas últimas, quando diluídas novamente na proporção 1:2 com água ultrapura, foi possível a detecção quando na concentração de $2,0 \times 10^4$ leptospiros/mL (Figura 1). Em relação à suspensão de ovário foi possível detectar até $2,0 \times 10^3$ leptospiros/mL (Figura 2). Foi utilizado 250µL de cada amostra para extração e purificação de DNA, com exceção do sangue, onde utilizou-se 100µL.

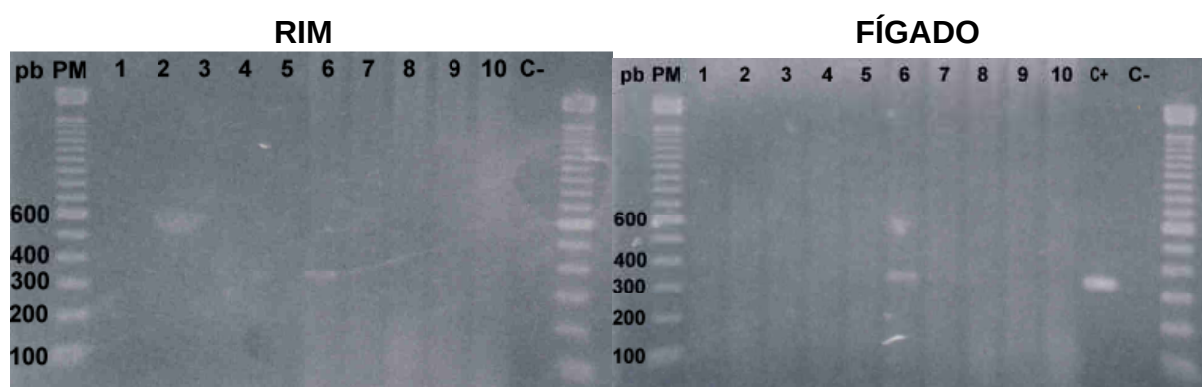


Figura 1 – Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospiros, de amostras de rim e fígado contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$ (linha 1); $2,0 \times 10^3$ (2); $2,0 \times 10^2$ (3); $2,0 \times 10^1$ (4); e $2,0 \times 10^0$ (5) leptospiros/mL, respectivamente. As mesmas amostras rediluídas na proporção 1:2 e retestadas, concentrações $2,0 \times 10^4$ (6); $2,0 \times 10^3$ (7); $2,0 \times 10^2$ (8); $2,0 \times 10^1$ (9); e $2,0 \times 10^0$ (10) leptospiros/mL. Extração e purificação pelo protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K. Botucatu-SP, 2007

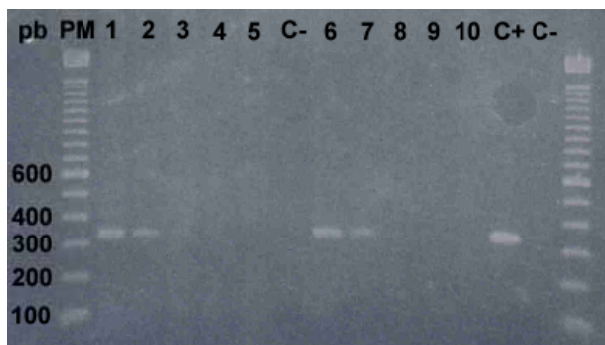


Figura 2 – Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de ovário contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$ (linha 1); $2,0 \times 10^3$ (2); $2,0 \times 10^2$ (3); $2,0 \times 10^1$ (4); e $2,0 \times 10^0$ (5) leptospiras/mL. Amostras rediluídas na proporção 1:2 e retestadas, concentrações $2,0 \times 10^4$ (6); $2,0 \times 10^3$ (7); $2,0 \times 10^2$ (8); $2,0 \times 10^1$ (9); e $2,0 \times 10^0$ (10) leptospiras/mL. Extração e purificação pelo protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K. Botucatu-SP, 2007

Quanto ao protocolo de extração e purificação pelo kit GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences[®]) detectou-se até $2,0 \times 10^2$ leptospiras/mL de sangue total com EDTA e a mesma concentração para amostras de rim, fígado e ovário (Figura 3 e 4). Foi utilizado 100µL da amostra de sangue total e 125µL da amostra dos tecidos.



Figura 3 – Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de sangue total com EDTA contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$ (linhas 1 e 5); $2,0 \times 10^3$ (2 e 6); $2,0 \times 10^2$ (3 e 7); e $2,0 \times 10^1$ (4 e 8) leptospiras/mL. Extração e purificação pelo kit GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences[®]). Botucatu-SP, 2007



Figura 4 – Gel de agarose a 2%. Visualização de banda de 331pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostras de suspensão de tecidos (rim, fígado e ovário) contaminadas nas concentrações de $2,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^3$; $2,0 \times 10^2$; e $2,0 \times 10^1$ leptospiras/mL. Linhas C1, C2, C3 e C4 (amostra pura de leptospiras em água ultrapura, nas concentrações respectivas citadas acima); R1, R2, R3 e R4 (rim); F1, F2, F3 e F4 (fígado) e O1, O2, O3 e O4 (ovário). Extração e purificação pelo kit GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences[®]). Botucatu-SP, 2007

5.3 Camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Canicola

5.3.1 SAM e SAM-2ME (Canicola)

Os resultados da SAM e SAM-2ME, de acordo com a data da colheita por animal pesquisado, inoculado com a estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola, podem ser observados na tabela 1.

A avaliação dos resultados foi realizada sobre os momentos pesquisados e calculando-se a média aritmética dos títulos de anticorpos das cinco unidades experimentais (camundongos).

Pela SAM, considerando o título inicial de 50, foi possível observar reação positiva nas amostras de soro a partir do 4^o dia pós inoculação (dpi). O título médio máximo de anticorpos foi observado no 35^o dpi, indicando o momento de pico de anticorpos, decaindo gradativamente até o final do experimento no 175^o dpi.

Tabela 1 – Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita pós inoculação. Botucatu-SP, 2007

DIA	ANIMAL (RESULTADO SAM - TÍTULO)					MÉDIA	DIA	ANIMAL (RESULTADO SAM-2ME - TÍTULO)					MÉDIA
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	100	50	50	0	0	40	4	0	0	0	0	0	0
7	400	200	800	800	800	600	7	0	0	0	0	50	10
14	400	400	1600	DESC	1600	1000	14	200	400	400	DESC	800	450
21	1600	12800	1600	3200	3200	4480	21	1600	6400	1600	3200	3200	3200
28	NR	3200	3200	3200	NR	3200	28	NR	3200	1600	3200	NR	2666
35	6400	6400	6400	6400	3200	5760	35	3200	6400	3200	6400	1600	4160
42	6400	6400	DESC	3200	3200	4800	42	3200	6400	DESC	3200	1600	3600
49	6400	1600	1600	3200	3200	3200	49	3200	800	1600	800	1600	1600
56	1600	DESC	800	800	1600	1200	56	1600	DESC	400	800	800	900
63	400	800	6400	800	3200	2320	63	200	800	3200	400	1600	1240
70	DESC	800	800	1600	400	900	70	DESC	400	800	800	200	550
77	400	800	800	1600	6400	2000	77	200	400	800	800	3200	1080
91	1600	1600	800	400	400	960	91	800	800	200	200	200	440
105	800	800	800	1600	DESC	1000	105	400	400	800	1600	DESC	800
119	400	1600	800	1600	DESC	1100	119	400	800	400	800	DESC	600
133	400	DESC	1600	1600	400	1000	133	400	DESC	800	800	400	600
147	400	200	800	800	400	520	147	400	200	800	800	400	520
161	200	200	800	800	800	560	161	200	200	800	400	800	480
175	800	DESC	200	200	400	400	175	800	DESC	200	100	200	325

DESC = desconsiderado

NR = não realizado

TÍTULO INICIAL = 50 (soro diluído na proporção 1:50 com SST pH 7,2)

TÍTULAÇÃO = RAZÃO 2 (50; 100; 200; 400; 800; 1600; ...)

A SAM-2ME mostrou positividade a partir do 7º dpi, apresentando valores de títulos sorológicos menores do que a SAM, em todos os momentos.

Comparando-se a diferença entre a média da SAM e a média da SAM-2ME, denominado de SAM-IgM, com o valor da média da SAM-2ME observa-se que o valor da SAM-IgM é maior até o 14º dpi. Considerando que o valor da SAM-IgM, provavelmente, corresponderia aos anticorpos da classe IgM, a predominância dos anticorpos IgM seria observada até o dia 14 pós inoculação.

A evolução da cinética de anticorpos antileptospiras detectados pela SAM e SAM-2ME pode ser observada no gráfico 1.

Não foi observada reação sorológica positiva para nenhum outro sorovar testado, em nenhum dos momentos estudados.

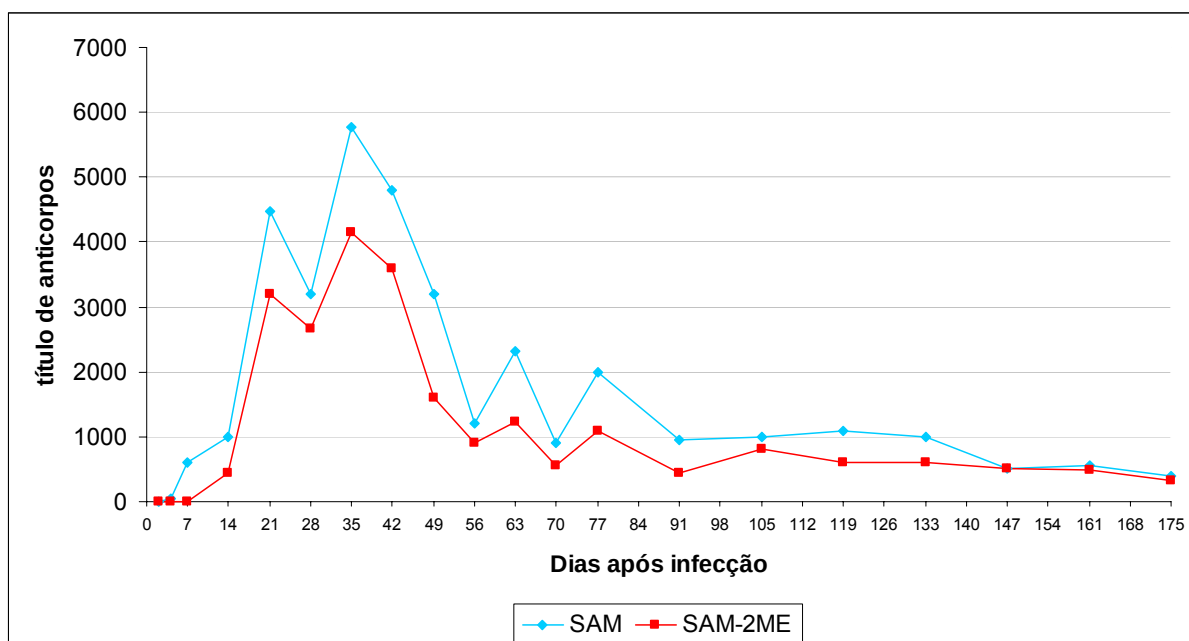


Gráfico 1 – Cinética de anticorpos antileptospiras da soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola. Botucatu-SP, 2007

5.3.1.1 Resultados falso-negativos na SAM (Efeito prozona)

Na titulação das amostras sorológicas reagentes ao título inicial foi observado a presença de várias amostras de soro com resultados falso-negativos nos títulos 50 e 100, e uma amostra até o título 200, indicando a possível presença do efeito prozona na prova de soroaglutinação microscópica.

Os resultados falso-negativos foram comparados aos títulos finais de cada soro e com os diferentes períodos de colheita, observando-se diferença estatística significativa e, portanto, associação dos resultados falso-negativos com o aumento dos títulos e o período inicial após a inoculação (Tabela 2, 3, 4 e 5).

Tabela 2 – Ocorrência de resultados falso-negativos no título 50 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com os títulos sorológicos máximos obtidos. Botucatu-SP, 2007

Título	Resultado falso-negativo no título 50		Total
	Sim (%)	Não (%)	
≤100	0	5 (100,0)	5
200	3 (50,0)	3 (50,0)	6
400	6 (42,9)	8 (57,1)	14
800	8 (36,4)	14 (63,6)	22
1600	11 (64,7)	6 (35,3)	17
3200	9 (81,8)	2 (18,2)	11
6400	9 (100,0)	0	9
12800	1 (100,0)	0	1

P=0,001, $\alpha=0,05$

Tabela 3 - Ocorrência de resultados falso-negativos no título 50 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com o período de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Período (dia)	Resultado falso-negativo no título 50		Total
	Sim (%)	Não (%)	
≤ 56	28 (70,0)	12 (30,0)	40
> 56	19 (42,2)	26 (57,8)	45

P=0,01, $\alpha=0,05$

Tabela 4 – Ocorrência de resultados falso-negativos no título 100 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com os títulos sorológicos máximos obtidos. Botucatu-SP, 2007

Título	Resultado falso negativo no título 100		Total
	Sim (%)	Não (%)	
≤100	0	(5) 100,0	5
200	(2) 33,3	(4) 66,7	6
400	(4) 28,6	(10) 71,4	14
800	(2) 9,1	(20) 90,9	22
1600	(7) 41,2	(10) 58,8	17
3200	(5) 45,5	(6) 54,5	11
6400	(5) 55,5	(4) 45,5	9
12800	1 (100,0)	0	1

P=0,041, $\alpha=0,05$

Tabela 5 - Ocorrência de resultados falso-negativos no título 100 na fase de titulação da soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com período de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Período (dia)	Resultado falso- negativo no título 100		Total
	Sim (%)	Não (%)	
≤ 42	(16) 51,61	(15) 48,39	31
> 42	(10) 18,52	(44) 81,48	54

P=0,05, $\alpha=0,05$

5.3.2 RIFI-IgM e RIFI-IgG (Canicola)

Os resultados da RIFI-IgM e RIFI-IgG para os animais inoculados com *L. interrogans* sorovar Canicola estão expressos na tabela 6.

Na RIFI foi possível detectar anticorpos da classe IgM e IgG, de forma diferenciada. Os anticorpos da classe IgM foram detectados a partir das amostras sorológicas colhidas no 4º dpi, apresentando o título médio máximo no 14º dia e não sendo mais observados nas amostras colhidas a partir do 21º dia.

Os anticorpos IgG foram observados a partir do 7º dpi, com título médio máximo no 35º dia, decaindo gradativamente até o dia 70 e persistindo em níveis baixos até o final do experimento no 175º dpi.

Observou-se que os anticorpos da classe IgG começam a aparecer expressivamente no momento em que os anticorpos IgM não são mais detectados. A cinética de anticorpos das duas classes de anticorpos detectadas pela RIFI, em valores de títulos, são mostradas no gráfico 2.

Tabela 6 – Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita. Botucatu-SP, 2007

ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgM TÍTULO)							ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgG TÍTULO)						
DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA	DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	100	50	100	100	50	80	4	0	0	0	0	0	0
7	400	100	400	400	400	340	7	0	0	0	0	50	10
14	400	200	400	DESC	400	350	14	50	0	50	DESC	0	25
21	0	0	0	0	0	0	21	400	400	200	200	400	320
28	NR	0	0	0	NR	0	28	NR	400	400	400	NR	400
35	0	0	0	0	0	0	35	800	800	400	800	800	720
42	0	0	DESC	0	0	0	42	800	800	DESC	400	400	600
49	0	0	0	0	0	0	49	800	200	200	400	200	360
56	0	DESC	0	0	0	0	56	800	DESC	200	400	200	400
63	0	0	0	0	0	0	63	200	100	800	400	400	380
70	DESC	0	0	0	0	0	70	DESC	200	200	400	100	225
77	0	0	0	0	0	0	77	100	100	200	200	200	160
91	0	0	0	0	0	0	91	400	100	100	100	100	160
105	0	0	0	0	DESC	0	105	200	100	200	200	DESC	175
119	0	0	0	0	DESC	0	119	200	400	100	100	DESC	200
133	0	DESC	0	0	0	0	133	100	DESC	400	400	100	250
147	0	0	0	0	0	0	147	200	50	200	200	100	150
161	0	0	0	0	0	0	161	100	100	200	200	200	160
175	0	DESC	0	0	0	0	175	200	DESC	100	50	100	112,5

DESC = desconsiderado

NR = não realizado

TÍTULO INICIAL = 50 (soro diluído na proporção 1:50)

TITULAÇÃO = RAZÃO 2 (50; 100; 200; 400; 800; 1600;)

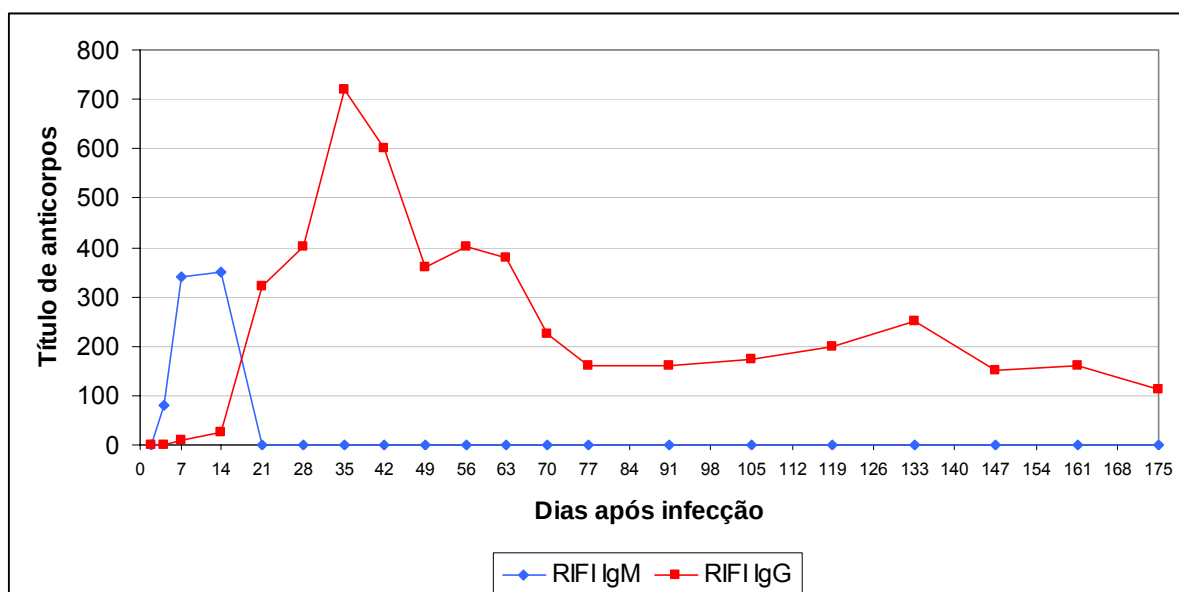


Gráfico 2 – Cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola. Botucatu-SP, 2007

5.3.3 Comparação dos resultados sorológicos (Canicola)

Para comparação estatística das duas técnicas sorológicas utilizadas, quanto à detecção de anticorpos das duas diferentes classes, os resultados expressos em títulos foram convertidos em valores de log na base 10 (log da recíproca da diluição), acrescentando-se o valor um em todos os títulos (Anexos 1 e 2).

Foram comparados os valores das médias $\pm$ desvio padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição), em cada momento, da RIFI-IgM e o resultado da diferença entre a SAM e SAM-2ME, denominado de SAM-IgM (Tabela 7), e da RIFI-IgG e SAM-2ME (Tabela 9). As diferenças, significativas ou não, podem ser observadas nas respectivas tabelas.

Da mesma forma foi comparado o valor da média $\pm$ desvio padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) da RIFI-IgM e SAM-IgM, sem diferença significativa (Gráfico 3 e Tabela 8), e RIFI-IgG e SAM-2ME, com diferença significativa (Gráfico 4 e Tabela 10).

Tabela 7 - Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) antileptospiras de amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Dias após inoculação	RIFI-IgM	SAM-IgM
2	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
4	1,89 ^a $\pm$ 0,16	1,08 ^a $\pm$ 1,00
7	2,48 ^a $\pm$ 0,27	2,38 ^a $\pm$ 0,71
14	2,53 ^a $\pm$ 0,15	0,24 ^b $\pm$ 0,25
21	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,06 ^a $\pm$ 0,13
28	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,06 ^a $\pm$ 0,13
35	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,18 ^a $\pm$ 0,16
42	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,16
49	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,30 ^b $\pm$ 0,21
56	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,16
63	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,24 ^b $\pm$ 0,13
70	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,18 ^a $\pm$ 0,16
77	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,24 ^b $\pm$ 0,13
91	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,36 ^b $\pm$ 0,13
105	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,16
119	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,18 ^a $\pm$ 0,16
133	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,16
147	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
161	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,06 ^a $\pm$ 0,13
175	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,16

*Observação: o valor de SAM-IgM refere-se ao resultado da diferença entre a SAM e a SAM-2ME (SAM – SAM-2ME = SAM-IgM).

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada dia avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

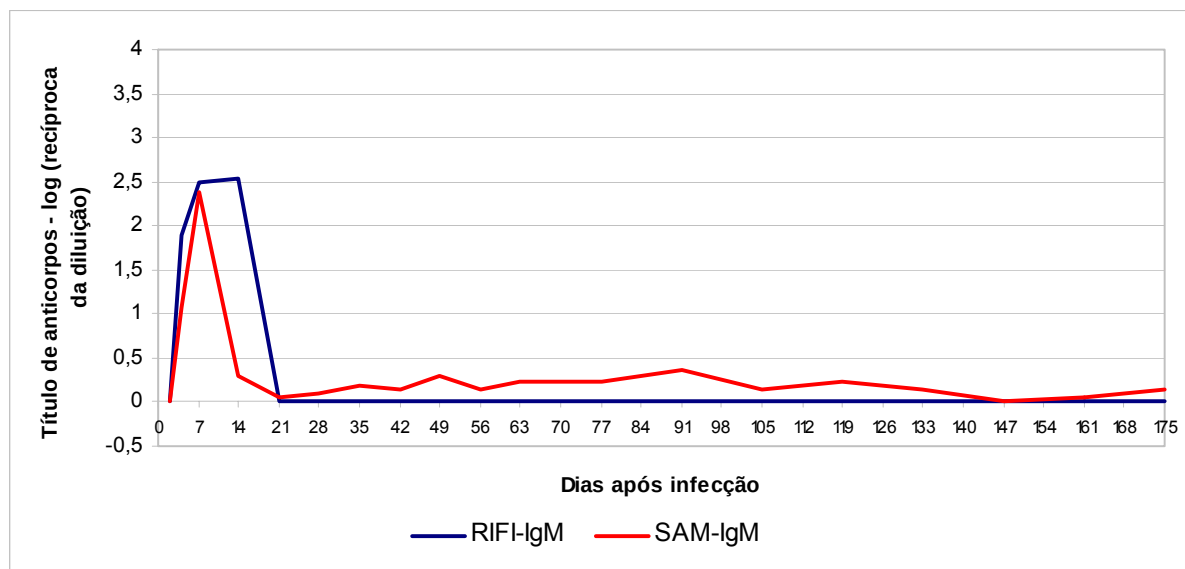


Gráfico 3 - Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM* em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans sorovar Canicola*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

*Observação: o valor de SAM-IgM refere-se ao resultado da diferença entre a SAM e a SAM-2ME (SAM – SAM-2ME = SAM-IgM).

Tabela 8 - Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Canicola de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Teste	Média $\pm$ desvio-padrão da ASC
RIFI-IgM	62,58 ^a $\pm$ 15,51
SAM-IgM	80,57 ^a $\pm$ 13,92
Teste t pareado	1,69
Valor de P	0,1662

*Observação: o valor de SAM-IgM refere-se ao resultado da diferença entre a SAM e a SAM-2ME (SAM – SAM-2ME = SAM-IgM).

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada teste avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

Tabela 9 - Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Canicola de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Dias após inoculação	RIFI-IgG	SAM-2ME
2	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
4	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
7	0,34 ^a $\pm$ 0,76	0,34 ^a $\pm$ 0,76
14	0,85 ^a $\pm$ 0,99	2,60 ^b $\pm$ 0,25
21	2,48 ^a $\pm$ 0,16	3,45 ^b $\pm$ 0,25
28	2,60 ^a $\pm$ 0,00	3,40 ^b $\pm$ 0,17
35	2,84 ^a $\pm$ 0,13	3,57 ^b $\pm$ 0,25
42	2,75 ^a $\pm$ 0,17	3,51 ^b $\pm$ 0,25
49	2,48 ^a $\pm$ 0,27	3,14 ^b $\pm$ 0,25
56	2,53 ^a $\pm$ 0,29	2,90 ^b $\pm$ 0,25
63	2,48 ^a $\pm$ 0,34	2,90 ^b $\pm$ 0,48
70	2,30 ^a $\pm$ 0,24	2,68 ^b $\pm$ 0,29
77	2,18 ^a $\pm$ 0,16	2,84 ^b $\pm$ 0,45
91	2,12 ^a $\pm$ 0,27	2,54 ^b $\pm$ 0,33
105	2,23 ^a $\pm$ 0,15	2,83 ^b $\pm$ 0,29
119	2,23 ^a $\pm$ 0,29	2,75 ^b $\pm$ 0,17
133	2,30 ^a $\pm$ 0,35	2,75 ^a $\pm$ 0,17
147	2,12 ^a $\pm$ 0,27	2,66 ^b $\pm$ 0,25
161	2,18 ^a $\pm$ 0,16	2,60 ^b $\pm$ 0,30
175	2,00 ^a $\pm$ 0,24	2,38 ^b $\pm$ 0,38

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada dia avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

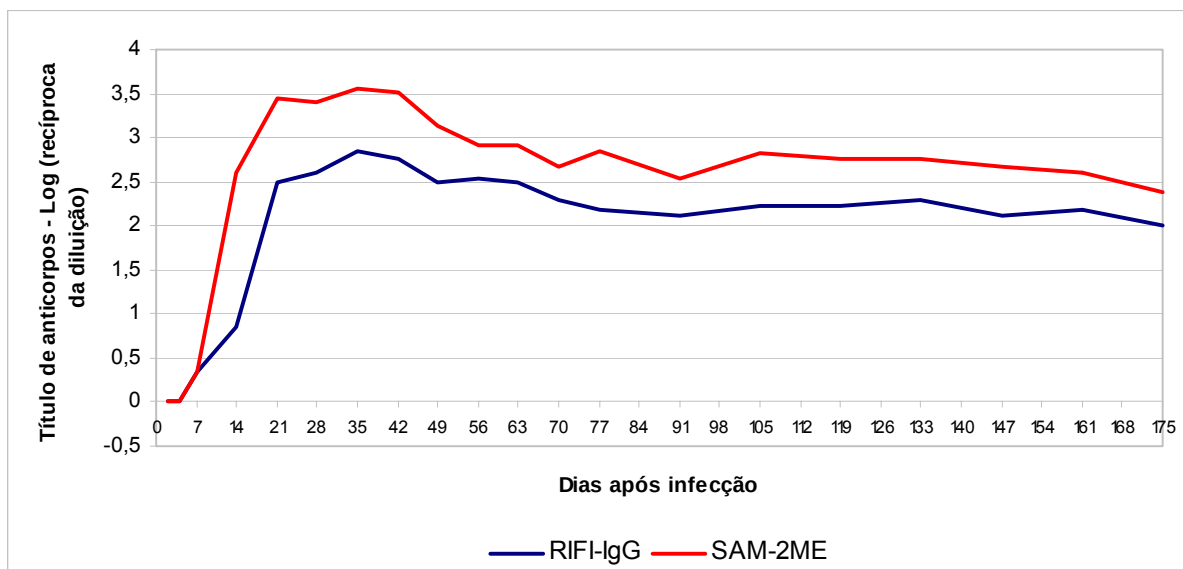


Gráfico 4 - Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Canicola, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Tabela 10 - Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Canicola de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Teste	Média $\pm$ desvio-padrão da ASC
RIFI-IgG	663,76 ^a $\pm$ 83,46
SAM-2ME	837,53 ^b $\pm$ 71,59
Teste t pareado	12,12
Valor de P	0,0003

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada teste avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

5.3.4 PCR (Canicola)

Para os camundongos inoculados com o sorovar Canicola houve positividade na PCR somente para uma única amostra de sangue, colhida de um animal no segundo dia pós inoculação. A intensidade de formação da banda visualizada no gel de agarose foi fraca, indicando pouca quantidade de leptospiros na amostra.

Todas as outras amostras de sangue foram negativas, igualmente as amostras de tecidos.

5.4 Camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Pomona

5.4.1 SAM e SAM-2ME (Pomona)

O resultado da SAM e SAM-2ME, de acordo com a data de colheita nos animais inoculados com *L. interrogans* sorovar Pomona, pode ser observado na tabela 11.

Observou-se reação positiva a partir do 10^o dpi na SAM. O título médio máximo de anticorpos detectados foi observado em dois momentos distintos, no 35^o dia e 77^o dpi, com queda gradativa até o final do experimento.

A SAM-2ME apresentou positividade à partir do 14^o dpi, com valores iguais ou mais baixos em todos demais momentos pesquisados.

A evolução da cinética de anticorpos antileptospiros detectados pela SAM e SAM-2ME pode ser observada no gráfico 5.

Não foi observada reação sorológica positiva para nenhum outro sorovar testado, em nenhum momento estudado.

Tabela 11 - Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2ME (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Botucatu-SP, 2007

DIA	ANIMAL (RESULTADO SAM TÍTULO)					MÉDIA	DIA	ANIMAL (RESULTADO SAM 2ME TÍTULO)					MÉDIA
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
10	100	50	0	100	0	50	10	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	200	40	14	0	0	0	0	50	10
21	0	0	0	0	400	80	21	0	0	0	0	400	80
28	50	0	400	50	0	100	28	50	0	400	0	0	90
35	800	800	200	800	200	560	35	200	800	100	800	200	420
42	400	50	800	0	50	260	42	200	0	400	0	0	120
49	100	100	0	400	400	200	49	0	0	0	400	200	120
56	50	200	400	100	50	160	56	0	100	400	0	0	100
63	0	100	400	800	400	340	63	0	0	200	400	400	200
70	0	0	200	200	800	240	70	0	0	200	0	400	120
77	800	200	1600	800	100	700	77	400	50	800	800	100	430
91	0	0	0	1600	200	360	91	0	0	0	1600	50	330
105	200	200	800	400	200	360	105	100	100	800	400	100	300
119	200	200	200	800	200	320	119	50	200	0	800	50	220
133	100	800	100	50	0	210	133	0	800	0	0	0	160
147	0	0	200	0	400	120	147	0	0	100	0	400	100
161	0	0	0	200	800	200	161	0	0	0	200	800	200
175	400	0	0	200	0	120	175	200	0	0	100	0	60

TÍTULO INICIAL = 50 (soro diluído na proporção 1:50)

TÍTULAÇÃO = RAZÃO 2 (50; 100; 200; 400; 800; 1600; ...)

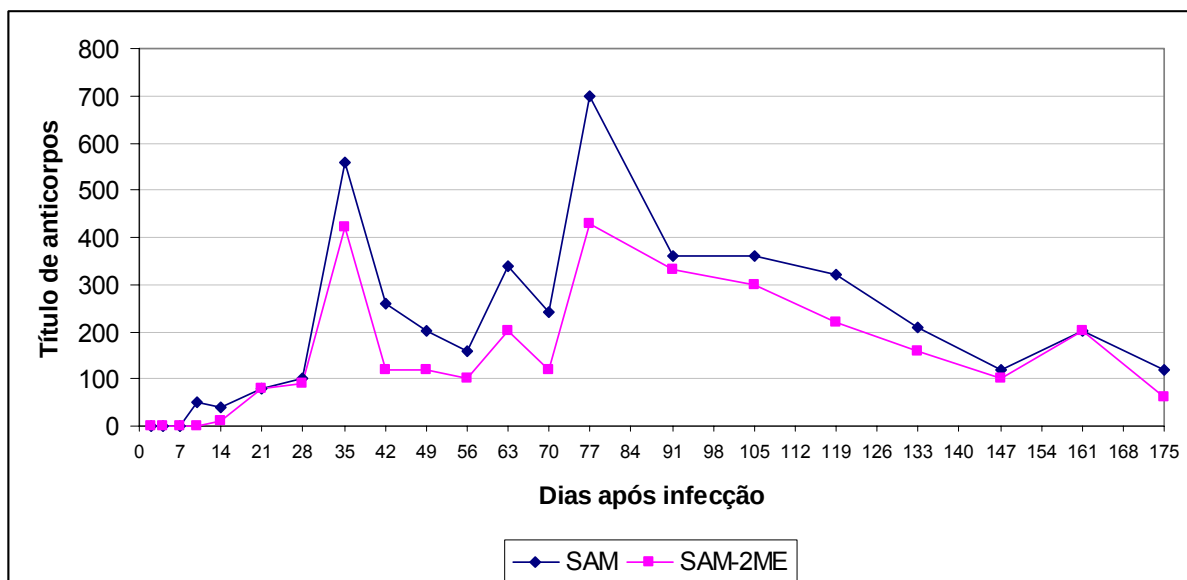


Gráfico 5 – Cinética de anticorpos antileptospiras da soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2ME (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona. Botucatu-SP, 2007

5.4.2 RIFI-IgM e RIFI-IgG (Pomona)

O resultado da RIFI-IgM e RIFI-IgG estão expressos na tabela 12.

Os anticorpos da classe IgM foram detectados nas amostras sorológicas colhidas a partir do 7º dpi, com título médio máximo no 10º dia, decaindo gradativamente até o 21º dia, não sendo mais detectado após este período.

Os anticorpos IgG foram detectados a partir do 10º dia, com título médio máximo no 35º dia, decaindo gradativamente até o final do experimento, 175º dpi.

A cinética de anticorpos das duas classes de anticorpos pode ser apreciada no gráfico 6.

Tabela 12 – Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Botucatu-SP, 2007

ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgM TÍTULO)							ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgG TÍTULO)						
DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA	DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
7	50	0	0	50	50	30	7	0	0	0	0	0	0
10	200	50	50	100	200	120	10	0	0	0	0	50	10
14	200	0	0	50	0	50	14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	50	0	10	21	0	50	50	0	100	40
28	0	0	0	0	0	0	28	200	100	400	100	200	200
35	0	0	0	0	0	0	35	400	800	100	800	100	440
42	0	0	0	0	0	0	42	200	200	800	50	0	250
49	0	0	0	0	0	0	49	100	200	100	200	100	140
56	0	0	0	0	0	0	56	50	200	400	50	100	160
63	0	0	0	0	0	0	63	50	100	100	50	100	80
70	0	0	0	0	0	0	70	100	0	200	50	200	110
77	0	0	0	0	0	0	77	100	0	100	50	200	90
91	0	0	0	0	0	0	91	100	50	0	200	100	90
105	0	0	0	0	0	0	105	50	100	100	100	0	70
119	0	0	0	0	0	0	119	100	200	50	100	0	90
133	0	0	0	0	0	0	133	0	100	50	50	100	60
147	0	0	0	0	0	0	147	100	0	50	0	100	50
161	0	0	0	0	0	0	161	100	50	0	50	100	60
175	0	0	0	0	0	0	175	100	0	0	50	100	50

TÍTULO INICIAL = 50 (soro diluído na proporção 1:50)

TITULAÇÃO = RAZÃO 2 (50; 100; 200; 400; 800; 1600;)

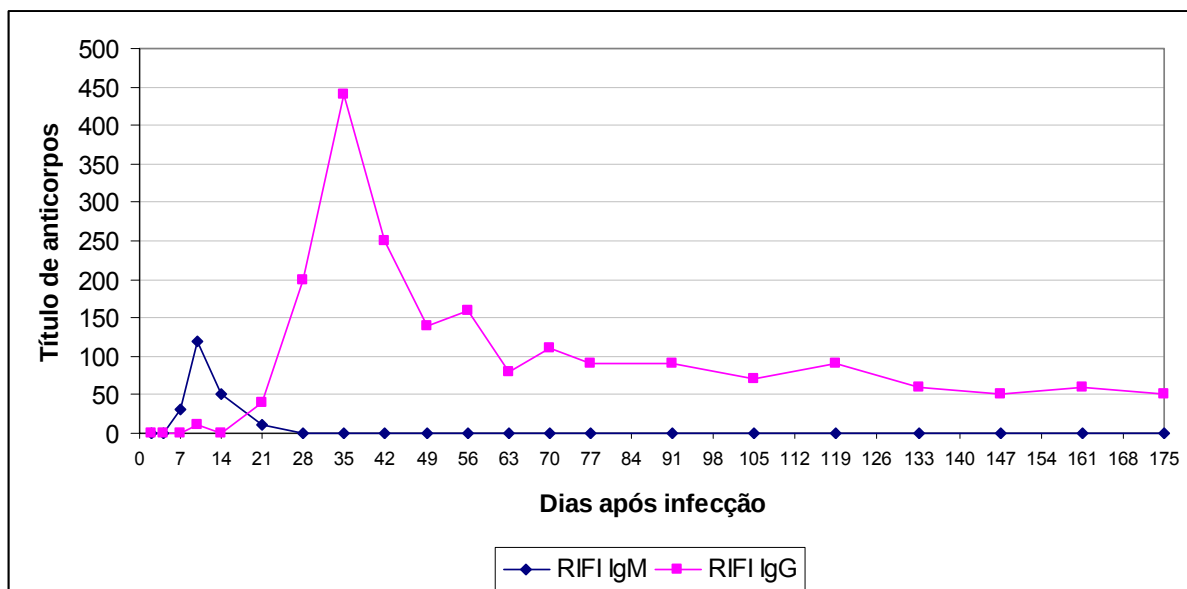


Gráfico 6 – Cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona. Botucatu-SP, 2007

5.4.3 Comparação dos resultados sorológicos (Pomona)

Para comparação estatística, os resultados expressos em títulos foram convertidos em valores de log na base 10 (log da recíproca da diluição) (Anexos 3 e 4).

Foram comparados os valores das médias $\pm$ desvio padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição), em cada momento de colheita, da RIFI-IgM e o resultado da diferença entre a SAM e SAM-2ME, denominado de SAM-IgM (Tabela 13), e da RIFI-IgG e SAM-2ME (Tabela 15). As diferenças, significativas ou não, podem ser observadas nas respectivas tabelas.

Da mesma forma comparou-se o valor da média $\pm$ desvio padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) da RIFI-IgM e SAM-IgM, com diferença significativa (Gráfico 7 e Tabela 14), e RIFI-IgG e SAM-2ME, sem diferença significativa (Gráfico 8 e Tabela 16).

Tabela 13 - Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Dias após inoculação	RIFI-IgM	SAM-IgM
2	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
4	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
7	1,02 ^a $\pm$ 0,94	0,00 ^a $\pm$ 0,00
10	2,01 ^a $\pm$ 0,30	1,14 ^a $\pm$ 1,05
14	0,80 ^a $\pm$ 1,12	0,12 ^a $\pm$ 0,27
21	0,34 ^a $\pm$ 0,76	0,00 ^a $\pm$ 0,00
28	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,34 ^a $\pm$ 0,76
35	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,18 ^a $\pm$ 0,27
42	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,80 ^a $\pm$ 0,83
49	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,86 ^a $\pm$ 1,05
56	0,00 ^a $\pm$ 0,00	1,14 ^a $\pm$ 0,92
63	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,52 ^a $\pm$ 0,84
70	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,52 ^a $\pm$ 1,00
77	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,24 ^a $\pm$ 0,25
91	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,27
105	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,18 ^a $\pm$ 0,16
119	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,70 ^a $\pm$ 0,94
133	0,00 ^a $\pm$ 0,00	1,14 ^a $\pm$ 1,05
147	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,06 ^a $\pm$ 0,13
161	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
175	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,12 ^a $\pm$ 0,16

*Observação: o valor de SAM-IgM refere-se ao resultado da diferença entre a SAM e a SAM-2ME (SAM – SAM-2ME = SAM-IgM).

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada dia avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

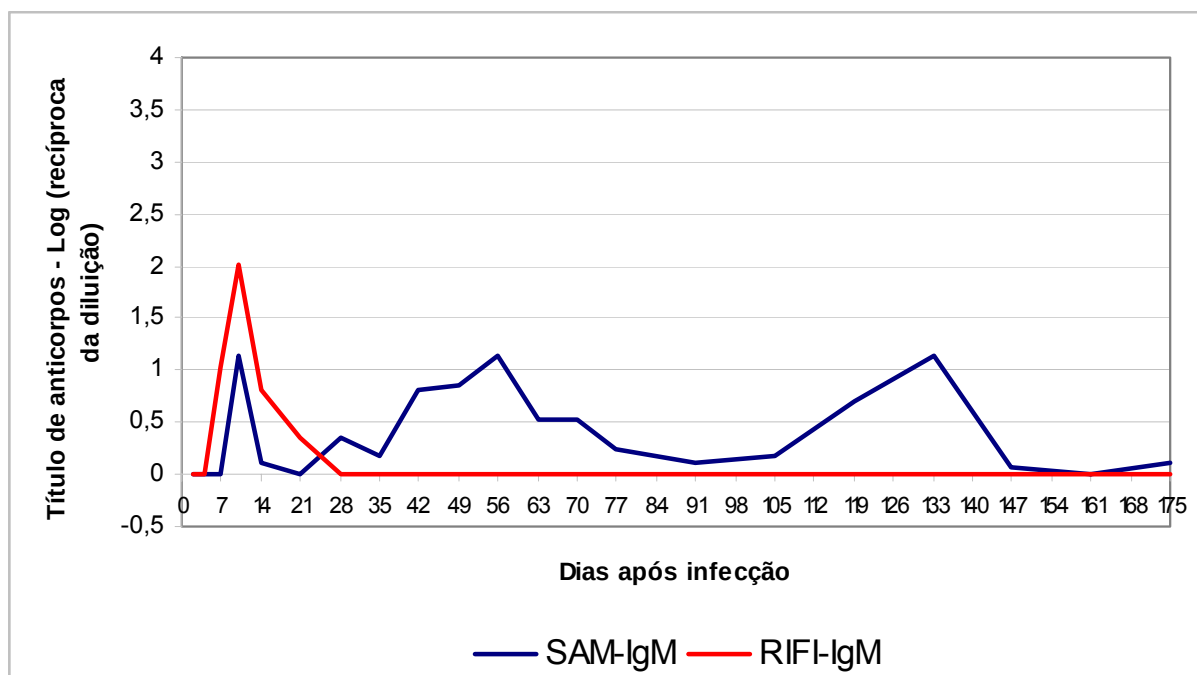


Gráfico 7 – Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM* em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

*Observação: o valor de SAM-IgM refere-se ao resultado da diferença entre a SAM e a SAM-2ME (SAM – SAM-2ME = SAM-IgM).

Tabela 14 - Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e da SAM-IgM*, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Teste	Média $\pm$ desvio-padrão da ASC
RIFI-IgM	33,79 ^a $\pm$ 24,65
SAM-IgM	138,83 ^b $\pm$ 27,24
Teste t pareado	10,08
Valor de P	0,0005

*Observação: o valor de SAM-IgM refere-se ao resultado da diferença entre a SAM e a SAM-2ME (SAM – SAM-2ME = SAM-IgM).

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada dia avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

Tabela 15 - Média $\pm$ desvio-padrão dos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soraglutinação microscópica em soro tratado com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Dias após inoculação	RIFI-IgG	SAM-2ME
2	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
4	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
7	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,00 ^a $\pm$ 0,00
10	0,34 ^a $\pm$ 0,76	0,00 ^a $\pm$ 0,00
14	0,00 ^a $\pm$ 0,00	0,34 ^a $\pm$ 0,76
21	1,08 ^a $\pm$ 1,00	0,52 ^a $\pm$ 1,16
28	2,24 ^a $\pm$ 0,25	0,86 ^b $\pm$ 1,22
35	2,48 ^a $\pm$ 0,45	2,48 ^a $\pm$ 0,40
42	1,84 ^a $\pm$ 1,11	0,98 ^a $\pm$ 1,35
49	2,12 ^a $\pm$ 0,16	0,98 ^a $\pm$ 1,35
56	2,07 ^a $\pm$ 0,39	0,92 ^a $\pm$ 1,28
63	1,89 ^a $\pm$ 0,16	1,50 ^a $\pm$ 1,38
70	1,66 ^a $\pm$ 0,96	0,98 ^a $\pm$ 1,35
77	1,60 ^a $\pm$ 0,92	2,42 ^a $\pm$ 0,54
91	1,60 ^a $\pm$ 0,92	0,98 ^a $\pm$ 1,45
105	1,54 ^a $\pm$ 0,87	2,30 ^a $\pm$ 0,42
119	1,60 ^a $\pm$ 0,92	1,72 ^a $\pm$ 1,08
133	1,48 ^a $\pm$ 0,84	0,58 ^a $\pm$ 1,30
147	1,14 ^a $\pm$ 1,05	0,92 ^a $\pm$ 1,28
161	1,48 ^a $\pm$ 0,84	1,04 ^a $\pm$ 1,44
175	1,14 ^a $\pm$ 1,05	0,86 ^a $\pm$ 1,18

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada dia avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

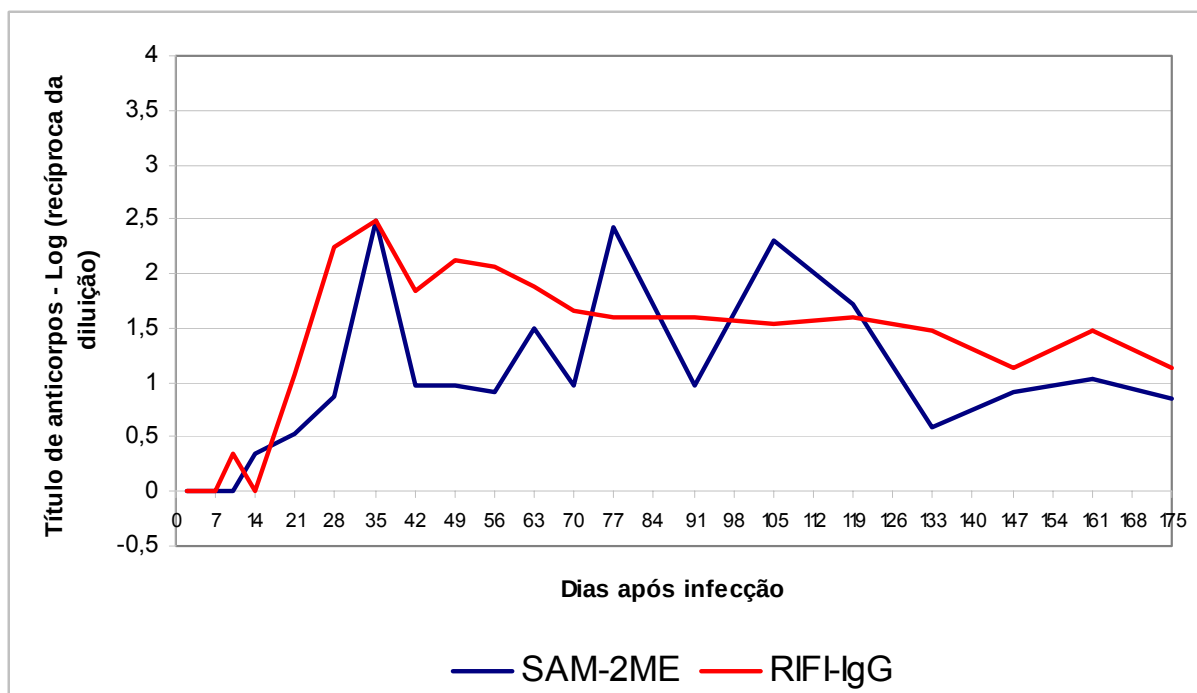


Gráfico 8 - Comparação da cinética de anticorpos antileptospiras da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona, segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Tabela 16 - Média $\pm$ desvio-padrão da área sob curva (ASC) referente aos títulos de anticorpos (log da recíproca da diluição) séricos antileptospiras sorovar Pomona de camundongos experimentalmente infectados. Comparação da reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgG (RIFI-IgG) e da soroaglutinação microscópica em soro tratado com 2ME (SAM-2ME), segundo o dia de colheita das amostras. Botucatu-SP, 2007

Teste	Média $\pm$ desvio-padrão da ASC
RIFI-IgG	515,79 ^a $\pm$ 23,72
SAM-2ME	407,52 ^a $\pm$ 117,41
Teste t	2,03
P	0,1119

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os testes, para cada dia avaliado, pelo teste t pareado, considerando $\alpha=0,05$.

5.4.4 PCR (Pomona)

Todas as amostras de sangue total e tecidos dos camundongos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona foram negativas na PCR.

Discussão

6 Discussão

6.1 Animais de experimentação

Os camundongos mostraram-se resistentes à manifestação clínica de leptospirose, quando infectados pelas estirpes patogênicas de *L. interrogans* sorovar Pomona e *L. interrogans* sorovar Canicola, concordando com a descrição na literatura, onde as diferentes espécies desses animais, bem como as de rato são consideradas resistentes e estão entre os principais reservatórios da doença (SEIJO et al., 2002).

Em pesquisas experimentais de leptospirose, os camundongos mostraram ser bons modelos biológicos para estudo comportamental e acompanhamento da cinética de anticorpos contra leptospirose (MARINHO et al., 2003).

6.2 Sensibilidade analítica da PCR

No presente estudo utilizou-se a técnica de PCR por ser um teste mais sensível e específico para detecção de leptospirosas em tecidos animais, quando comparada ao cultivo (CHO et al., 1998; LEVETT, 2004) e, com alta especificidade e sensibilidade igual ou maior se comparada à imunofluorescência direta e hibridização de DNA (O'KEEFE, 2002).

Avaliando-se os dois protocolos de extração e purificação testados observa-se que a sensibilidade analítica de detecção é maior quando utilizado o kit comercial, GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences[®]), detectando até 200 leptospirosas/mL da amostra de sangue total, fígado, rim ou ovário.

Essa sensibilidade analítica é menor do que a encontrada por Mérien et al. (1992) que cita a detecção de até 10 leptospirosas/mL de amostra pesquisada. Entretanto, salienta-se que o volume utilizado na extração e purificação das amostras neste experimento foi de apenas 100 ou 125µL, portanto, indicando que para cada volume de amostra processada foi possível detectar até 20 leptospirosas na PCR.

A baixa sensibilidade analítica do protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K pode ser explicada pela provável interferência de componentes celulares que impediriam a ação, tanto da proteinase K na extração, quanto da enzima polimerase na PCR. Como a purificação do DNA é realizada por precipitação

do DNA através de centrifugação e adição de sais, é possível que a purificação, para os materiais utilizados não seja a mais adequada, possibilitando o resquício de agentes inibidores.

6.3 Camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Canicola

6.3.1 Provas sorológicas

A estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola utilizada nesse experimento, isolada de fígado suíno (FREITAS et al., 2004) demonstrou uma antigenicidade elevada frente a uma resposta imunológica rápida e alta nos camundongos, visto a rapidez que os anticorpos foram detectados, tanto na soroaglutinação microscópica, quanto na imunofluorescência indireta para anticorpos IgM e pelo título médio máximo obtido, de 5760, ou título máximo individual, de 12800, em um animal no 21º dia pós inoculação. Este fato pode estar relacionado ao tempo de manutenção em laboratório, sendo uma estirpe recentemente isolada e, portanto, com poucas passagens em meio de cultura. Por outro lado, essa resposta poderia estar relacionada a uma característica inerente ao modelo experimental utilizado, ou seja, os camundongos podem possuir uma resposta imune mais desenvolvida para o sorovar em questão, determinada geneticamente (BHARTI et al., 2003).

Esta afirmação pode esclarecer o fato da não ocorrência de reações cruzadas na soroaglutinação microscópica, indicando uma resposta imunológica mais específica dos animais contra o sorovar estudado (COLLARES-PEREIRA et al., 2000). Além disso, as reações cruzadas estão, normalmente, relacionadas ao estágio agudo da infecção, provavelmente aos anticorpos da classe IgM, devido a sua baixa especificidade antigênica e por apresentarem resposta a antígenos gênero-específicos (FAIRBROTHER, 1985), que foram detectados em títulos baixos e por um curto período de tempo nesta pesquisa.

Pela comparação das provas sorológicas, a SAM-2ME permite indicar a presença de anticorpos sensíveis ao 2ME, provavelmente da classe IgM, fato que pode ser observado quando a diferença entre a SAM e SAM-2ME foi de dois ou mais títulos na comparação individual ou quando o valor da média da SAM-IgM é maior do que o valor da média da SAM-2ME, nos dois casos indicando a predominância dos anticorpos sensíveis ao 2ME. A fase de predominância dos anticorpos sensíveis ao

2ME corresponde a mesma fase onde há presença de anticorpos IgM detectados pela RIFI-IgM, sugerindo que os anticorpos sensíveis ao 2ME são, provavelmente, da classe IgM. Da mesma forma, a comparação da cinética de anticorpos formada pela RIFI-IgM e a SAM-IgM, quando analisados estatisticamente pelo valor da área sob curva (ASC) não revelou diferença significativa, corroborando a hipótese de que os anticorpos sensíveis ao 2ME são da classe IgM.

Esse resultado pode ser utilizado para diferenciar a fase da infecção, já que os anticorpos da classe IgM estão relacionados a fase inicial da infecção (THIERMANN, 1980), também demonstrado nessa pesquisa, conforme ilustrado na cinética de anticorpos formado pela RIFI-IgM.

Na literatura, a demonstração de infecção recente pelo tratamento da amostras de soro de bovinos com 2ME e testados pela SAM é descrito por Odontsetseg et al. (2005). Os autores observaram que após o tratamento das amostras de soros positivos para o sorovar Hardjo com 2ME, os títulos da SAM diminuíram de quatro a 16 vezes quando comparados as mesmas amostras não tratadas, e por serem também negativas no teste de ELISA-IgG, sugerindo que se tratavam de anticorpos da classe IgM.

A utilização do 2ME foi útil para demonstrar a possível presença de anticorpos da classe IgM e dessa forma indicar a fase da infecção em camundongos. Esta possibilidade também é relatada em outros animais, como cães (THIERMANN, 1980) e bovinos (ODONTSETSEG et al., 2005), e tem permitido determinar o provável sorovar infectante sem a interferência das reações cruzadas em leitões e vacas (AWAD-MASALMEH & WILLINGER, 1983; FAIRBROTHER, 1985). No presente trabalho não foi possível observar a utilidade do 2ME quanto a diminuição de interferência de reações cruzadas por não ter ocorrido tais reações.

A diferenciação da fase da infecção, no entanto, só é possível quando se conhece a cinética de anticorpos do animal estudado, já que em humanos, diferente de outros animais, há uma persistência de anticorpos antileptospiras por um longo período de tempo, até mais de um ano (ROMERO et al., 1998). Nesse caso, a detecção de anticorpos IgM como forma de diferenciar a fase da infecção deve ser melhor estudada em humanos, pois há estudos demonstrando a sua persistência por até um ano (WINSLOW et al., 1997).

Quanto a RIFI, a prova apresentou a mesma sensibilidade na detecção anticorpos em títulos baixos na fase inicial da infecção, entretanto, em fase posterior

e com títulos mais elevados houve uma diferença significativa que pode estar relacionado a presença de outras classes de anticorpos detectados pela SAM, enquanto que a RIFI-IgG é específica para anticorpos da classe IgG. A exemplo, pode-se citar a presença de anticorpos IgA, de aparecimento tardio à IgM, na infecção leptospírica, já demonstrada em estudos em humanos (SILVA & CAMARGO, 1992). Pode ainda estar relacionado a maior sensibilidade da SAM diante da RIFI, sendo o último, considerado um teste de moderada sensibilidade (SAMBASIVA et al., 2003). A SAM também tem mostrado uma sensibilidade maior quando comparada a outras técnicas específicas na detecção de anticorpos da classe IgG, como o ELISA (BERCOVICH et al., 1990).

6.3.2 Resultados falso-negativos na SAM para o sorovar Canicola

Resultados falso-negativos são relatados na literatura na prova de soroaglutinação microscópica em consequência da grande quantidade de anticorpos presentes na amostra de soro que impediriam a aglutinação do antígeno. Esse efeito também pode estar relacionado à interferência do sistema complemento, que também, impediria a formação de aglutinação. Este efeito é conhecido como “efeito prozona” descrito em soro de animais por Knudtson & Feters (1990).

Em relação ao sistema complemento, as amostras de soro podem ser inativadas em banho-maria a 56°C ou adição de EDTA (MALKIN, 1984), e dessa forma diminuir tal interferência. Quanto à quantidade de anticorpos, as amostras de soro podem ser diluídas em proporções maiores, diminuindo a concentração de anticorpos.

Na SAM, o título de corte freqüentemente considerado significativo é 100 (O'KEEFE, 2002), servindo como valor referência no teste de triagem da prova. Levando-se em consideração a presença de resultados falso-negativos nesse título em várias amostras testadas durante a pesquisa e, considerando ainda que não há uma concentração de antígenos padronizada na citada prova, ressalta-se a importância de se diminuir tais interferências nas amostras de soro antes de serem testadas pela prova de SAM.

A inativação do soro (KNUDTSON & FETERS, 1990), maior diluição das amostras e/ou aumentar a concentração de antígenos na prova de triagem, pode também, contribuir para minimizar essas interferências. Entretanto, os dois últimos

procedimentos devem ser melhor avaliados, pois influenciam diretamente os resultados da SAM.

6.3.3 PCR

Os resultados da PCR demonstraram não haver a multiplicação da estirpe patogênica do sorovar Canicola nos tecidos dos animais analisados, sugerindo a não ocorrência da fase de leptospiremia, e colonização renal e ovariana.

Embora, uma amostra de sangue, colhida no segundo dia pós inoculação, tenha sido positiva, é provável, que sejam de leptospiros que de alguma forma conseguiram atingir a corrente circulatória, sem, entretanto, terem se multiplicado, sendo rapidamente eliminadas pelo sistema imunológico do hospedeiro, já que, em momentos posteriores, não houve mais a positividade na prova.

Esse fato pode sugerir que, embora, possa ocorrer a infecção, nem todos os camundongos tornam-se portadores do sorovar Canicola, considerado não adaptado a esta espécie de animais, sugerindo que, talvez, não participem de forma importante na epidemiologia desse sorovar, como portadores.

Por outro lado, os roedores são considerados os principais reservatórios dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, isolados com maior frequência em *Rattus norvegicus* (ratazana-de-esgoto) (MORALES et al., 1978) e Ballum, em *Mus musculus* (camundongo doméstico) (COLLARES-PEREIRA et al., 2000; ROSSETTI et al., 2004), mostrando que esses animais, quando infectados, tornam-se portadores de sorovares considerados adaptados à essas espécies.

Pode-se comprovar tal consideração pela possibilidade de recuperação desses agentes a partir de tecidos de animais experimentalmente infectados, como demonstrado em pesquisa realizada em camundongos inoculados com o sorovar Icterohaemorrhagiae (MARINHO et al., 2003).

6.4 Camundongos inoculados com *L. interrogans* sorovar Pomona

6.4.1 Provas sorológicas

Diferente da resposta induzida pela estirpe patogênica do sorovar Canicola, a estirpe do sorovar Pomona, inoculada na mesma concentração do agente anterior produziu uma resposta irregular entre os modelos experimentais, induzindo uma

resposta imunológica mais baixa e tardia. Essa variação pode ser explicada, talvez, por uma diferente e menor antigenicidade da estirpe estudada.

As leptospiros mantidas em laboratório, por diversas passagens em meio de cultura parecem ter a sua capacidade patogênica modificada, provavelmente pela alteração nas proteínas de membrana (HAAKE et al., 1991), também responsáveis pela indução de resposta imunológica. As leptospiros podem regular a expressão de proteínas de membrana em resposta ao estímulo ambiental, particularmente das proteínas expressas, já demonstradas “in-vitro” (BHARTI et al., 2003).

A estirpe patogênica em questão, embora mantida em passagens alternadas em meio de cultura e modelos biológicos (hamsters), afim de evitar a perda da patogenicidade, tem sido mantida há anos, e por isso pode ter alterado parte da capacidade antigênica, pela alteração de proteínas expressas na membrana externa, e até mesmo da patogenicidade para outras espécies de animais.

Quanto à avaliação das técnicas sorológicas estudadas, houve uma diferença significativa entre a ASC formada pelo resultado da cinética de anticorpos da RIFI-IgM e a SAM-IgM. Essa diferença pode ser explicada pela diferença de sensibilidade verificada entre a SAM e a RIFI. A RIFI, nesse caso foi capaz de detectar os anticorpos da classe IgM mais cedo que a SAM, portanto, formando uma ASC diferente da SAM-IgM.

Técnicas específicas na detecção de anticorpos da classe IgM são consideradas mais sensíveis quando comparadas a SAM. Nesse sentido, o ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido amplamente utilizado, por ser capaz de diagnosticar infecções recentes mais precocemente, quando comparada a SAM (LEVETT, 2004), principalmente no diagnóstico humano (RIBEIRO et al., 1995).

Por isso, embora a SAM detecte anticorpos de diferentes classes, ela não é tão sensível em detectar os anticorpos da classe IgM no início da infecção, sugerindo ainda, que essa sensibilidade depende da resposta imunológica induzida por diferentes sorovares no hospedeiro.

Na SAM foi observada, na cinética de anticorpos, a presença de dois picos de títulos médios máximos que podem ser explicados pela presença de outras classes de anticorpos ou pela grande variação de resposta ocorrida entre os animais, embora sejam isogênicos. Entretanto, na comparação dos resultados da RIFI-IgG e SAM-2ME, não foi observado diferença significativa da ASC dos gráficos formados pelas duas cinéticas. A grande variação da SAM, não observada na RIFI,

pode ser explicada pela subjetividade da prova e dificuldade de padronização quanto a quantidade de antígeno utilizado ou presença de outros fatores de interferência, tais como a contaminação no soro.

Ainda que tenha ocorrido diferença significativa entre a ASC da RIFI-IgM e SAM-IgM, foi observado que quando houve diferença de dois ou mais títulos na comparação individual entre a SAM e SAM-2ME ou a predominância de anticorpos sensíveis ao 2ME, pela comparação do valor médio da SAM-IgM com a SAM-2ME, notou-se que corresponde ao período onde foram detectados os anticorpos IgM pela RIFI-IgM, sugerindo que os anticorpos sensíveis ao 2ME são, provavelmente, da classe IgM. Fato também observado na comparação das provas sorológicas nos animais inoculados com o sorovar Canicola.

6.4.2 PCR

O resultado obtido pela PCR nas amostras dos camundongos inoculados com o sorovar Pomona, demonstrou que não houve multiplicação do agente nos modelos experimentais estudados, sugerindo que esses animais, talvez, não representem importância epidemiológica para este sorovar, como portadores.

Esta afirmação é sugerida para outra espécie de roedor, em trabalho realizado por Morales et al. (1978), no qual os autores sugeriram que *Rattus norvegicus* presentes numa granja suína com problemas ocasionados pelo sorovar Pomona não teriam importância na manutenção e transmissão desse sorovar para suínos.

Os sorovares considerados não adaptados podem infectar os roedores tornado-os portadores do agente. Porém, a importância desse fato na epidemiologia não está bem definida, podendo explicar porque em estudos epidemiológicos não há indícios consistentes da infecção por esses sorovares em camundongos e outros roedores (SHARMA et al., 2003; BEVILACQUA et al., 2004).

Apesar das considerações sugeridas anteriormente, deve-se salientar que conforme relatado na discussão dos resultados das provas sorológicas, o fato de não ter ocorrido a multiplicação e colonização das leptospiiras em tecidos pelo sorovar Pomona pode ser devido a perda de patogenicidade da estirpe estudada para outras espécies de animais, diferentemente do hamster, utilizado freqüentemente para manutenção do mesmo. A perda de patogenicidade pode estar relacionada a diversas passagens em meio de cultura, mesmo que intercaladas com

inoculação em modelos biológicos, entretanto, essa questão deve ser melhor estudada.

6.5 Avaliação da resposta sorológica entre as duas estirpes estudadas

A cinética de anticorpos produzidos pelos animais inoculados frente às duas estirpes patogênicas, quando comparadas, mostraram que as respostas foram diferentes quanto à precocidade e intensidade dos anticorpos detectados pelas provas sorológicas. Embora, o período de aparecimento dos anticorpos frente as duas estirpes patogênicas tenham ocorrido entre próximo do 6^o e o 12^o dpi e os títulos máximos da terceira e quarta semana pós infecção, conforme descrito por Bharadwaj (2004), pode-se observar que houve uma resposta homogênea, rápida e intensa, induzida pelo sorovar Canicola, se comparada ao Pomona.

Além disso, os anticorpos da classe IgM, induzidos pelo sorovar Canicola foram detectados no mesmo momento pelas duas provas sorológicas, enquanto que nos animais inoculados pelo Pomona foram mais tardiamente detectados pela SAM quando comparada a RIFI.

A RIFI foi mais sensível em detectar anticorpos da classe IgM e, embora, tenha tido resultado oposto quanto aos anticorpos IgG, mostrou-se útil para diferenciar essas duas classes de anticorpos.

Os resultados indicam que a sensibilidade da SAM para detecção de anticorpos antileptospiras é dependente do sorovar envolvido na infecção. Portanto, o diagnóstico realizado pela citada prova deve considerar a diferença de resposta imunológica desenvolvida por diferentes sorovares nos hospedeiros.

A diferença de resposta imunológica pode ser influenciada pelo sorovar infectante (O'KEEFE, 2002), bem como ser determinada geneticamente pelo hospedeiro (BHARTI et al., 2003), fatores importantes a serem considerados na interpretação dos resultados sorológicos e trabalhos epidemiológicos.

Conclusões

7 Conclusões

Pelos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- ✓ A SAM detectou anticorpos da classe IgM e IgG, embora na fase inicial tenha sido menos sensível para anticorpos IgM;
- ✓ A sensibilidade da SAM, para a detecção da infecção na fase inicial, dependeu da resposta imunológica induzida pelos diferentes sorovares;
- ✓ O uso da SAM-2ME foi útil para determinar a presença de anticorpos sensíveis ao 2ME, provavelmente da classe IgM e, dessa forma, diferenciar a fase da infecção nos animais estudados;
- ✓ Foram observados resultados falso-negativos na SAM, provavelmente pela influência do efeito prozona;
- ✓ A RIFI, utilizando antígeno homólogo ao inoculado permitiu diferenciar anticorpos da classe IgM e IgG;
- ✓ Não foi detectado a presença de DNA das estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola nos tecidos dos camundongos, sugerindo que os mesmos, talvez, não participem de forma importante na epidemiologia dos sorovares pesquisados, como portadores e disseminadores.

Referências Bibliográficas

8 Referências bibliográficas[†]

APPASSAKIJ, H. et al. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.52, n.4, p.340-343, 1995.

AWAD-MASALMEH, A.; WILLINGER, H. Evaluation of usefulness of 2-mercaptoethanol treatment in serodiagnosis of swine leptospirosis. **Microbiologica**, v.6, n.2, p.133-143, 1983.

BANDA-RUIZ, V.M.; OROZCO-VEGA, L.E.; URRUTIA-VELÁZQUEZ, R.M. Use of polimerase chain reaction for the identification of *Leptospira* sp. in urine of carriers. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v.57, n.1, p.47-48, 2005.

BERCOVICH, Z.; TAAIJKE, R.; BOKHOUT, B.A. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle. **Vet. Microbiol.**, v.21, p.255-262, 1990.

BEVILACQUA, P.D. et al. Roedores inventariados em hospital veterinário e fragmento de mata nativa da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil: caracterização populacional e infecção por *Leptospira* sp. **Ci. Rural**, v.34, n.5, p.1519-1523, 2004.

BHARADWAJ, R. Leptospirosis – a reemerging disease? **Indian J. Med. Res.**, v.120, p.136-138, 2004.

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

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98p.

[†] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CAMARGO, C.R.A. et al. Investigação sobre a presença de leptospiros nos ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo Pomona. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.30, n.2, p.129-135, 1993.

CHO, M.K. et al. Infection rate of *Leptospira interrogans* in the field rodent, *Apodemus agrarius*, in Korea. **Epidemiol. Infect.**, v.121, p.685-690, 1998.

COLLARES-PEREIRA, M. et al. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). **Europ. J. Epidemiol.**, v.16, p.1151-1157, 2000.

CRAWFORD, R.P. Molecular characteristics of antibody detected by the Microscopic Agglutination Test in serum of guinea pigs with leptospirosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.33, n.7, p.1507-1512, 1972a.

CRAWFORD, R.P. Identification of the immunoglobulins in serums of guinea pigs infected with serogroup Pomona leptospires. **Am. J. Vet. Res.**, v.33, n.11, p.2289-2298, 1972b.

FAIRBROTHER, J.M. Antibody response to genus- and serovar-specific leptospiral antigens in *Leptospira*-infected cows. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.7, p.1422-1426, 1985.

FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1977. 316p.

FONSECA, C.A., et al. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **J. Infect.**, v.52, p.15-22, 2006.

FREITAS, J.C. et al. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ci. Rural**, v.34, n.3, p.853-856, 2004.

HAAKE, D.A. et al. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. **Infect. Immun.**, v.59, n.3, p.1131-1140, 1991.

JOHNSON, M.A.S. et al. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, n.6, p.1016-1022, 2004.

KNUDTSON, W.U.; FETTERS, M. The effect of heat-inactivation on agglutinating antibody titers to *Leptospira interrogans*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.149-150, 1990.

KOIZUMI N.; WATANABE, H. Identification of novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. **J. Med. Microbiol.**, v.52, p.585-589, 2003.

LANGONI, H. et al. Baypamun[®] action in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* serogroup Canicola. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, n.6, p.293-295, 2001.

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

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonoses? **Clin. Appl. Immunol. Rev.**, v.4, p.435-448, 2004.

LOPES, A.L.S. et al. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.3, p.289-296, 2005.

MACEDO, N.A. et al. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.41, n.3, p.194-200, 2004.

MALKIN, K. Enhancement of *Leptospira hardjo* Agglutination Titers in Sheep and Goat Serum by Heat Inactivation. **Can. J. Comp. Med.**, v.48, p.208-210, 1984.

MARINHO, M. et al. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e *balb/c*, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.23, n.1, p.5-12, 2003.

MÉRIEN, F. et al. Polimerase Chain Reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.

MORALES, G.A.; GÚZMAN, V.H.; BELTRÁN, L.E. Leptospirosis in Colombia: isolation of *Leptospira* spp. from the kidneys of brown rats (*Rattus norvegicus*) trapped on infected piggeries. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v.10, p.121-123, 1978.

ODONTSETSEG, N.; SOKODA, Y.; KIDA, H. Serological evidence of the persistence of infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in cattle in Mongolia. **Microbiol. Immunol.**, v.49, n.9, p.865-869, 2005.

O'KEEFE, J.S. A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis. **New Zealand Vet. J.**, v.50, n.1, p.9-13, 2002.

OOTEMAN, M.C.; VAGO, A.R.; KOURY, M.C. Evaluation of MAT, IgM-ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **J. Microbiol. Meth.**, v.65, p.247-257, 2006.

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

RIBEIRO, M.A. **Contribuição ao imunodiagnóstico da leptospirose humana: ênfase ao uso de anticorpos monoclonais.** 2003. 164p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

ROSSETTI, C.A. et al. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, n.1, p.6-10, 2004.

SACSAQUISPE-CONTRERAS, R.; GLENNY-A., M.; CÉSPEDES-Z., M. Estudio preliminar de leptospirosis em roedores y canes en Salitral, Piura – 1999. **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica**, v.20, n.1, p.39-40, 2003.

SAMBASIVA, R.R. et al. Leptospirosis in Índia and the rest of the World. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.7, n.3, p.178-193, 2003.

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

SHARMA, S. et al. Leptospiral carrier state and seroprevalence among animal population – a cross-sectional sample survey in Andamana and Nicobar Islands. **Epidemiol. Infect.**, v.131, p.985-989, 2003.

SHIMABUKURO F.H. et al. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirosas pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras renais de animais sorologicamente positivos e negativos. **Braz. J. Vet. Res. Ani. Cien.**, v.40, p.243-253, 2003.

SILVA, M.V.; CAMARGO, E.D. Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgA na leptospirose humana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.34, n.3, p.239-242, 1992.

SOARES, R.M. **Emprego das reações de PCR e nested-PCR na detecção de DNA de parvovírus suíno.** 1998. 73p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THIERMANN, A.B. Canine leptospirosis in Detroit. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, n.10, p.1659-1661, 1980.

TRIOLA, M.F. (2005). **Introdução à estatística.** Rio de Janeiro: LTC. 9.ed. 682p.

TRUBO, R. *Leptospira* brings fresh challenge to adventure sports. **The Lancet: Infect. Dis.**, v.1, p.73, 2001.

TURK, N. et al. Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. **Epidemiol. Infect.**, v.130, p.159-166, 2003.

VANASCO, N.B. et al. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Prev. Vet. Med.**, v.60, p.227-235, 2003.

WINSLOW, W.E. et al. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.1938-1942, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2003, 109p.

Anexos

Anexo 1

Tabela 17 - Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2-mercaptoetanol (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita pós inoculação. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu-SP, 2007

ANIMAL (RESULTADO SAM TÍTULO)							ANIMAL (RESULTADO SAM 2ME TÍTULO)						
DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA	DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	2,004321	1,70757	1,70757	0	0	1,083892	4	0	0	0	0	0	0
7	2,603144	2,303196	2,903633	2,903633	2,903633	2,723448	7	0	0	0	0	1,70757	0,341514
14	2,603144	2,603144	3,204391	DESC	3,204391	2,903768	14	2,303196	2,603144	2,603144	DESC	2,903633	2,603279
21	3,204391	4,107244	3,204391	3,505286	3,505286	3,50532	21	3,204391	3,806248	3,204391	3,505286	3,505286	3,44512
28	NR	3,505286	3,505286	3,505286	NR	3,505286	28	NR	3,505286	3,204391	3,505286	NR	3,404988
35	3,806248	3,806248	3,806248	3,806248	3,505286	3,746055	35	3,505286	3,806248	3,505286	3,806248	3,204391	3,565492
42	3,806248	3,806248	DESC	3,505286	3,505286	3,655767	42	3,505286	3,806248	DESC	3,505286	3,204391	3,505303
49	3,806248	3,204391	3,204391	3,505286	3,505286	3,44512	49	3,505286	2,903633	3,204391	2,903633	3,204391	3,144267
56	3,204391	DESC	2,903633	2,903633	3,204391	3,054012	56	3,204391	DESC	2,603144	2,903633	2,903633	2,9037
63	2,603144	2,903633	3,806248	2,903633	3,505286	3,144389	63	2,303196	2,903633	3,505286	2,603144	3,204391	2,90393
70	DESC	2,903633	2,903633	3,204391	2,603144	2,9037	70	DESC	2,603144	2,903633	2,903633	2,303196	2,678401
77	2,603144	2,903633	2,903633	3,204391	3,806248	3,08421	77	2,303196	2,603144	2,903633	2,903633	3,505286	2,843778
91	3,204391	3,204391	2,903633	2,603144	2,603144	2,903741	91	2,903633	2,903633	2,303196	2,303196	2,303196	2,543371
105	2,903633	2,903633	2,903633	3,204391	DESC	2,978822	105	2,603144	2,603144	2,903633	3,204391	DESC	2,828578
119	2,603144	3,204391	2,903633	3,204391	DESC	2,97889	119	2,603144	2,903633	2,603144	2,903633	DESC	2,753388
133	2,603144	DESC	3,204391	3,204391	2,603144	2,903768	133	2,603144	DESC	2,903633	2,903633	2,603144	2,753388
147	2,603144	2,303196	2,903633	2,903633	2,603144	2,66335	147	2,603144	2,303196	2,903633	2,903633	2,603144	2,66335
161	2,303196	2,303196	2,903633	2,903633	2,903633	2,663458	161	2,303196	2,303196	2,903633	2,603144	2,903633	2,60336
175	2,903633	DESC	2,303196	2,303196	2,603144	2,528292	175	2,903633	DESC	2,303196	2,004321	2,303196	2,378587

DESC = desconsiderado

NR = não realizado

Anexo 2

Tabela 18 - Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Canicola, de acordo com a data de colheita. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu-SP, 2007

ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgM TÍTULO)							ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgG TÍTULO)						
DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA	DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	2,004321	1,707570	2,004321	2,004321	1,707570	1,885621	4	0	0	0	0	0	0
7	2,603144	2,004321	2,603144	2,603144	2,603144	2,483380	7	0	0	0	0	1,707570	0,341514
14	2,603144	2,303196	2,603144	DESC	2,603144	2,528157	14	1,707570	0	1,707570	DESC	0	0,853785
21	0	0	0	0	0	0	21	2,603144	2,603144	2,303196	2,303196	2,603144	2,483165
28	NR	0	0	0	NR	0	28	NR	2,603144	2,603144	2,603144	NR	2,603144
35	0	0	0	0	0	0	35	2,903633	2,903633	2,603144	2,903633	2,903633	2,843535
42	0	0	DESC	0	0	0	42	2,903633	2,903633	DESC	2,603144	2,603144	2,753388
49	0	0	0	0	0	0	49	2,903633	2,303196	2,303196	2,603144	2,303196	2,483273
56	0	DESC	0	0	0	0	56	2,903633	DESC	2,303196	2,603144	2,303196	2,528292
63	0	0	0	0	0	0	63	2,303196	2,004321	2,903633	2,603144	2,603144	2,483488
70	DESC	0	0	0	0	0	70	DESC	2,303196	2,303196	2,603144	2,004321	2,303464
77	0	0	0	0	0	0	77	2,004321	2,004321	2,303196	2,303196	2,303196	2,183646
91	0	0	0	0	0	0	91	2,603144	2,004321	2,004321	2,004321	2,004321	2,124086
105	0	0	0	0	DESC	0	105	2,303196	2,004321	2,303196	2,303196	DESC	2,228477
119	0	0	0	0	DESC	0	119	2,303196	2,603144	2,004321	2,004321	DESC	2,228746
133	0	DESC	0	0	0	0	133	2,004321	DESC	2,603144	2,603144	2,004321	2,303733
147	0	0	0	0	0	0	147	2,303196	1,707570	2,303196	2,303196	2,004321	2,124296
161	0	0	0	0	0	0	161	2,004321	2,004321	2,303196	2,303196	2,303196	2,183646
175	0	DESC	0	0	0	0	175	2,303196	DESC	2,004321	1,707570	2,004321	2,004852

DESC = desconsiderado

NR = não realizado

Anexo 3

Tabela 19 - Soroaglutinação microscópica em amostras de soro não tratadas (SAM) e tratadas com 2ME (SAM-2ME), de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu-SP, 2007

ANIMAL (RESULTADO SAM TÍTULO)							ANIMAL (RESULTADO SAM-2ME TÍTULO)						
DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA	DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
10	2,004321	1,707570	0	2,004321	0	1,143243	10	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	2,303196	0,460639	14	0	0	0	0	1,707570	0,341514
21	0	0	0	0	2,603144	0,520629	21	0	0	0	0	2,603144	0,520629
28	1,707570	0	2,603144	1,707570	0	1,203657	28	1,707570	0	2,603144	0	0	0,862143
35	2,903633	2,903633	2,303196	2,903633	2,303196	2,663458	35	2,303196	2,903633	2,004321	2,903633	2,303196	2,483596
42	2,603144	1,707570	2,903633	0	1,707570	1,784383	42	2,303196	0	2,603144	0	0	0,981268
49	2,004321	2,004321	0	2,603144	2,603144	1,842986	49	0	0	0	2,603144	2,303196	0,981268
56	1,707570	2,303196	2,603144	2,004321	1,707570	2,065160	56	0	2,004321	2,603144	0	0	0,921493
63	0	2,004321	2,603144	2,903633	2,603144	2,022849	63	0	0	2,303196	2,603144	2,603144	1,501897
70	0	0	2,303196	2,303196	2,903633	1,502005	70	0	0	2,303196	0	2,603144	0,981268
77	2,903633	2,303196	3,204391	2,903633	2,004321	2,663835	77	2,603144	1,707570	2,903633	2,903633	2,004321	2,424460
91	0	0	0	3,204391	2,303196	1,101517	91	0	0	0	3,204391	1,707570	0,982392
105	2,303196	2,303196	2,903633	2,603144	2,303196	2,483273	105	2,004321	2,004321	2,903633	2,603144	2,004321	2,303948
119	2,303196	2,303196	2,303196	2,903633	2,303196	2,423283	119	1,707570	2,303196	0	2,903633	1,707570	1,724394
133	2,004321	2,903633	2,004321	1,707570	0	1,723969	133	0	2,903633	0	0	0	0,580727
147	0	0	2,303196	0	2,603144	0,981268	147	0	0	2,004321	0	2,603144	0,921493
161	0	0	0	2,303196	2,903633	1,041366	161	0	0	0	2,303196	2,903633	1,041366
175	2,603144	0	0	2,303196	0	0,981268	175	2,303196	0	0	2,004321	0	0,861503

Anexo 4

Tabela 20 - Reação de imunofluorescência indireta para anticorpos IgM (RIFI-IgM) e IgG (RIFI-IgG) em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com estirpe patogênica de *L. interrogans* sorovar Pomona, de acordo com a data de colheita. Valores convertidos em log na base 10, após acréscimo do valor um em cada título. Botucatu - SP, 2007

ANIMAL (RESULTADO RIFI IgM TÍTULO)							ANIMAL (RESULTADO RIFI-IgG TÍTULO)						
DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA	DIA	1	2	3	4	5	MÉDIA
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
7	1,707570	0	0	1,707570	1,707570	1,024542	7	0	0	0	0	0	0
10	2,303196	1,707570	1,707570	2,004321	2,303196	2,005171	10	0	0	0	0	1,707570	0,341514
14	2,303196	0	0	1,707570	0	0,802153	14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1,707570	0	0,341514	21	0	1,707570	1,707570	0	2,004321	1,083892
28	0	0	0	0	0	0	28	2,303196	2,004321	2,603144	2,004321	2,303196	2,243636
35	0	0	0	0	0	0	35	2,603144	2,903633	2,004321	2,903633	2,004321	2,483810
42	0	0	0	0	0	0	42	2,303196	2,303196	2,903633	1,707570	0	1,843519
49	0	0	0	0	0	0	49	2,004321	2,303196	2,004321	2,303196	2,004321	2,123871
56	0	0	0	0	0	0	56	1,707570	2,303196	2,603144	1,707570	2,004321	2,065160
63	0	0	0	0	0	0	63	1,707570	2,004321	2,004321	1,707570	2,004321	1,885621
70	0	0	0	0	0	0	70	2,004321	0	2,303196	1,707570	2,303196	1,663657
77	0	0	0	0	0	0	77	2,004321	0	2,004321	1,707570	2,303196	1,603882
91	0	0	0	0	0	0	91	2,004321	1,707570	0	2,303196	2,004321	1,603882
105	0	0	0	0	0	0	105	1,707570	2,004321	2,004321	2,004321	0	1,544107
119	0	0	0	0	0	0	119	2,004321	2,303196	1,707570	2,004321	0	1,603882
133	0	0	0	0	0	0	133	0	2,004321	1,707570	1,707570	2,004321	1,484757
147	0	0	0	0	0	0	147	2,004321	0	1,707570	0	2,004321	1,143243
61	0	0	0	0	0	0	161	2,004321	1,707570	0	1,707570	2,004321	1,484757
175	0	0	0	0	0	0	175	2,004321	0	0	1,707570	2,004321	1,143243

Anexo 5

Protocolo de extração e purificação pelo GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare/Life Sciences®) - método proporcional (scalable), segundo manual do fabricante, com algumas modificações.

1. Adicionar 300µL de solução RBC em um tubo de 1,5mL;
2. Adicionar 100µL de sangue total;
3. Homogeneizar por inversão diversas vezes;
4. Incubar a temp. ambiente/5min.;
5. Centrifugar a 20.000 x g/5min.;
6. Descartar o sobrenadante, deixando aprox. 50µL;
7. Ressuspender em vórtex;
8. Adicionar 500µL de SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO;
9. Misturar em vórtex;
10. Incubar a temp. ambiente/10min.;
11. Preparar tubos de 2mL com a coluna GFX e colocar água ultrapura p/ aquecer a 70°C;
12. Transferir a mistura para a coluna GFX no tubo de 2mL;
13. Centrifugar a 5.000 x g/1min.;
14. Descartar o líquido e voltar a coluna para o tubo;
15. Adicionar 500µL de SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO;
16. Centrifugar a 5.000 x g/1min.;
17. Descartar o líquido e voltar a coluna para o tubo;
18. Adicionar 500µL de SOLUÇÃO DE LAVAGEM;
19. Centrifugar a 20.000 x g/3min.;
20. Descartar o tubo de 2mL;
21. Transferir a coluna para um tubo de 1,5mL;
22. Adicionar 100µL de água ultrapura aquecida a 70°C;
23. Incubar a temp. ambiente/1min.;
24. Centrifugar a 5.000 x g/1min.;
25. Guardar o tubo em freezer -20°C.

Anexo 6

Protocolo de extração e purificação de DNA total de amostras de tecido animal (Protocolo do fenol, clorofórmio e proteinase K).

Adaptado de SOARES, R. M. **Emprego das reações de PCR e nested-PCR na detecção de DNA de parvovirus suíno**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 1998. 73p.

1. Preparar microtubos de 1,5mL para receber as amostras a serem extraídas, adicionando-se 250 μ L de tampão de extração (175 μ L de tampão Tris-NaCl-EDTA – TNE + 25 μ L de proteinase K + 50 μ L de SDS);
2. Adicionar 250 μ L de amostra a ser estudada;
3. Homogeneizar em vórtex por 30 segundos;
4. Incubar em banho-maria a 56°C por uma hora, homogeneizando-se por inversão dos tubos a cada 15 minutos;
5. Adicionar 500 μ L de fenol puro;
6. Homogeneizar em vórtex por 30 segundos;
7. Centrifugar a 13.000 x g por três minutos;
8. Preparar novos microtubos de 1,5mL com 150 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1);
9. Transferir 300 μ L da fase aquosa dos microtubos com amostra para os novos microtubos;
10. Homogeneizar em vórtex por 30 segundos;
11. Centrifugar a 13.000 x g por três minutos;
12. Transferir 200 μ L da fase aquosa para novo microtubo de 1,5mL;
13. Adicionar 35 μ L de acetato de sódio 2M;
14. Adicionar 470 μ L de etanol absoluto gelado e incubar a –20°C *overnight*, ou a –80°C por uma hora;

15. Centrifugar a 14.000 x g por 10 minutos;
16. Verter cuidadosamente o etanol, secando as bordas do tubo com um papel absorvente;
17. Adicionar 470 μ L de etanol 70%;
18. Homogeneizar delicadamente, por inversão dos tubos;
19. Centrifugar a 14.000 x g por 10 minutos;
20. Verter cuidadosamente o etanol;
21. Secar a temperatura ambiente ou em estufa a 37°C;
22. Ressuspender em 100 μ L de água ultrapura;
23. Incubar em banho-maria a 56°C por 30 minutos;
24. Manter congelado a -20°C até o momento do uso.

Apêndices

Apêndice 1

Parecer da comissão de ética em experimentação animal – FMVZ/UNESP– Botucatu-SP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa “**Avaliação sorológica e microbiológica de camundongas experimentalmente infectadas com duas estirpes patogênicas de *Leptospira spp***” Protocolo nº 64/2006-CEEA do(a) Pós-Graduando(a) **Fabio Hiroto Shimabukuro**, nível Doutorado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 21 de setembro de 2006.



PROFª ASS. DRª. MICHIKO SAKATE

Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 13618-000
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

Apêndice 2

Certificado de Saúde Animal dos camundongos adquiridos no CEMIB/UNICAMP-Campinas-SP.

CEMIB/UNICAMP



UNICAMP

ICLAS MONITORING REFERENCE CENTER

International Council for Laboratory Animal Science



Ao

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

UNESP – Botucatu – S.P.

CERTIFICADO DE SAÚDE ANIMAL

Certificamos que os camundongos isogenéticos da linhagem SWISS/Uni, originários da área de Produção SPF (Bloco B1), apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados abaixo relacionados até a data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal-C.Q.S. (*):

1 - Ecto e Endoparasitas : *Myobia musculi*, *Myocoptes musculinus*, *Radfordia affinis*, *Poliplax serrata*, *Laelaps echidinus*, *Psorergates simplex*, *Trichoecius romboutsii*, *Ornithonyssus bacoti*, *Syphacia obvelata*, *Aspiculuris tetraptera*, *Capillaria hepatica*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Cysticercus fasciolaris* (*Strobilocercus fasciolaris*), *Trichuris muris*, *Spironucleus muris*, *Giardia muris*, *Entamoeba muris*, *Tritrichomonas muris*, *Tritrichomonas diminuta*, *Hexamastix muris*, *Eimeria* sp., *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium muris*, *Toxoplasma gondii*.

2 - Bactérias, Rickettsias e fungos : *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma neurolyticum*, *Clostridium piliforme* (*Bacillus piliformis*), *Eperythrozoon coccoides*, *Haemobartonella muris*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter freundii* 4280, *Citrobacter rodentium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leptospira* sp., *Streptococcus beta-hemolítico grupo A*, *Streptobacillus moniliformis*, *Corynebacterium kutscheri*, *Pasteurella pneumotropica*, dermatofitos (*Trichophyton* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*), *Scopulariopsis brevicaulis*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*.

3 - Vírus : vírus da hepatite do camundongo (MHV), parvovírus (vírus minuto do camundongo - MMV e Mouse parvovírus - MPV), vírus da encefalomielite de Theiler (TMEV), poxvírus (vírus da Ectromelia), vírus Sendai, vírus da Coriomeningite linfocitária (LCM), Reovírus tipo 3, Adenovírus murino, Citomegalovírus murino (MCMV), Rotavírus grupo A (Edim), vírus da pneumonia do camundongo (PVM), vírus do Polyoma e K vírus.

Informamos ainda que os mesmos se encontram livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana.

ATENÇÃO: para a manutenção do padrão sanitário descrito é fundamental que os animais sejam transportados em contêineres apropriados, que não devem ser abertos durante o transporte, e que sejam acondicionados em unidades isoladas ou em salas dotadas de sistema de barreiras de proteção adequadas para manutenção de animais SPF.

(*) data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados: Março de 2006.

Campinas, 14 de agosto de 2006.

Dra. Delma Pegolo Alves
Diretora do Cemib/Unicamp

Fone : (0xx19) 3788-7638

Fax : (0xx19) 3788-7670

E-mail : delma@cemib.unicamp.br

Dr. Rovilson Gilioli

Diretoria de Controle de Qualidade Animal
Seção de Controle de Qualidade Sanitária

Fone : (0xx19) 3788-8272 / 3788-8273

E-mail : rovilson@unicamp.br