



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102014011648-6 B1



(22) Data do Depósito: 14/05/2014

(45) Data de Concessão: 03/11/2021

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM ANTICORPO MARCADO, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE IN VITRO, USO, E, KIT PARA DETECÇÃO IN VITRO DA PRESENÇA DE CEPAS DE LEPTOSPIRA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

(51) Int.Cl.: A61K 39/44; G01N 33/533; G01N 33/569.

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO BUTANTAN.

(72) Inventor(es): LARISSA DO RÊGO BARROS MATOS; LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR; PATRÍCIA ANTONIA ESTIMA ABREU DE ANIZ.

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM ANTICORPO MARCADO, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE IN VITRO, USO, E, KIT PARA DETECÇÃO IN VITRO DA PRESENÇA DE CEPAS DE LEPTOSPIRA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS. A presente invenção encontra-se no campo da imunologia. A presente invenção se refere a um processo para obtenção de um anticorpo marcado que compreende as etapas de inoculação de uma cultura de *Leptospira interrogans* em coelho; extração de sangue de coelho inoculado com a cultura de *Leptospira interrogans*; purificação do anticorpo IgG anti-leptospira *interrogans* por meio de precipitação por ácido caprílico; diálise do anticorpo purificado; e conjugação do anticorpo purificado ao éster de acridina dimetil N-Hidroxisuccinamida (DMAE-NHS). A presente invenção se refere ainda a um método para diagnóstico de leptospirose in vitro, que consiste em contatar fluidos biológicos suspeitos de conter leptospiros com o anticorpo IgG anti-leptospira *interrogans* marcado tal como obtido pelo processo supracitado e detectar a ligação do anticorpo marcado à leptospira por quimiluminescência. A presente invenção se refere ainda ao uso do anticorpo marcado, tal como obtido pelo processo supracitado, para a detecção de leptospiros in vitro e a um kit para detecção in vitro da presença de cepas de leptospira em (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "**PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM ANTICORPO MARCADO, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE *IN VITRO*, USO, E, KIT PARA DETECÇÃO *IN VITRO* DA PRESENÇA DE CEPAS DE LEPTOSPIRA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS**".

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção encontra-se no campo da imunologia. A presente invenção se refere a um processo para obtenção de um anticorpo marcado. A presente invenção se refere ainda a um método para diagnóstico de leptospirose *in vitro*. A presente invenção se refere ainda ao uso do anticorpo marcado e a um kit para detecção *in vitro* da presença de cepas de leptospira em fluidos biológicos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A leptospirose é uma zoonose bacteriana caracterizada por manifestações clínicas que variam de infecções febris leves a formas mais graves, como icterícia, hemorragias e comprometimento hepático e/ou renal (Lomar *et al*, 2005; Pernambuco, 2012; Wang *et al*, 2012; Pinne & Haake, 2013). É uma doença de grande impacto na saúde pública e também econômico, devido aos custos hospitalares e perdas de dias de trabalho, além de prejuízos na agropecuária (Brasil, 2009; Pernambuco, 2012; Murray, 2013). É mundialmente distribuída, estando

presente em todos os continentes, exceto na Antártica (Adler & De La Peña Moctezuma, 2010), porém ainda é mais comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais (Levett, 2004; Pinne & Haake, 2013) e em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, nos quais as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a sobrevivência e disseminação da bactéria, estando a mesma, portanto, associada à umidade, condições precárias de infraestrutura, alta incidência de roedores e diagnóstico tardio (Abgueguen *et al*, 2008; Lau *et al*, 2010; Nabity *et al*, 2012).

[0003] Descrita brevemente pela primeira vez em 1880 no Cairo, a leptospirose recebeu várias denominações diferentes como "doença dos pescadores", "febre outonal" e "tifo canino". Já em 1886, foi detalhadamente descrita por Adolf Weil a partir da observação de casos clínicos em pacientes humanos que apresentavam quadro de icterícia, nefrite e hemorragias peculiares. Em 1907 o microrganismo foi visualizado em corte de tecido renal pela primeira vez, mas apenas em 1915 a bactéria foi cultivada e identificada como agente etiológico da doença, denominada de *Spirocheta icterohaemorrhagiae*. A importância do rato como animal reservatório foi verificada logo após a descoberta do agente etiológico, e em 1917 o microrganismo foi isolado de um roedor pela primeira vez.

Em 1922 foi relatado o primeiro caso de leptospirose associado à exposição a roedores, e por muitos anos apenas o rato foi considerado como hospedeiro, porém atualmente sabe-se que a leptospirose também está associada a outros animais domésticos e silvestres (Hinrichsen *et al*, 2005; Lomar *et al*, 2005; Shah, 2012; Musso & Scola, 2013).

[0004] É uma doença emergente negligenciada (Chagas-Junior *et al*, 2012; Wang *et al*, 2012), de caráter endêmico com surtos epidêmicos (Hinrichsen *et al*, 2005; Davis *et al*, 2009), e um grande problema de saúde pública mundial que atinge principalmente a América Latina e Sudoeste da Ásia, além de Caribe e Oceania (Musso & Scola, 2013; Picardeau, 2013). Países como Índia, Siri Lanka, Vietnã, China, Brasil, Tailândia, Malásia e Ilhas Pacíficas são considerados áreas de risco para o desenvolvimento da doença. Austrália, Nova Zelândia e Havaí apresentam os maiores índices de incidência de leptospirose entre os países desenvolvidos (Lau *et al*, 2010). São definidos basicamente três tipos de padrões epidemiológicos: 1) em climas temperados, onde alguns sorovares estão envolvidos e a infecção humana ocorre pelo contato direto com infectados animais, 2) em áreas úmidas tropicais, onde há muitos mais sorovares que infectam seres humanos e animais, e grandes números de animais reservatórios, e 3) no meio urbano em que roedores são o principal veículo

de origem da infecção (Musso & Scola, 2013). São estimados mais de um milhão de casos por ano de leptospirose grave, com morte em torno de 10-30% dos casos. A incidência em regiões tropicais é de 10-100/100.000 habitantes, podendo atingir valores superiores em surtos epidêmicos, enquanto em regiões de clima temperado a incidência é de 0,1-1/100.000 habitantes (Musso & Scola, 2013; Picardeau, 2013; Verma *et al*, 2013).

[0005] No Brasil, a leptospirose apresenta surtos epidêmicos em períodos de chuva (Brasil, 2009; Pernambuco, 2012) e é encontrada com maior frequência nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, Pará, Bahia e Pernambuco (Hinrichsen *et al*, 2005). Foram confirmados 27.330 casos de leptospirose no período de 2001 a 2008, sendo em média registrados 3.416 por ano, variando de 2.773 a 4.373 casos, em 2002 e em 2006, respectivamente. A letalidade no país, nesse período, foi de 11,1% (Brasil, 2010). De acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (MS/SVS), o estado de São Paulo possui os maiores índices de morbidade e mortalidade da região sudeste, com 2.045 infectados no período de Janeiro/2008 a Março/2012, e 80 mortes no ano de 2010, índices que correspondem, respectivamente, a 63,21% e 51,61% da região. Enquanto os casos registrados em Pernambuco, para o mesmo período (Janeiro/2008 a

Março/2012), representam 29,09% de morbidade e 29,79% de mortalidade em 2010 de toda a região Nordeste, com 707 infectados e 28 mortes, perdendo apenas para a Bahia (Brasil, 2012).

[0006] A leptospirose é causada por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, capazes de infectar animais e humanos (Chagas-Junior et al, 2009; Wang et al, 2012; Janwitthayanan et al, 2013). Até 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: patogênicas chamadas de *Leptospira interrogans* e não patogênicas, ou saprófitas, chamadas de *Leptospira biflexa*. Estas espécies foram divididas em variantes sorológicas (sorovares), e agrupadas em sorogrupos (Zareki et al, 2010; Musso & Scola, 2013).

[0007] A *Leptospira spp.* é uma bactéria longa, fina e helicoidal com alta motilidade, que possui envelope celular com propriedades comuns a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Vijayachari et al, 2008; Murray, 2013), com comprimento de 6 a 20 μm e 0,1 μm de diâmetro e ganchos nas extremidades, é um organismo aeróbio obrigatório (Lomar et al, 2005; Widiyanti et al, 2013) e compreende o gênero *Leptospira*, pertencente à família *Leptospiraceae* da ordem *Spirochetetales* (Hinrichsen et al, 2005; Adler & De La Peña Moctezuma, 2010; Widiyanti et al, 2013).

[0008] Atualmente, o gênero *Leptospira* compreende

20 espécies com mais de 300 sorovares, divididos em 20 sorogrupos, sendo o lipopolissacarídeo (LPS) fundamental para esta classificação. Esta classificação, chamada fenotípica, é definida pela aglutinação e absorção de antígenos homólogos a partir da identificação do antígeno O presente no LPS que permite a diferenciação das espécies e os sorovares (Lim, 2011; Picardeau, 2013). A classificação antigênica ainda é muito utilizada por ter um grande valor epidemiológico e clínico, porém não é uma classificação taxonômica (Lim, 2011; Musso & Scola, 2013).

[0009] Mais recentemente, uma nova classificação utilizando a homologia do DNA (ácido desoxirribonucleico) tem sido relatada (Shah, 2012). As espécies genômicas, ou genomoespécies, são classificadas em grupos de bactérias que apresentem 70% ou mais de homologia dos seus DNA's (Vijayachari *et al*, 2008), sendo uma classificação independente da classificação sorológica (Barthi *et al*, 2003). Os métodos moleculares são baseados na digestão de DNA, com a utilização de enzimas de restrição; gel de eletroforese *pulse Field* (PFGE); *ribotyping*; *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e amplificação de sequenciamento. A classificação genotípica é baseada na hibridização de DNA, e são descritas 17 genomoespécies, dentre as quais treze são patogênicas (*L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L.*

meyeri, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. alstonii*, e *L. terpstrae*) e quatro saprófitas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. vanthielii* e *L. yanagawae*) (Barthi *et al*, 2003; Vijayachari *et al*, 2008; Zareki *et al*, 2010; Lim, 2011).

[0010] Vários animais sinantrópicos, domésticos e selvagens podem comportar-se como fontes de infecção de leptospiros, pois as mantém vivas e as disseminam pelo meio ambiente. Em regiões urbanas, os principais reservatórios são os roedores (especialmente o rato de esgoto - *Rattus norvegicus*), que se constituem em portadores são universais (Lomar *et al*, 2005; Brasil, 2009). Em animais, pode ser transmitida verticalmente de mãe para filho, tornando-se uma causa frequente de abortamentos, infertilidade e morte (Pinne & Haake, 2013). O contato indireto, através de água ou solo contaminados com urina ou direto com tecidos de animais reservatórios, convalescentes, portadores e doentes, é a principal forma de infecção do homem, hospedeiro acidental da bactéria (Adler *et al*, 2011; Pinne & Haake, 2013). Outras formas menos comuns de transmissão são contato com sangue, tecidos e órgãos de animais infectados, transmissão acidental em laboratórios e ingestão de água ou alimentos contaminados (Brasil, 2005; Cinco, 2010), inalação de aerossóis e mordidas de animais. A transmissão inter-humana

é pouco relatada (Musso & Scola, 2013). É considerada uma doença ocupacional (Levett, 2004; Cinco, 2010) diretamente relacionada a veterinários, agricultores, trabalhadores de matadouros, caçadores de roedores, trabalhadores de controle, e outras ocupações que requerem contato com animais e água por longos períodos (Lau *et al*, 2010; Musso & Scola, 2013); e também pode ser associada a atividades recreativas como esportes que envolvem água, como canoagem e natação (Bharti *et al*, 2003; Lau *et al*, 2010; Shah, 2012).

[0011] As bactérias eliminadas por animais infectados atingem o organismo humano a partir da penetração pela pele lesionada, pelas mucosas, e ainda, pela pele íntegra exposta a água e/ou solo contaminados por longos períodos (Pernambuco, 2012; Wang *et al*, 2012; Widiyanti *et al*, 2013). Ao penetrarem no organismo, as leptospiras atingem a corrente sanguínea permanecendo circulantes por aproximadamente sete dias, constituindo-se a fase de bacteremia (Adler & De La Peña Moctezuma, 2010). São fácil e rapidamente disseminadas para todos os órgãos, porém seus órgãos alvo são o fígado, rins, pulmões, coração e músculos (Hinrichsen *et al*, 2005; Lomar *et al*, 2005), residem preferencialmente nos túbulos proximais renais e por isso são eliminadas na urina (Davis *et al*, 2009; Murray, 2013). A primeira lesão observada é a

lesão do endotélio de pequenos vasos sanguíneos que podem conduzir à isquemia localizada, ocasionando uma insuficiência renal tubular, necrose hepatocelular e ainda dano pulmonar e meningite; hemorragias podem ocorrer em casos graves com frequente plaquetopenia e granulocitose. Uma vez que os anticorpos circulantes aparecem, as leptospiros são removidas da circulação por fagocitose (Adler & De La Peña Moctezuma, 2010), ou escapam e migram para os órgãos alvo (Davis *et al*, 2009). As leptospiros invadem os órgãos devido à ação de toxinas ou componentes celulares citotóxicos por ela liberados, que geram o aparecimento dos sintomas (Hinrichsen *et al*, 2005; Adler & De La Peña Moctezuma, 2010).

[0012] Ainda não são bem descritos e entendidos os mecanismos pelos quais as leptospiros invadem, aderem e colonizam os tecidos do hospedeiro que resultam no estabelecimento e avanço da doença. Avanços significativos estão sendo obtidos em vários estudos moleculares realizados, porém a base molecular determinante de sua virulência ainda permanece desconhecida, devido principalmente à ausência de instrumentos genéticos para a manipulação de *Leptospira*. Alguns mecanismos patogênicos são relatados, porém sem a determinação de um componente específico responsável pela atividade da bactéria (Adler & De La Peña Moctezuma, 2010; Murray, 2013).

[0013] O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente antigênico das Leptospiras e possui funções como aglutinação, opsonização e ligação a anticorpos (Lucas *et al*, 2011). Algumas proteínas têm sido associadas a funções essenciais na colonização do hospedeiro, como aderência à matriz extracelular e regulação complementar; mutações têm sido reveladas como fatores importantes na patogênese, pois podem afetar a motilidade, a aquisição de nutrientes, sobrevivência a macrófagos, a resistência à temperatura e estresse oxidativo, porém ainda sem mecanismos bem esclarecidos de como isso ocorre (Murray, 2013). Dentre essas proteínas, as mais importantes descritas até o presente momento, são as proteínas de membrana externa, chamadas OMPs, que se aderem às membranas por interações hidrofóbicas - lipoproteínas, ou se encontram localizadas na transmembrana ou ainda no espaço periplasmático. As OMPs são consideradas importantes candidatos vacinais e a principal delas é a lipoproteína LipL32 (Pinne & Haake, 2013) devido a sua produção em grande quantidade, porém o seu papel ainda é pouco entendido, por não se apresentar fundamental para a virulência das bactérias (Murray, 2013), embora seja conservada entre as leptospiras patogênicas, apresente imunogenicidade e expressão nos órgãos alvos durante a infecção aguda em modelos animais (Chaemchuen *et al*, 2011).

[0014] Em humanos, o período de incubação da doença pode variar de um a 30 dias, porém é mais comum ocorrer de cinco a 14 dias após a contaminação (Hinrichsen *et al*, 2005; Brasil, 2005; Brasil, 2009; Lau *et al*, 2010). A leptospirose pode se apresentar assintomaticamente; com sintomas típicos de uma gripe como febre, cefaleia, diarreia, vômitos e mialgia; com manifestações mais graves como uma meningite, miocardite, pneumonia, hepatite ou nefrite; ou ainda gerar complicações mais comprometedoras como disfunção hepática (icterícia), falência renal e hemorragias (principalmente pulmonar) - tríade que caracteriza a forma clínica mais comum, chamada de Síndrome de Weil - que podem levar o indivíduo a uma falência múltipla dos órgãos acompanhada de morte (Palaniappan *et al*, 2007; Cinco, 2010; Widiyanti *et al*, 2013). É dificilmente diagnosticada por apresentar sintomas inespecíficos comuns a outras doenças, sendo inúmeras vezes subdiagnosticada ou confundida com outras infecções tropicais como malária, dengue, febre hemorrágica, hepatites e meningites (Lau *et al*, 2010).

[0015] Apresenta-se de duas formas clínicas distintas: anictérica ou ictérica. A forma anictérica possui duas fases. A primeira, septicêmica ou leptospirêmica ou aguda, é caracterizada principalmente pelo aparecimento abrupto de febre alta e remitente,

calafrios, cefaleia intensa, prostração e mialgia especialmente nas panturrilhas (podendo aparecer dores musculares nas coxas e abdômen). Nesta fase as leptospiras estão circulantes e são encontradas no sangue - leptospiremia (Lomar *et al*, 2005; Brasil, 2005; Brasil, 2009; Picardeau, 2013). Outros sintomas como anorexia, náuseas, vômitos, diarreias, artralgias, hiperemia ou conjuntivite acompanhada de hemorragia, fotofobia e dor ocular, bem como hemorragia digestiva agravada por melena ou enterorragia, hepatomegalia, esplenomegalia e pancreatite também podem ocorrer, sendo os três últimos mais raros. Epistaxe, dor torácica, tosse seca ou com expectoração hemoptoica ou não (com ocorrência de hemoptise franca de forma súbita e óbito por asfixia), dispnéia e cianose também se apresentam em alguns casos. Lesões cutâneas como exantemas maculares, máculo-papulares, eritematosos, urticariformes, petequiais ou hemorrágicos podem ser observados. Distúrbios neurológicos como confusão, delírio e alucinações, sinais de irritação meníngea, e outros, são raros, mas também podem estar presentes (Lomar *et al*, 2005; Brasil, 2005; Brasil, 2009).

[0016] Os anticorpos específicos produzidos podem ser detectados no soro na fase imune, segunda fase da forma anictérica. Anticorpos do tipo IgM normalmente aparecem mais precocemente do que os anticorpos do tipo IgG

e podem ser identificados de cinco a sete dias após o aparecimento dos sintomas, mas podem estar presentes por até dois meses após a infecção ou permanecerem circulantes em baixos títulos por anos (Who, 2003; Levett, 2004; Shah, 2012). Já a detecção dos anticorpos IgG é mais variável, podendo não ser detectados ou serem detectados apenas em curtos períodos de tempo, mas eles podem permanecer no organismo por vários anos (Who, 2003). O aumento do título de anticorpos está relacionado à eliminação das leptospiras circulantes no sangue. Em alguns casos, leptospiras antigênicas ou DNA podem não ser detectados no sangue devido a uma fraca ou curta leptospiremia na fase aguda; bem como amostras coletadas antes da soroconversão podem levar a resultados falso-negativos na detecção de anticorpos (Picardeau, 2013).

[0017] Esta fase apresenta a meningite como principal sintoma, caracterizada por cefaleia intensa, vômitos e irritação meníngea; encefalite, paralisias focais, espasticidade, nistagmo, convulsões, distúrbios visuais de origem central, neurite periférica, paralisia de nervos cranianos, radiculite, síndrome de Guillain-Barré e mielite ocorrem em menor frequência, e ainda acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos ou meníngeos, com quadros graves de hipertensão intracraniana e coma. A uveíte também é uma manifestação clínica importante com

aparecimento nessa fase (Lomar *et al*, 2005; Brasil, 2005; Brasil, 2009).

[0018] A forma ictérica é a forma grave e mais comum da doença, normalmente devida a uma evolução da forma anictérica com desenvolvimento de icterícia grave. É comumente chamada de Síndrome de Weil, e não apresenta as fases leptospirêmica e imune bem definidas; os sintomas são os mesmos descritos na fase septicêmica da forma anictérica, porém com maior intensidade e duração, acompanhados de disfunção hepática severa, associada à disfunção renal, hemorragias, alterações hemodinâmicas, cardíacas, pulmonares e neurológicas, além de febre persistente. A icterícia rubínica é intensa, com urina escura, de início abrupto e com altos níveis de bilirrubinas (Lomar *et al*, 2005; Brasil, 2005; Brasil, 2009).

[0019] O controle e erradicação da leptospirose são difíceis, visto que existem vários tipos de espécies, sorovares e sorogrupos cada um com características distintas e peculiares; além das diferentes fontes e formas de infecção. Práticas saudáveis de higiene pessoal e tratamento de água, recolhimento de lixo e condições sanitárias adequadas são importantes formas de contribuir para a extinção dessa grave doença, estando o controle, portanto, diretamente associado a condições locais, o que

dificulta ainda mais o processo (Lim, 2011; Shah, 2012; Verma *et al*, 2013). É possível fazer o uso de antibióticos também como medida profilática (Pappas & Cascio, 2006), para adultos expostos a ambientes de risco, pode-se fazer o uso semanal de 200mg do antibiótico doxicilina (Barthi *et al*, 2003; Shah, 2012); já em crianças ainda não se tem bem estabelecida a profilaxia, mas tem-se testado a eficiência da amoxicilina como antibiótico preventivo (Shah, 2012).

[0020] O tratamento com antibióticos é eficiente e deve ser iniciado imediatamente após a suspeita e/ou diagnóstico. A benzil penicilina com aplicação intravenosa é o antibiótico de escolha. Para pacientes hipersensíveis à penicilina, é recomendado o uso de doxiciclina (Barthi *et al*, 2003; Vijayachari *et al*, 2008; Lim, 2011). A penicilina G demonstra ser eficaz na diminuição do período de febre e a disfunção renal, sendo indicada para casos graves da doença (Barthi *et al*, 2003; Lim, 2011); a ampicilina e a amoxicilina são indicadas em casos de leptospirose branda (Barthi *et al*, 2003). Outros antibióticos também podem ser eficientes, como e aminoglicosídeos (Lim, 2011), cefalosporinas de 3ª geração, ciprofloxacina (Pappas & Cascio, 2006), eritromicina, cefotaxima (Who, 2003) e as tetraciclinas, mas as últimas são contra-indicadas em casos de pacientes

com insuficiência renal, em crianças e mulheres grávidas (Vijayachari *et al*, 2008). Apesar da sensibilidade da *Leptospira* aos antibióticos, altas taxas de mortalidade (superiores a 20%) ainda são registradas nas regiões com infra-estrutura precária, com letalidade de até 70% para leptospirose hemorrágica pulmonar grave (Adler *et al*, 2011).

[0021] O desenvolvimento de vacinas para uso humano e veterinário é um grande desafio atualmente (Pappas & Cascio, 2006). As principais vacinas disponíveis são suspensões celulares mono ou polivalentes, inativadas por agentes químicos ou físicos, tais como formaldeído ou fenol e calor (Verma *et al*, 2013). Estas composições vacinais chamadas bacterinas apresentam várias deficiências, como a proteção restrita aos sorovares presentes na preparação, reatogenicidade associada aos contaminantes oriundos do processo de obtenção, como componentes do meio e lipopolissacarídeos, a não indução da imunidade em longo prazo, o que requer administração anual ou semestral (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003).

[0022] Porém, subunidades vacinais têm sido investigadas e evidenciadas como potencializadores da atividade das bacterinas, como proteção antigênica e proteção cruzada em vacinas atenuadas e inativadas. Sendo possível observar proteção cruzada contra infecção aguda

em hamster com vacina atenuada experimental; a proteção mediada por proteínas também pode ser uma alternativa na ausência de resposta ao LPS heterólogo; além da utilização de antígenos como subunidades vacinais. Muitas proteínas recombinantes também vêm sendo estudadas como candidatos vacinais (Murray *et al*, 2012). Em alguns países, vacinas sorovar-específicas têm sido avaliadas para uso humano (Shah, 2012), mas, caso sejam aprovadas, devem ser repetidas anual ou semestralmente, em surtos epidêmicos, e são recomendadas apenas para grupos de alto risco (Shah, 2012; Verma *et al*, 2013). Vacinas baseadas no DNA são capazes de estimular resposta imune humoral e celular em modelos animais, o que sugere uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose (Hartwig *et al*, 2013).

[0023] Neste sentido, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina polivalente com o emprego de proteínas de membrana de leptospirosas, que além de estarem envolvidas na interação das bactérias com as células do hospedeiro, são bastante conservadas entre as diferentes espécies e sorovares (Haake *et al.*, 1999; Branger *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2007). Muitas proteínas recombinantes também vêm sendo estudadas como candidatos vacinais (Haake *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2007; Murray *et al*, 2012). Vacinas baseadas no DNA são capazes de estimular resposta

imune humoral e celular, em modelos animais, o que sugere uma estratégia promissora para novas vacinas contra a leptospirose (Hartwig *et al*, 2013).

[0024] A inespecificidade dos sintomas ocasiona erros frequentes no diagnóstico e seleção do tratamento médico, que resultam em altas taxas de mortalidade (Bracho *et al*, 2010). Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento o quadro é agravado pela falta de sistemas de vigilância eficazes, com laboratórios adequados que ofereçam disponibilidade de diagnóstico laboratorial de qualidade. Por essas deficiências, a incidência da leptospirose nesses países é subestimada ou subdiagnosticada (Chagas-Junior *et al*, 2012; Musso & Scola, 2013). O desenvolvimento de um diagnóstico rápido, específico e sensível é extremamente importante para que o tratamento seja iniciado rapidamente e forneça resultados mais efetivos (Ooteman *et al*, 2006).

[0025] Os diferentes métodos de diagnósticos podem ser didaticamente categorizados em bacteriológicos, microscópicos, sorológicos e moleculares, sendo assim classificados em diretos (isolamento, visualização direta ou amplificação gênica) e indiretos (detecção de anticorpos) (Vijayachari *et al*, 2008).

[0026] Um dos métodos de diagnósticos utilizados que se pode citar é o Teste de Aglutinação Microscópica

(MAT), considerado o padrão ouro para o diagnóstico sorológico da leptospirose, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, é um teste sorogrupo específico. A partir dele se identifica o sorogrupo infectante, porém sua identificação é apenas sorológica (Barthi *et al*, 2003; Perez & Goarant, 2010; Shah, 2012; Picardeau, 2013). No diagnóstico por MAT são utilizados anticorpos aglutinantes antígeno-específicos de diferentes sorogrupos de leptospiras endêmicas comuns a uma região (Barthi *et al*, 2003; Aviat *et al*, 2010; Shah, 2012). O método consiste em incubar o soro do paciente com diferentes estirpes de leptospiras, em diluição seriada. O teste é positivo quando o soro testado apresenta uma aglutinação mínima de 50% quando comparada ao antígeno controle sem soro (Picardeau, 2013). As desvantagens deste método são a necessidade da manutenção de culturas vivas de leptospira, com risco de contaminação para o operador e a baixa sensibilidade quando considerado o tempo de infecção e a elevada concentração de anticorpos necessários (Vasconcellos, 1979; Genovez e Yasuda, 1988). Além disso, em alguns casos, para a confirmação do diagnóstico da leptospirose utilizando o MAT recomenda-se comparar duas amostras de soro, a primeira coletada na fase aguda da doença e a segunda, duas ou três semanas após. O aumento no título de anticorpos de quatro ou mais vezes da primeira para segunda

amostra confirma o diagnóstico da infecção aguda. Se houver um resultado não reagente na primeira amostra e um resultado reagente com título maior ou igual a 200 na segunda amostra, tem-se o que se conhece como soroconversão, o que também confirma o caso. Estas situações podem atrasar a confirmação do diagnóstico clínico da doença, podendo acarretar na progressão para formas mais graves.

[0027] A detecção direta de leptospiras em microscópio de campo escuro a partir do Isolamento em Cultura (CI) da bactéria é um dos principais métodos de diagnóstico utilizados (Chagas-Junior *et al*, 2009). Para seu crescimento, a bactéria precisa de um meio que seja enriquecido com nutrientes favoráveis e ainda, antimicrobianos seletivos que impeçam o crescimento de contaminantes (Saengjaruk *et al*, 2002); a leptospira apresenta ótimo crescimento nos meios especiais semissólido de *Fletcher* e o líquido de *Ellinghausen, MacCullough, Johnson & Harris* (EMJH), que por isso são utilizados em rotina (Lim, 2011). Podem ser detectadas no sangue entre 10^2 e 10^6 leptospiras/mL durante a fase aguda da leptospirose, sendo mais comumente encontradas aproximadamente 10^4 leptospiras/mL de sangue na visualização direta (Picardeau, 2013). É também um protocolo padrão ouro, além de ser um diagnóstico

definitivo, porém, apesar de ser um método barato, apresenta potenciais dificuldades como altos índices de contaminação, baixa sensibilidade, longo período de incubação, alto risco de resultados falso-positivos e necessidade de vasto treinamento profissional (Chagas-Junior *et al*, 2009; Picardeau, 2013).

[0028] Entre os métodos sorológicos convencionais encontram-se os testes imunoenzimáticos, chamados de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que são bastante utilizados em ensaios para a detecção de anticorpos, tanto do tipo IgM quanto do tipo IgG, contra a leptospira íntegra (Shah, 2012; Picardeau, 2013). Kits comerciais de ELISA utilizam antígenos derivados de estirpes não patogênicas, como por exemplo, a *L. biflexa* cepa Patoc I (Chalayon *et al*, 2011). A principal vantagem desse método é que com apenas um antígeno gênero-específico presente em várias leptospiros é possível realizar a sua identificação, sem a necessidade de confirmação do diagnóstico com o crescimento da bactéria em cultura. Porém, como desvantagem possui baixa especificidade, menor sensibilidade comparada ao MAT, alto índice de reações cruzadas para outras doenças e a impossibilidade de diferenciar sorovares (Chalayon *et al*, 2011; Shah, 2012). Mas é um importante instrumento para o diagnóstico clínico, que não exige diferenciação sorológica para o início do tratamento

(Shah, 2012).

[0029] Atualmente uma das técnicas que apresentam os melhores resultados em termos de sensibilidade e especificidade são aquelas que envolvem biologia molecular, principalmente Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR) e em Tempo Real ou Quantitativa (qPCR) (Ooteman *et al*, 2006; Chagas-Junior *et al*, 2012), que permite um diagnóstico precoce e preciso em uma única amostra positiva; porém esta técnica não fornece dados epidemiológicos (Perez & Goarant, 2010) e possui alto custo (Shah, 2012). O método de PCR tem sido usado para um grande número de microrganismo, incluindo os de importância clínica. Em métodos diagnósticos baseados em PCR detecta-se o DNA de leptospiros obtidos de amostras biológicas de animais infectados experimentalmente (Ooteman *et al*, 2006), onde a amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA permite a diferenciação das espécies patogênicas e não patogênicas de leptospiros (Barthi *et al*, 2003; Cerqueira & Picardeau, 2009), além da detecção de sequências repetidas inseridas que aumenta a sensibilidade do método (Cerqueira & Picardeau, 2009). Apresentam-se disponíveis vários kits comerciais para o isolamento rápido de DNA, que utilizam sangue ou urina para testes de diagnóstico que utilizam a purificação de ácidos nucleicos, a partir de grânulos magnéticos que permitem a

concentração dos ácidos nucleicos ou antígenos presentes nas amostras. Para a realização de testes deste tipo, pode ser utilizado sangue coagulado (contendo soro e coágulo de sangue) ou não coagulado (contendo plasma, células vermelhas ou brancas e plaquetas); embora ainda haja controvérsias, alguns autores relatam que o plasma com EDTA apresenta melhores resultados para a amplificação dos genes, porém é menos sensível que outras frações. Ainda podem ser utilizados o fluido cefaloraquidiano ou a urina (Picardeau, 2013).

[0030] Outros testes sorológicos conhecidos são ensaios indiretos de hemaglutinação, macroaglutinação, testes de aglutinação em látex e imunofluorescência indireta, porém são pouco utilizados por apresentarem especificidade e sensibilidade insatisfatórias quando comparados com outros testes como o ELISA (Shah, 12; Picardeau, 2013). Antígenos de proteínas recombinantes têm sido estudados como potenciais ferramentas de diagnóstico (Chalayon *et al*, 2011).

[0031] A emissão de luz através da alteração do nível energético de átomos ou moléculas caracteriza a luminescência, fenômeno este que pode ocorrer por reações químicas, radiação ou interações biológicas, denominado respectivamente de quimiluminescência, fotoluminescência ou bioluminescência (Van Dyke, 1988; Dodeigne *et al*, 2000).

Ainda são descritos outros tipos de luminescência, que são menos estudados e possuem menor utilização, tais como a sonoluminescência, a mecano ou tribuloluminescência, a radioluminescência e a termoluminescência (Sotomayor *et al*, 2008).

[0032] Estes átomos ou moléculas ao absorverem energia, fazem transições entre seus níveis energéticos que são responsáveis pela excitação dos elétrons presentes em orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO, *highest occupied molecular orbitals*) para os orbitais desocupados de mais baixa energia (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbitals*). As partículas-ondas que transitam entre os orbitais HOMO e LUMO são chamadas de fótons (Ximenes, 2000).

[0033] Ao sofrer uma transição eletrônica, o elétron pode ter seu campo magnético (spin) conservado ou invertido, no qual terá um estado excitado diferente, e com características próprias. Quando há a conservação do spin, o elétron está em um estado excitado singlete, e quando ocorre a inversão do spin, o seu estado excitado será o tripleto. O estado excitado singlete é o que possui maior energia e ocorre mais comumente, porém seu tempo de vida é menor (nanossegundos). Já o estado excitado tripleto, possui um tempo de vida maior (de milisegundos a segundos), embora com menor energia, emissão de luz em

maior comprimento de onda e ocorre com menos frequência (Ximenes, 2000).

[0034] Uma vez excitado o átomo ou molécula, necessita voltar ao seu estado fundamental, por encontrar-se em um estado termodinamicamente instável. Para tanto, este átomo ou molécula produz e libera uma radiação eletromagnética em forma de luz ou outro tipo de radiação, processo este que caracteriza a luminescência conforme citado anteriormente. No entanto, após a excitação, a emissão de radiação eletromagnética pode ocorrer imediata ou tardiamente. Na fluorescência o átomo ou molécula encontra-se no estado singleto e emite a energia absorvida de forma imediata. Já na fosforescência, o átomo ou molécula transitará de um estado tripleto para o estado fundamental singleto (Rongen *et al*, 1994; Ximenes, 2000; Moreira, 2009).

[0035] Embora muitas substâncias orgânicas sejam luminescentes, elas apresentam baixo rendimento quântico, que pode ser decorrente da baixa transferência de energia ou da molécula excitada ser um fraco emissor (Dodeigne *et al*, 2000). Tornando, assim, a luminescência uma propriedade incomum, encontrada apenas em algumas moléculas, e, portanto, que apresenta uma seletividade importante para o desenvolvimento de métodos luminescentes que permite uma quantificação seletiva e sensível, além do

baixo custo de manutenção e análise quando comparados a outros métodos analíticos (Sotomayor *et al*, 2008).

[0036] Sendo assim, tem se tornado cada vez mais crescente o interesse por métodos de diagnósticos que ofereçam técnicas com maior sensibilidade, especificidade, precisão, exatidão e rapidez.

[0037] Os primeiros relatos e classificações da luminescência foram realizados pelos gregos e romanos, a partir das características peculiares de seres luminosos, como peixes, bactérias e fungos. Porém, as investigações científicas da bioluminescência foram iniciadas apenas no século XVII (Dodeigne *et al*, 2000; Moreira, 2009).

[0038] O processo de quimiluminescência foi descrito e conceituado pela primeira vez em 1877 por Radziszewski, ao observar a emissão de luz amarela a partir da autoxidação da lofina. Porém sua classificação foi documentada apenas em 1888, por Wiedemann, o qual definiu que "a emissão de luz durante os processos químicos deveria ser classificada como quimiluminescência". Wiedemann também propôs a diferenciação entre a quimiluminescência e a incandescência, sendo a última um processo físico, no qual a emissão de luz ocorre por um aumento de temperatura (Bartoloni *et al*, 2011).

[0039] O primeiro composto quimiluminescente a ser sintetizado foi a lofina (2,4,5- trifenilimidazol), ainda

em 1877. Anos mais tarde, foram descritas as propriedades quimiluminescentes do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-dione). Em 1935 mais um composto foi sintetizado, a lucigenina [nitrito bis(N-metil-acridina)], a qual teve suas propriedades descritas por Gleu e Petsch, que declararam sua emissão de luz na faixa verde ou azul (Santos *et al*, 1993; Dodeigne *et al*, 2000).

[0040] McCapra propôs, em 1964, os mecanismos de formação dos dioxetanos cíclicos como meio de explicar a quimiluminescência de saltos, dos perioxalatos (Dodeigne *et al*, 2000). A luciferase, presente nos vagalumes, foi isolada em 1947, e quase trinta anos mais tarde, em 1976, o processo de quimiluminescência foi descrito pela primeira vez como um ensaio laboratorial (Santos *et al*, 1993). Os derivados de acridina foram conhecidos como moléculas quimiluminescentes em 1935 por Gleu e Petsch (Dodeigne *et al*, 2000).

[0041] A quimiluminescência é um tipo de luminescência baseada na emissão de luz de um átomo ou molécula excitado gerada no decorrer de uma reação química, não sendo necessária nenhuma fonte eletromagnética. Neste fenômeno, o átomo ou molécula não absorve a luz, e não a emite em forma de fótons, o que o difere da fotoluminescência. A reação quimiluminescente também difere das reações térmicas, nas quais a energia em excesso é

dissipada na forma de calor, excitação rotacional ou vibracional (Santos *et al*, 1993; Dodeigne *et al*, 2000; Sotomayor *et al*, 2008; Bartoloni *et al*, 2011).

[0042] Quando a energia absorvida por um átomo ou molécula é suficiente para gerar o estado de transição do mesmo, e este por sua vez possui energia superior ao produto a ser formado, o produto será gerado também em seu estado excitado, e ao retornar para o seu estado fundamental liberará a energia em forma de luz. Em uma reação exotérmica, o átomo ou molécula em estado de transição possui energia inferior ao produto formado no estado excitado, e, portanto, forma o produto no seu estado fundamental, e libera o excesso de energia sob a forma de calor (Santos *et al*, 1993; Bartoloni *et al*, 2011).

[0043] O processo quimiluminescente pode ocorrer de duas formas: direta ou indiretamente, caracterizando, respectivamente, a quimiluminescência direta ou indireta, a depender do conteúdo energético que a mesma possui. Na quimiluminescência direta, o produto excitado emite fótons sob a forma de luz ao retornar ao seu estado fundamental. Enquanto na quimiluminescência indireta a energia não é suficiente para excitar o produto formado, este, por sua vez, transfere a energia para outra molécula, que atinge seu estado excitado, e ao retornar para o seu estado fundamental libera os fótons (Santos *et al*, 1993;

Moreira, 2009).

[0044] Afirma-se que uma reação quimiluminescente ocorre, de maneira geral, em três etapas principais: 1- formação de um intermediário de alta energia (IAE), a partir de transformações químicas de uma molécula no seu estado fundamental; 2- quimiexcitação, que pode ocorrer através de interações com reagentes (decomposição catalisada por um ativador) ou decomposição unimolecular (ou rearranjo de moléculas com alta energia) do IAE; 3- decaimento do IAE estado excitado para seu estado fundamental, liberando assim a energia absorvida (Bartoloni *et al*, 2011).

[0045] Na decomposição unimolecular de peróxidos cíclicos, uma molécula relativamente estável ao receber energia leva à formação de dois compostos carbonílicos excitados, que podem se apresentar no estado excitado singlete ou tripleto. Porém, esta é uma reação que não possui grandes rendimentos quânticos, já que seu estado excitado tripleto possui maior energia que o estado excitado singlete. Mas como vantagem, os peróxidos cíclicos são compostos isoláveis, o que torna possível a observação cinética da etapa de quimiexcitação (Bartoloni *et al*, 2011). Quando ocorre interação com outros reagentes, observa-se o processo de luminescência quimicamente iniciada por intercâmbio de elétrons (CIEEL - *chemically*

initiated electron exchange luminescence). O mecanismo CIEEL pode ser explicado através da utilização de ativadores (ACT), que, em geral, são hidrocarbonetos policondensados aromáticos de baixo potencial oxidativo e alto rendimento quântico de fluorescência. Estes ativadores alteram o curso da reação, de modo que aceleram a decomposição dos peróxidos cíclicos e aumentam os rendimentos quânticos dos produtos excitados formados. Neste mecanismo, a luz emitida é proveniente da fluorescência do ativador, o que potencializa a luminescência final observada (Sotomayor *et al*, 2008; Bartoloni *et al*, 2011). Atualmente acredita-se que os métodos quimiluminescentes de maior eficiência são aqueles baseados neste sistema (Sotomayor *et al*, 2008). A quimiluminescência é ainda caracterizada por sua alta sensibilidade, ampla faixa linear de resposta, ausência de efeitos de espalhamento e simplicidade de instrumentação (Dodeigne *et al*, 2000; Sotomayor *et al*, 2008).

[0046] Acredita-se que a sensibilidade dos métodos quimiluminescentes seja de uma detecção da ordem de 10^{-15} a 10^{-18} mol. Portanto, a quimiluminescência e seus princípios têm sido aplicados como ferramentas importantes em diversos tipos de diagnósticos clínicos, sendo cada vez mais utilizados em diversas técnicas (Campbell *et al*, 1985; Dodeigne *et al.*, 2000; Liu *et al*,

2010; Natrajan *et al*, 2010).

[0047] Entre elas, é possível citar a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), na qual a emissão de luz ocorre por uma reação pós-coluna, através de bombas e bobinas que misturam os compostos quimiluminescentes com os analitos e seus eluentes (Lara *et al*, 2010; Di *et al*, 2011). Biossensores e ensaios moleculares, que a partir de suportes biológicos incorporados a sondas quimiluminescentes, detectam diversos compostos como toxinas (Chen *et al*, 2008) e DNA (Luo *et al*, 2012), por exemplo.

[0048] A quimiluminescência pode ser aplicada ainda em eletroforese capilar, método no qual os compostos são separados com base na diferença entre as mobilidades iônicas, e tem seus analitos marcados com compostos quimiluminescentes (Lara *et al*, 2010; Mu *et al*, 2012). E também em histoquímica com lectinas, sendo muito utilizada para a marcação quimiluminescente de cânceres (Campos *et al*, 2006; Matos, 2010). Além da avaliação da seletividade e sensibilidade de enzimas, análises de alimentos, entre outros.

[0049] Em imunoenaios, a reação entre antígeno e anticorpo é detectada através da produção de luz por compostos quimiluminescentes. Estes compostos desempenham a função de marcadores, e podem estar ligados ao antígeno ou

anticorpo (Rongen *et al*, 1994; Kricka, 2003). Os imunoenaios não competitivos são aqueles nos quais são utilizados dois anticorpos: um ligado à fase sólida, no qual o analito a ser quantificado se ligará, e outro marcado, que se liga ao analito em questão. Enquanto nos imunoenaios competitivos, há uma competição entre o analito presente na amostra (ou o padrão) e outro marcado, por uma quantidade limitada de anticorpos específicos.

[0050] A determinação quantitativa seletiva, o menor tempo de incubação, a alta sensibilidade, a compatibilidade com sistemas heterogêneos ou homogêneos, a aplicação em imunoenaios competitivos e não competitivos, diretos ou indiretos, a não-toxicidade, a boa estabilidade e o baixo consumo de reagentes são vantagens essenciais de métodos quimiluminescentes (Dodeigne *et al*, 2000; Sotomayor *et al*, 2008).

[0051] Compostos luminescentes têm sido de grande importância e utilidade em diagnósticos de diversas patologias para determinar diversos tipos de substâncias orgânicas e inorgânicas (Wang *et al.*, 2008). O luminol e isoluminol foram os primeiros compostos a serem utilizados na quimiluminescência, mas foram substituídos por outros compostos mais sensíveis, como o éster de acridina, por exemplo (Campos *et al*, 2006).

[0052] O luminol e seus análogos podem ser

aplicados em imunodiagnósticos e ainda como biossensores. Em imunoenaios, a capacidade de catalizar a oxidação do luminol é uma importante ferramenta para a ligação do antígeno ou anticorpo. Outros compostos também têm sido empregados, como os dioxietanos e peroxioxalatos (Dodeigne *et al.*, 2000).

[0053] As acridinas são compostos heterocíclicos, de estrutura planar, característica que lhes confere a propriedade de ligação (De Moura, 2008). São capazes de interagir com outros compostos e emitir fluorescência, quando as moléculas transportadoras chocam-se umas com as outras, e posteriormente, os corantes são aderidos aos seus sítios. Ou ainda, quando os corantes apenas recebem a energia liberada desse choque, sem se ligar às moléculas, sendo assim chamados de dispositivos ou corantes orgânicos emissores de luz (OLEDs). Mecanismos como estes são vastamente estudados, a fim de que sejam sintetizados OLEDs cada vez mais eficientes em monitores de telas planas e no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos (Li *et al.*, 2008; Almeida, 2011).

[0054] Os derivados de acridina podem produzir luz na presença de peróxido de hidrogênio em meio alcalino, sem um catalisador. E também são capazes de se ligarem covalentemente a anticorpos, produzindo sondas estáveis, de atividade específica e alta quimiluminescência. A marcação

de diversos produtos em baixas concentrações e com reprodutibilidade confere à acridina e seus derivados uma importante ferramenta em imunoenaios, sendo uma alternativa à utilização de radioisótopos, que apresentam como desvantagens o curto tempo de vida útil, problemas na eliminação de resíduos e danos à saúde (Weeks *et al*, 1983; Dodeigne *et al*, 2000).

[0055] Salvo algumas exceções, os derivados de acridina possuem em sua estrutura química dois grupos distintos: a acridina heterocíclica e o grupo de saída, importantes componentes para a emissão de luz. A acridina heterocíclica é responsável pela formação da N-metil-acridona em estado excitado, produto de fluorescência geralmente liberado no meio, formado após sua oxidação. Se não ocorrer a substituição de grupos metoxi na formação da N-metil-acridona, a luz emitida será na faixa do azul, mas caso ocorra a substituição, será emitida luz verde. A substituição do anel, bem como a substituição do grupo N-metil por uma cadeia alquil ou um grupo carboximetil tem pouco efeito sobre a eficiência quântica ou a estabilidade química do produto, mas quando o nitrogênio heterocíclico é substituído por um grupo carboxi, que é utilizado para a ligação de proteínas, a emissão de luz ficará associada ao analito (Dodeigne *et al*, 2000).

[0056] O pKa (logaritmo da constante de dissociação

ácida) do grupo de saída tem uma influência determinante em termos de eficiência de quimiluminescência e estabilidade química. O grupo de saída deve ter um pKa menor do que o pKa do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), para rendimentos elevados, uma vez que a intensidade da luz emitida se correlaciona com o pKa do grupo de saída. Fenóis, tióis, sulfonamidas, aminas heterocíclicas, fluoroalcools endocíclicos, ácidos hidroxâmicos e tiolaminas sulfohidroxâmicas podem ser utilizados como grupos de saída (Rongen *et al*, 1994; Dodeigne *et al*, 2000).

[0057] Em geral, a emissão de luz dos derivados de acridina ocorre como um flash de curto período de tempo (de 5s ou menos), após a ativação dos mesmos pela reação química. No entanto, o tempo de emissão pode estar associado à modificação do anel acridina, bem como à substituição do grupo de saída. Em compostos com fenóis como grupo de saída, a metilação do anel acridina diminui a cinética da emissão de luz; a monossustituição retarda a reação ligeiramente, enquanto a não substituição aumenta o tempo de retardo da reação. Grupos de remoção de elétrons introduzidos no anel fenil aumentam tanto a eficiência quanto e as taxas de emissão (Dodeigne *et al*, 2000).

[0058] Em meio aquoso, os derivados de acridina encontram-se em equilíbrio suas respectivas pseudobases, produtos não quimiluminescentes formados pela adição do

grupo hidroxil na posição 9 do anel heterocíclico. Este equilíbrio, no entanto, é deslocado para a pseudobase em meio alcalino. Portanto, para desencadeamento da quimiluminescência de derivados de acridina é necessária a adição sequencial de uma solução de peróxido de hidrogênio em meio ácido - que doará íons HO_2^- para a formação do produto N-metil-acridona no seu estado excitado, a partir das pseudobases, seguida de alcalinização rápida do meio a partir da injeção de uma base forte. A rápida conversão de derivados de acridina em suas pseudobases requer cuidado para minimizar o tempo de mistura do reagente antes da observação da intensidade da emissão de quimiluminescência (Weeks *et al*, 1983; Dodeigne *et al*, 2000).

[0059] Os ésteres de acridina são os principais e mais utilizados derivados de acridina (Rongen *et al*, 1994), sendo o 4-(2-succinimida-oxicarboniletil)-fenil-10-metil-acridínio-9- carboxilato de etil (AE-NHS) o primeiro derivado de acridina descrito para uso prático. Porém, o NHS-AE não demonstra grande rendimento quântico nem alta estabilidade, especialmente, à temperatura ambiente. Porém, um análogo ao AE-NHS foi produzido, com maior estabilidade e eficiência, foi sintetizado então o NHS-2-6-dimetil-éster de acridina (DMAE-NHS) (Dodeigne *et al*, 2000).

[0060] Os ésteres de acridina têm sido amplamente

utilizados em diversas áreas, tanto em diagnóstico quanto na terapêutica, sendo aplicados para ensaios quimiluminescentes de alto desempenho a partir de moléculas marcadas, para detecção rápida e eficiente (Campos; *et al.*, 2006; Almeida, 2011), por possuírem alto nível energético, limite de detecção na ordem de atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol) e rápida emissão (Natrajan *et al.*, 2010), com capacidade de interação com radiação Ultravioleta-Visível (UV-Vis) a partir de absorção relativamente forte e emissão na região do visível. Sendo assim, os derivados de acridina são usados como sensores espectrais ou como marcadores fluorescentes, tornando-os importantes indicadores quimiluminescentes ou parte de sondas fluorescentes (Almeida, 2011).

[0061] A patente US 6,482,924, depositada em 15 de dezembro de 1999 e concedida em 19 de novembro de 2002, de Pfizer Inc & Pfizer Products Inc, intitulada "Leptospira vaccine antigens for the prevention of Leptospirosis", descreve a identificação de proteínas quinase, permease, monosiltransferase e flagelina de *Leptospira* e prevê o uso das mesmas como componentes de vacinas e kits diagnósticos de leptospirose. Entretanto, somente antecipa a utilidade destas proteínas como antígenos, mas não propõe e nem cria nenhuma metodologia específica. Apenas cita métodos genericamente, como por exemplo, a marcação das proteínas

ou de suas sequências codificantes com compostos radioativos, fluorescentes, bioluminescentes, quimiluminescentes ou enzimas. Além disso, não menciona o uso de ésteres de acridina ou seus derivados como compostos quimiluminescentes.

[0062] O artigo "The chemiluminescent detection of Leptospiral antigen", publicado em *Zentralblatt fur bakteriologie-international journal of medical microbiology virology parasitology and infectious diseases*, vol. 277 (3), páginas 300-308 (1992), por Palmer, M & Hookey, J., menciona o uso de um anticorpo policlonal conjugado com luminol na detecção de um antígeno específico de leptospira em sangue total e urina. Tal metodologia apresenta diversas limitações, como: (1) baixo limite de detecção de leptospiros em tampão fosfato (9×10^4 células/ml), sangue humano ($1,8 \times 10^5$ células/ml) e urina ($7,5 \times 10^5$ células/ml). No método da presente invenção, o limite de detecção é de 10^2 células/ml, independente do fluido testado. Esta diferença se deve ao composto luminescente utilizado. O luminol tem baixo rendimento quântico total (~1%), que corresponde à medida de produção de luz; e apresenta menor estabilidade, além de necessitar de um catalisador (no referido artigo foi utilizada a peroxidase). Estas características ocasionam, provavelmente, menor sensibilidade comparada aos ésteres de acridina ou seus

derivados, que são mais vantajosos, por serem mais estáveis, terem maior rendimento quântico (~2%) e dispensarem o uso de catalisadores. (2) No artigo em questão, menciona-se que a sensibilidade do método de detecção de leptospiras na urina diminui com o passar do tempo. Em 24 horas, o número de leptospiras detectadas diminuiu de $7,5 \times 10^5$ células/ml para 3×10^6 células/ml. Nos testes do presente pedido, o método quimiluminescente possibilitou o mesmo nível de detecção de leptospiras na urina armazenada na geladeira por cinco dias (10^2 células/ml). (3) Outra desvantagem é o uso de filme radiográfico para a detecção do sinal pelo luminol, tornando o método mais laborioso e dependente de câmara escura. Na presente invenção, a detecção da quimiluminescência é feita por luminômetros, que existem no mercado de vários modelos, desde aparelhos automatizados para a medição de muitas amostras ao mesmo tempo até de pequeno porte e portáteis, úteis para serem utilizados em diversas situações, como pequenas clínicas e em campo. (4) Outra limitação é que o método do artigo só detecta um único sorovar de leptospira (*Leptospira interrogans* sorovar Hardjo). A metodologia proposta na presente invenção é a detecção universal para todas as estirpes de leptospiras. O anticorpo contra *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130) conjugado com éster de acridina foi

capaz de detectar as estirpes: *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo Bovis e *Leptospira interrogans* sorovar Rattus Icterohemorragiae, além da espécie utilizada como antígeno. (5) No artigo, o método é testado em amostras de sangue e urina contaminadas artificialmente com culturas de leptospiros. É possível que o luminol não tenha sensibilidade de detecção de bactérias em amostras clínicas, pois o número de leptospiros é variável. Na presente invenção, foram testadas tanto amostras clínicas quanto amostras artificialmente contaminadas. Portanto, a presente invenção apresenta melhorias às limitações apresentadas.

[0063] O artigo "The detection of leptospires by a chemiluminescent immunoassay", publicado em J. Med. Microbiol., vol. 21, páginas 353 -356, por Sheena A. Waitkins & Hookey J.V., descreve uma metodologia parecida com a publicação anterior, mas com menos detalhes experimentais. Prevê a produção de soro policlonal de coelho contra lisado total de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae conjugado ao composto ABEI. Este reagente quimiluminescente é um derivado do luminol que necessita de um catalisador e de um agente de acoplamento (EDC-HCl) para funcionar. Deve apresentar as mesmas limitações citadas anteriormente, entretanto não é possível a comparação, pois só foram realizados

experimentos de detecção de leptospiras em cultura. Não são descritos os limites de detecção, a especificidade, nem a utilização de amostras clínicas ou artificialmente infectadas. A presente invenção apresenta dados experimentais que comprovam a detecção de leptospiras em fluídos biológicos por anticorpo conjugado com éster de acridina.

[0064] O pedido de patente PI 1006319-6 A2, depositado em 03 de novembro de 2010 e publicado em 26 de fevereiro de 2013, da Universidade Federal de Pernambuco, intitulada "Sonda molecular para identificação de tecidos", descreve a produção de uma sonda molecular constituída por lectinas (ConA e PNA) conjugadas a um derivado de acridina luminescente (éster IP29). Esta sonda foi desenvolvida para a detecção de carboidratos na superfície celular em histoquímica, principalmente para a identificação de câncer de mama. A descrição também prevê que a metodologia pode ser empregada em outras proteínas e anticorpos e para fluidos biológicos e patologias clínicas. A presente invenção, entretanto, utiliza outro tipo de derivado de éster de acridina, que é o DMAE-NHS (até 2 milhões de RLU), que é capaz de gerar maior quantidade de luz do que o composto IP29 (até 20 mil de RLU) utilizado neste pedido. A geração de maior quantidade de luz está diretamente relacionada com o maior limite de detecção do método. A

presente invenção, portanto, possui outra finalidade e utiliza outro tipo de composto.

[0065] O pedido de patente PI 0602669-9 A, depositado em 13 de julho de 2006 e publicado em 26 de fevereiro de 2008, da Fundação Butantan, intitulado "Processo de clonagem, expressão e purificação de proteína de leptospira sp por DNA recombinante, Processo de obtenção de sequência de polinucleotídeo com potencial vacinal e diagnóstico, clonada em vetores de expressão em mamíferos ou não, para vacina de DNA, Composição com potencial vacinal a base da dita proteína, Composição para diagnóstico ou para detecção in vitro da ocorrência de infecção por Leptospira sp e kit para diagnóstico in vitro de infecção por Leptospira sp", refere-se à identificação de uma proteína de membrana externa de leptospira (Lsa29) codificada pelo gene LIC12892. Propõe a utilização de sua forma recombinante na detecção de anticorpos em pessoas e também animais com suspeita de leptospirose. Apresenta dados experimentais da utilização desta proteína como antígeno em ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando soros humanos reagentes e não reagentes para a leptospirose. Prevê ainda o uso da proteína como componente vacinal. Entretanto não há dados experimentais que suportem esta proposta. Além disso, não menciona o uso de ésteres de acridina ou seus derivados como compostos

quimiluminescentes em um possível método de diagnóstico.

[0066] O pedido de patente PI 0505529-6 A, depositado em 19 de dezembro de 2005 e publicado em 25 de setembro de 2007, da Fundação Oswaldo Cruz, intitulado "Proteínas LigA e LigB (Leptospiral Ig-like (Lig) domains) para vacinação e diagnóstico", descreve o uso de fragmentos das proteínas LigA e LigB (Leptospiral Immuglobulin-Like (Lig) Domains), para a produção de vacinas ou diagnóstico através de polipeptídeos recombinantes. A proposta do mesmo é o reconhecimento desses peptídeos, ou seus fragmentos, pelos anticorpos dos animais testados (infectados ou imunizados). Neste documento não são descritos o uso de anticorpos contra a bactéria total, como é o caso da presente invenção. Além de utilizar os anticorpos produzidos especificamente para os peptídeos em questão, ainda utilizam os peptídeos como agentes vacinais, já que os mesmos são capazes de produzir resposta imune. Não propõe e nem cria nenhuma metodologia específica. Este documento não utiliza quimiluminescência como ferramenta para o diagnóstico, e prevê a utilização dos anticorpos de maneira diferenciada da presente invenção.

[0067] O pedido de patente norte-americano US 2007/0197432 A1, depositado em 24 de outubro de 2003 e publicado em 21 de maio de 2004, de Genevieve Andre-Fontaine *et al*, intitulado "Peptides for preventing,

diagnosing and treating animal and/or human leptospirosis", descreve o uso de peptídeos capazes de induzir proteção contra leptospirose principalmente por imunização e compostos imunogênicos (diagnósticos e reagentes terapêuticos), estes peptídeos são capazes de gerar resposta imune contra várias cepas patogênicas. Assim como no documento anterior, o anticorpo produzido é específico para o peptídeo a partir de imunização animal, sendo recuperados do soro, leite, ovo ou células do timo ou baço, de acordo com o tipo de células utilizado. Ainda é descrita a utilização de fragmentos (Fab, F(ab')₂ e ScFvs) desses anticorpos produzidos. O documento prevê apenas a utilização desses anticorpos em ensaios sorológicos para o diagnóstico, tais como ELISA e radioensaio, mas também não descreve a utilização de ensaio imunoquimiluminescente.

[0068] Como pode ser observado nenhum documento do estado da técnica descreve ou sugere um método para detecção de leptospira *in vitro* utilizando-se um anticorpo IgG anti-leptospira purificado conjugado ao éster de acridina NHS-DMAE, o qual proporciona um método mais sensível para a detecção precoce de leptospiras em fluidos corporais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0069] Para solucionar os problemas acima mencionados, a presente invenção propiciará vantagens

significativas em relação ao método de diagnóstico de leptospirose existente no estado da técnica, proporcionando um método mais sensível para a detecção de leptospiras em fluidos corporais. O anticorpo policlonal IgG anti-leptospira purificado é conjugado ao éster de acridina NHS-DMAE, o que permite marcar leptospiras a partir da ligação específica antígeno-anticorpo, detectada por quimiluminescência, de forma mais rápida e mais sensível. A detecção de antígenos permite o diagnóstico precoce da leptospirose uma vez que para a detecção de anticorpos é necessária uma resposta imune. O diagnóstico precoce de leptospirose é de extrema importância já que o diagnóstico tardio da mesma é ainda uma das principais causas do grande número de óbitos por esta doença, devido à inespecificidade dos sintomas.

[0070] Em um aspecto, a presente invenção se refere a processo para obtenção de um anticorpo marcado compreendendo as etapas de inocular uma cultura de *Leptospira interrogans* em coelho, extrair sangue do coelho inoculado com a cultura de *Leptospira interrogans*, purificar o anticorpo IgG anti-*leptospira interrogans* por meio de precipitação por ácido caprílico, dialisar o anticorpo purificado e conjugar o anticorpo purificado ao éster de acridina dimetil N-Hidroxisuccinamida (DMAE-NHS). Em uma concretização, há uma etapa de avaliação da

purificação e atividade funcional dos anticorpos por meio de SDS-PAGE e/ou ELISA após a etapa de diálise. Em outra concretização, é usado na conjugação 1mL de anticorpo purificado e 15 µL de DMAE-NHS a 0,05% em solvente N,N-dimetilformamida (DMF).

[0071] Em outro aspecto, a invenção se refere a método para diagnóstico de leptospirose *in vitro*, que consiste em contatar fluidos biológicos suspeitos de conter leptospiros com o anticorpo IgG anti-leptospira interrogans marcado tal como obtido pelo processo acima definido, e detectar a ligação do anticorpo marcado à leptospira por quimiluminescência. Em uma concretização, o fluido biológico é urina. Em uma concretização adicional, o anticorpo marcado foi usado em uma concentração de 1:8 a 1. Em uma concretização adicional, o anticorpo marcado foi usado em um volume entre 10 e 100 µL. Em outra concretização, o tempo de incubação da amostra contendo fluidos biológicos com o anticorpo marcado foi de 15 min a 120 min.

[0072] Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso do anticorpo marcado, tal como obtido pelo processo acima definido para a detecção de leptospiros *in vitro*.

[0073] Em outro aspecto, a invenção se refere a kit para detecção *in vitro* da presença de cepas de leptospira em fluidos biológicos, tal kit compreendendo o anticorpo

IgG anti-leptospira interrogans associado ao éster de acridina DMAE-NHS. Em uma concretização, o fluido biológico é urina.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0074] O objetivo da invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma, poderá ser melhor entendido mediante referência às figuras em anexo e às seguintes descrições:

[0075] A Figura 1 mostra a atividade imune IgG no soro pré imune (quadrado), soro imune (círculo) e na amostra de IgG purificada (triângulo). Foi feito por meio de teste ELISA para avaliar a funcionalidade da IgG após a purificação por ácido caprílico e sulfato de amônio.

[0076] A Figura 2 mostra medidas de quimiluminescência (quadrados) e absorbância (círculo) das frações após a conjugação de IgG e DMAE-NHS, e posterior purificação em coluna cromatográfica.

[0077] A Figura 3 mostra a atividade imune do conjugado no soro pré imune (quadrado), na amostra de IgG purificada (círculo) e no conjugado (triângulo). Teste ELISA foi realizado para avaliar a funcionalidade do complexo IgG-DMAE-NHS após conjugação.

[0078] A Figura 4 se refere à marcação bacteriana, isto é, avaliação da complexação do conjugado IgG anti-leptospira-DMAE-NHS à bactéria, utilizando-se diferentes

concentrações de bactérias (10^2 a 10^8 células/mL).

[0079] A Figura 5 mostra a avaliação da concentração mínima do conjugado IgG-DMAE-NHS necessária para uma quimiluminescência significativa.

[0080] A Figura 6 mostra a avaliação do volume mínimo de amostra, em uma proporção de 1:10, necessário para uma quimiluminescência significativa após se ligar ao conjugado IgG-DMAE-NHS.

[0081] A Figura 7 mostra a avaliação do tempo de incubação da bactéria com o complexo IgG-DMAE-NHS necessário para uma quimiluminescência significativa.

[0082] A Figura 8 se refere à avaliação da especificidade do complexo IgG-DMAE-NHS após análise da quimiluminescência das bactérias incubadas com anticorpo frio (IgG), e com complexo IgG-DMAE-NHS com incubação prévia do anticorpo frio (IgG-IgG-DMAE-NHS) e sem a incubação prévia do mesmo (IgG-DMAE-NHS).

[0083] A Figura 9 mostra a quimiluminescência da urina de hamster marcada com o complexo IgG-DMAE-NHS. Comparativo entre as quimiluminescências das urinas de hamsters infectados (Urina Infectada - em vermelho) e hamsters não infectados (Urina Controle - em preto).

[0084] A Figura 10 mostra PCR das amostras de Urina de Hamsters Infectados. Positivo apenas para a urina coletada dos animais infectados após o 19° dia de infecção

(círculo vermelho).

[0085] A Figura 11 se refere à microscopia de campo escuro da cultura de Leptospiras. A) Presença de leptospiras (setas brancas) - cultura de animais infectados; B) Ausência de leptospiras - cultura de animais controle.

[0086] A Figura 12 se refere à avaliação da conjugação do complexo IgG-DMAE-NHS à bactéria (leptospira) em urina humana experimentalmente infectada, em diferentes concentrações (10^4 a 10^6). 1 = controle (urina não infectada), 2 = urina infectada com concentração de bactérias de 10^4 , 3 = urina infectada com concentração de bactérias de 10^5 , 4 = urina infectada com concentração de bactérias de 10^6 .

[0087] A Figura 13 representa um sumário da invenção, descrevendo todas as etapas realizadas para conjugar o éster de acridina à imunoglobulina e para realizar a marcação bacteriana na urina, a saber: 1. Cultura bacteriana de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130; 2. Produção do soro a partir da inoculação da cultura em coelho; 3. Purificação de imunoglobulinas a partir de precipitação por ácido caprílico e subsequente diálise em tampão PBS; 4. Eletroforese SDS-PAGE e/ou ELISA para avaliação da purificação e atividade funcional das imunoglobulinas; 5.

Conjugação utilizando-se 15 µL de éster de acridina DMAE-NHS e 1 mL do anticorpo imunoglobulina G-IgG; 6. Separação cromatográfica por filtração em gel em coluna Sephadex G25; 7. Avaliação de absorbância e quimiluminescência; 8. Determinação da concentração ideal do complexo IgG - éster de acridina por meio de diluição seriada do complexo - item 5 - em tampão PBS; 9. Determinação do volume ideal da amostra por meio da proporção bactéria : complexo IgG - éster de acridina de 1:10 nos volumes de 1 mL, 800 µL, 600 µL, 400 µL, 200 µL e 100 µL); 10. Determinação do tempo de incubação ideal por meio da incubação da cultura com o complexo nos intervalos de 2h, 1h30min, 1h, 30 min e 15 min; 11. Marcação celular por meio da incubação da cultura de *Leptospira* com o complexo IgG - éster de acridina; 12. Marcação bacteriana na urina de hamster *Mesocricetus auratus*, grupo controle não infectado e grupo infectado intraperitoneamente com 0,5 mL de cultura 10^9 células/mL; 13. Urina humana contaminada experimentalmente. 10^8 células/mL de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 em meio EMJH foram centrifugadas e as células foram ressuspensas em 1 mL de urina humana. Para a marcação foram utilizados 200 µL da ressuspensão e 20 µL do complexo IgG-éster de acridina por 2h sob agitação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0088] Embora a presente invenção possa ser

suscetível a diferentes concretizações, é mostrada nos desenhos e na seguinte discussão detalhada, uma concretização preferida com o entendimento de que a presente descrição deve ser considerada uma exemplificação dos princípios da invenção e não pretende limitar a presente invenção ao que foi ilustrado e descrito aqui.

Processo para obtenção de um anticorpo marcado

[0089] Em uma primeira concretização, a presente invenção se refere a processo para obtenção de um anticorpo marcado compreendendo as etapas de inocular uma cultura de *Leptospira interrogans* em coelho, extrair sangue do coelho inoculado com a cultura de *Leptospira interrogans*, purificar o anticorpo IgG anti-*leptospira interrogans* por meio de precipitação por ácido caprílico, dialisar o anticorpo purificado e conjugar o anticorpo purificado ao éster de acridina dimetil N-Hidroxisuccinamida (DMAE-NHS). Em outra concretização, há uma etapa de avaliação da purificação e atividade funcional dos anticorpos por meio de SDS-PAGE e/ou ELISA após a etapa de diálise. Em outra concretização, é usado 1mL de anticorpo purificado e 15 µL de DMAE-NHS a 0,05% em solvente N,N-dimetilformamida (DMF).

Método para diagnóstico de leptospirose *in vitro*

[0090] Em outra concretização, a presente invenção também se refere a método para diagnóstico de leptospirose *in vitro*, que consiste em contatar fluidos biológicos

suspeitos de conter leptospiras com o anticorpo IgG anti-leptospira interrogans marcado, tal como obtido pelo processo acima definido, e detectar a ligação do anticorpo marcado à leptospira por quimiluminescência. Em uma concretização, o fluido biológico é urina. Em uma concretização adicional, o anticorpo marcado foi usado em uma concentração de 1:8 a 1. Em uma concretização adicional, o anticorpo marcado foi usado em um volume entre 10 e 100 µL. Em outra concretização, o tempo de incubação da amostra contendo fluidos biológicos com o anticorpo marcado foi de 15 min a 120 min.

Uso do anticorpo marcado

[0091] A presente invenção também se refere ao uso do anticorpo marcado, tal como obtido pelo processo acima definido para a detecção de leptospiras *in vitro*.

Kit para detecção in vitro da presença de cepas de leptospira em fluidos biológicos

[0092] A presente invenção também se refere a kit para detecção in vitro da presença de cepas de leptospira em fluidos biológicos, tal kit compreendendo o anticorpo IgG anti-leptospira interrogans associado ao éster de acridina DMAE-NHS. Em uma concretização, o fluido biológico é urina.

EXEMPLOS

Amostra Bacteriana

[0093] Para a manutenção da virulência bacteriana foi realizada a infecção do hamster com a estirpe virulenta de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130), obtida do macerado de fígado e rins previamente infectados de hamster, mantida em meio semissólido de Fletcher. Após a verificação da presença bacteriana em microscópio (aumento de 100x), foi realizada a inoculação peritonialmente de 0,5mL em hamster recém-desmamado com peso de até 80g da espécie *Mesocricetus auratus*. O hamster foi sacrificado por inalação de gás carbônico após cinco dias de infecção. As células de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130) foram cultivadas em meio líquido de enriquecimento Ellinghausen, MacCullough, Johnson & Harris (EMJH) (Difco™ Laboratories), em uma proporção de 1:10. As bactérias foram mantidas virulentas com passagens semanais no meio de cultura, a uma temperatura de 29°C sem agitação (Monaris, 2011).

Produção de Soro

[0094] Para a produção de soro foi realizada a inoculação de cultura de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130) em coelho fêmea espécie *Nova Zelândia*. Os volumes das cinco inoculações foram, respectivamente, de 1mL, 2mL, 4mL, 6mL e 6mL com intervalos de uma semana cada. A primeira inoculação foi

realizada pela veia marginal da orelha, sendo via subcutânea a partir da segunda inoculação, com agulha de insulina 13x0,38cm. O animal foi anestesiado com quetamina e xilazina para posterior sangria a partir de punção intra-cardíaca com seringa de 20mL. O sangue total coletado foi transferido para um Becker, e mantido em repouso por 30min a 37°C para separação do soro e células vermelhas, inicialmente com pipeta. A amostra foi posteriormente centrifugada a 2000rpm por 15min a 20°C, duas vezes. Com subsequente armazenamento a -20°C (Santa Rosa, 1970).

Purificação de Imunoglobulinas

[0095] O soro foi diluído quatro vezes em tampão Acetato de Sódio 60mM pH 4,0, com posterior ajuste do pH do soro para 4,5. Foram adicionados 25µL, gota a gota, de ácido caprílico para cada mL de solução sob constante agitação. Após 30min, ainda sob agitação, a amostra foi centrifugada por 30min a 10.000xg a temperatura de 25°C. Ao sobrenadante filtrado foi adicionado tampão fosfato-salino concentrado 10x (PBS 10x) numa proporção de 1:10 do volume final. O pH foi ajustado para 7,4. O sobrenadante foi resfriado a 4°C e fracionado com 0,277g de sulfato de amônio por mL de solução, para obtenção de uma saturação de 45%. Após agitação por 30min, foi centrifugado a 10.000xg por 1h a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em

tampão PBS na proporção de 1:10 do volume. A amostra foi dialisada por 48h em tampão PBS diluído 1x em volume de 100x o volume da amostra, sendo realizadas quatro trocas do mesmo (McKinney & Parkinson, 1987).

SDS-PAGE

[0096] A eletroforese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Maniatis e colaboradores (1989). Os géis foram preparados com 1,0mm de espessura, contendo 5% de acrilamida no gel de empilhamento e 15% de acrilamida no gel de separação. Para a corrida eletroforética foi utilizada uma amperagem de 25mA e 250V de voltagem, a temperatura de 25°C. Os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (USB, Cleveland, OH, EUA) em 50% metanol e 10% ácido acético em água por 1h a 25°C e descorados em solução de 30% metanol e 10% ácido acético em água. Os mesmos foram secos também a 25°C *overnight* (Sambrook *et al*, 1989).

ELISA

[0097] Para a sua realização foram utilizadas células de *Leptospira interrogans* cultivadas em meio líquido EMJH (Difco™ Laboratories) (10mL) e centrifugadas a 6500rpm por 30min a temperatura de 20°C. O precipitado coletado foi ressuspensionado em 2mL de tampão PBS (1x) e lavado por 3 vezes (centrifugação de 8000rpm por 5min). Por fim, o precipitado foi ressuspensionado em 1mL de tampão

PBS (1x). A contagem de células foi realizada em Câmara de *Petroff-Hausser*, a partir de uma diluição de 1:10. A amostra foi centrifugada mais uma vez a 8000rpm por 5min, o precipitado foi ressuspensionado em 100µL de *coating buffer* (tampão de aderência) com incubação de 2h a temperatura de 29°C, com posterior bloqueio da placa por 1h a 29°C. Após uma lavagem com 200µL por poço de *wash buffer* (tampão de lavagem) foi adicionado 100µL do anticorpo primário (soro animal) diluído em 1:20. Uma diluição seriada foi realizada com posterior incubação por 1h a 29°C.

[0098] Após três lavagens com 200µL por poço de *wash buffer*, foi adicionado o segundo anticorpo conjugado à peroxidase - anticorpo secundário (anti-coelho) numa diluição de 1:5000. A placa foi incubada por 1h a temperatura de 29°C. Novamente foram realizadas 3 lavagens com 200µL por poço de *wash buffer*, seguidas da revelação com o-dihidroclorato de fenilenodiamina (OPD) em uma incubação por 15min. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico (H₂SO₄8N).

Conjugação IgG-DMAE-NHS

[0099] Foram utilizados 1mL da imunoglobulina G (IgG) anti-L1-130 purificada e 15µL do éster de acridina dimetil N- Hidroxisuccinamida (DMAE-NHS) a 0,05% em solvente N,N- dimetilformamida (DMF), tendo-se, portanto, um conjugado em proporção de volume de 1:34,33. O

anticorpo e o éster de acridina foram incubados por 1h sob agitação (Campos *et al*, 2006).

Purificação Cromatográfica

[0100] Para a purificação do conjugado IgG anti-L1-130-DMAE-NHS dos demais constituintes (anticorpo não-conjugado e éster livre) foi realizada Cromatografia por exclusão de tamanho, através de uma Coluna de Sephadex G-25 (10 x 1 cm), equilibrada com Tampão Fosfato de Sódio (PBS) 0,01M pH 7,2. Foram coletadas 70 alíquotas de 1mL, durante a eluição com o Tampão em um fluxo de 1mL/min (Campos *et al*, 2006).

Dosagem Proteica

[0101] A densidade óptica (OD) das alíquotas purificadas foi mensurada espectrofotometricamente, sendo utilizados 100µL de cada amostra. A leitura da absorbância foi realizada na faixa de 280nm, em espectrofotômetro modelo *Ultrospec 2100pro* (Amersham Biosciences).

Avaliação da Quimiluminescência

[0102] A luminescência do complexo anti-L1-130-DMAE-NHS foi avaliada em luminômetro modelo *Lucceta* da marca Lonza, sendo sua intensidade de emissão medida por Unidades Relativas de Luz (RLUs). Para a análise foram utilizados 50µL de uma solução composta por Peróxido de Hidrogênio 0,5% e Ácido Nítrico 0,1N (Solução A), sendo posteriormente adicionados 50µL da amostra e, em seguida

50µL de uma solução de Hidróxido de Sódio 0,25N com Surfactante (Solução B), realizado manualmente, com leitura automatizada em 1 segundo por amostra, com tempo de atraso de 2 segundos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata (Matos, 2010).

Marcação Celular

[0103] Foram utilizados 20mL de células (10^8 células/mL) de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130) cultivadas no meio EMJH (Difco™ Laboratories), centrifugadas a 6500 rpm por 30min, a temperatura de 20°C e ressuspendidas em 1mL de tampão PBS 1x. Para a conjugação do conjugado IgG-DMAE-NHS às bactérias, foram incubados 1mL da cultura lavada e 100µL do conjugado por 2h sob agitação. Todas as amostras da etapa de marcação celular foram centrifugadas por 5min a 8000rpm (1x), ressuspendidas em 1mL de tampão PBS e tiveram sua quimiluminescência mensurada, conforme descrito no item 5.4.3.

Correlação Bactéria-Quimiluminescência

[0104] Para o imunorreconhecimento das bactérias por IgG-DMAE-NHS, o conjugado (100µL) foi incubado com 1mL da cultura celular (proporção de 1:10) em diferentes concentrações das bactérias (10^9 a 10^2 células/mL) por 2h sob agitação.

Concentração Ideal IgG-DMAE-NHS

[0105] Para a avaliação da concentração ideal do conjugado IgG-DMAE-NHS foi realizada uma diluição seriada (em PBS 1x) a partir do conjugado em sua concentração inicial de 1:34,33 - puro - (item 5.4) até 1:256. Foram incubados 1mL da cultura celular e 100µL do conjugado nas diferentes concentrações por 2h sob agitação. A concentração do conjugado IgG-DMAE-NHS variou em nove pontos diferentes.

Volume Ideal de Amostra

[0106] O conjugado IgG-DMAE-NHS foi complexado às bactérias (10^8 células/mL) em uma proporção de 1:10 em seis pontos de diferentes volumes. Sendo então, incubados (1) 1mL da cultura celular e 100µL do conjugado, (2) 800µL da cultura celular e 80µL do conjugado, (3) 600µL da cultura celular e 60µL do conjugado, (4) 400µL da cultura celular e 40µL do conjugado, (5) 200µL da cultura celular e 20µL do conjugado e (6) 100µL da cultura celular e 10µL do conjugado, todos por 2h sob agitação. Após a centrifugação, as amostras foram ressuspensas, respectivamente em 1mL, 800µL, 600µL, 400µL, 200µL e 100µL de tampão PBS 1x.

Tempo Ideal de Incubação

[0107] Para a complexação do conjugado IgG-DMAE-NHS 1:8 às bactérias (concentração de 10^8 células/mL) foi utilizada uma proporção de 1:10, variando o tempo de

incubação: 200µL da cultura celular e 20µL do conjugado por (1) 15min, (2) 30min, (3) 60min, (4) 90min e (5) 120min, todos sob agitação.

Especificidade

[0108] Para avaliar a especificidade da ligação entre o conjugado IgG-DMAE-NHS e a bactéria *Leptospira interrogans* foi realizado um ensaio de marcação das bactérias previamente incubadas com o anticorpo IgG frio (sem o composto quimiluminescente DMAE-NHS). Para tanto, 200µL das bactérias (10^8 células/mL) foram incubadas com 20µL de IgG anti-*Leptospira interrogans* (anticorpo frio) por 2h sob agitação a 25°C. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 8000rpm por 5 minutos, sendo o precipitado ressuspendido em 200µL de tampão PBS 1x e o sobrenadante coletado. Após esta etapa, as bactérias ressuspendidas foram incubadas com 20 µL do complexo IgG-DMAE-NHS também pelo período de 2h sob agitação. Como controle, foram utilizadas as bactérias incubadas com o conjugado livre sem a incubação prévia com o anticorpo frio sob as mesmas condições.

Marcação Bacteriana na Urina

Marcação em Urina de Hamster Infectado

[0109] Foram utilizados dez hamsters da espécie *Mesocricetus auratus*, com idade aproximada de 60 dias. Os mesmos foram divididos em dois grupos (controle e

infectados). Para o primeiro grupo (infectados) foram utilizados cinco hamsters, nos quais foram inoculados intraperitonealmente 0,5mL de cultura (10^9 células/mL) da estirpe virulenta de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130) obtida a partir de macerado de fígado e rins de hamsters previamente infectados, mantida em meio semissólido de *Fletcher*. No segundo grupo, foram utilizados cinco hamsters, sem inoculação bacteriana (grupo controle). Após cinco dias da inoculação, as urinas de ambos os grupos foram coletadas em gaiola metabólica por aproximadamente 18h, em seis dias diferentes. Das urinas coletadas, foram incubados 200µL do volume total, com 20µL do complexo IgG-DMAE- NHS por 2h sob agitação. As amostras (urina controle e urina infectada) foram centrifugadas por 5min a 8000rpm. Os sobrenadantes foram coletados e os precipitados ressuspensos em 200µL de tampão PBS (1x). A quimiluminescência das urinas dos dois grupos, e de seus sobrenadantes, foi analisada. As urinas puras (sem a presença do conjugado IgG-DMAE-NHS) também tiveram suas quimiluminescências mensuradas. A marcação foi realizada em triplicata. Todas as amostras foram visualizadas em microscópio de campo escuro para avaliar a possível detecção das bactérias.

Urina Humana Contaminada Experimentalmente

[0110] Foram utilizados 20mL (10^8 células/mL) de células de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (L1-130) cultivadas no meio EMJH (Difco™ Laboratories), sendo centrifugadas por 30min, a temperatura de 20°C, com centrifugação de 6500rpm. Com posterior ressuspensão em 1mL de urina humana. Para a complexação do conjugado IgG- DMAE-NHS às bactérias, foram incubados 200µL da cultura celular ressuspensa em urina humana e 20µL do conjugado por 2h sob agitação. As amostras foram centrifugadas por 5min a 8000rpm (1x), ressuspensas em 200µL de tampão PBS (1x) e tiveram suas quimiluminescências, e de seus sobrenadantes, mensuradas conforme descrito no item 5.4.3. A marcação foi realizada em triplicata.

Métodos Comparativos

[0111] A fim avaliar a eficiência do método proposto, o mesmo foi comparado com dois métodos padrão para o diagnóstico de *Leptospira* spp.: o cultivo em cultura e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), métodos estes de grande empregabilidade e confiabilidade para a detecção de leptospiros e o diagnóstico definitivo da Leptospirose.

Cultura

[0112] Após 12 dias da inoculação da *Leptospira interrogans*, os hamsters foram eutanasiados por inalação

de gás carbônico. Por necropsia foram coletadas amostras de fígado e rim. O macerado das amostras coletadas foi cultivado em meio semissólido de *Fletcher* (*Difco*TM *Laboratories*) por uma passagem. O crescimento das bactérias foi observado por sete dias, a partir da formação ou não do anel no meio. O procedimento foi realizado para os dez hamsters utilizados (cinco controle e cinco infectados) em duplicata. Para a obtenção das imagens, foi utilizada câmera fotográfica Kodak EasyShare Z700 (Monaris, 2011).

PCR

[0113] O PCR foi realizado em amostras das urinas de hamster infectados e não infectados (controle) coletadas nos seis dias diferentes, conforme descrito no item 5.6.1. As amostras foram congeladas a -20°C para posterior realização do método.

Extração do DNA de *Leptospira interrogans*

[0114] Após o descongelamento a temperatura de 25°C , os tubos foram agitados e centrifugados a $13.000g$ por 30min. Seus sobrenadantes foram desprezados e seus precipitados ressuspensos em $300\mu\text{L}$ de tampão de lise (195 μL água *milliQ*, 60 μL TNE, 30 μL SDS e 15 μL proteinase K a 20 mg/ml). As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C por 1h sob agitação de 350rpm. Fenol tamponado (150 μL) foi adicionado às amostras, que foram

agitadas e centrifugadas a 13.000g por 5 min. Foram transferidos 300µL da fase aquosa para um novo tubo e adicionados 100µ de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, após agitação as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 5min, sendo a fase aquosa novamente (200µL) transferida para outro tubo. Foram adicionados 40µL de acetato de sódio 2M em uma proporção de 1:5 do volume total, com posterior adição de 480µL de etanol puro em quantidade de 2 vezes do volume total. As amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas a -20°C por 2h. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 10min, sendo seus sobrenadantes descartados por inversão e adicionados 500µL de etanol a 70% aos precipitados, homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000g por 10min. Os sobrenadantes foram descartados por inversão e as amostras foram secas em estufa a 45°C por 15min. Foram então adicionados 30µL de TE, as amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C por 15min sob agitação e estocadas a -20°C (Scarcelli *et al.*, 2003).

Amplificação do DNA

[0115] Uma vez que, segundo Mérien e colaboradores (1992), a *Leptospira* spp. possui um fragmento de 330bp, para a amplificação do DNA foram utilizados os seguintes *primers*:

[0116] Lep 1: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3'

[0117] Lep 2: 3' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5'

[0118] Foram adicionados 17,2 µL de água, 5 µL de tampão 10X (500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 8 µL da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 4 µL de cada *primer* (Lep 1 e Lep 2), 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase e 10 µL da amostra de DNA extraído. As amostras foram submetidas à desnaturação de 94°C por 5 minutos, sendo empregados 29 ciclos de amplificação divididos em quatro fases: (1) Desnaturação - 94°C /30 segundos, (2) Hibridação - 63°C /30 segundos, (3) Extensão - 72°C /30 segundos, (4) Extensão final - 72°C/ 10 minutos em termociclador Applied Biosystems - Veriti 96 Well Thermal Cycler.

[0119] Como controle positivo para a leptospirose, foi utilizado o DNA de *Leptospira Copenhageni* (10A) - Sorogrupo: Icterohaemorrhagiae, variante sorológica Copenhageni. E água ultrapura como controle negativo.

Análise do Produto Amplificado

[0120] Para análise do produto amplificado foi realizada eletroforese em gel 2% agarose (Gibco BRL-Life TechnologiesTM) com tampão de corrida TAE 1X (0,045M TRIS-Acetato e 1mM de EDTA, pH 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 100 V por 2h. O padrão molecular

utilizado foi o 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com corante *GelRed*TM (Uniscience[®]), e posteriormente visualizado no sistema de imagem *Alpha Innotech Corporation* (*AlphaImager*TM 2200).

[0121] Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados como exemplos os resultados dos diferentes testes efetuados com relação à invenção em tela.

[0122] Estes Exemplos são apresentados a título meramente ilustrativo e não devem ser de forma alguma considerados como limitativos do escopo e do alcance da presente invenção.

Exemplo 1:

[0123] O ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) é realizado a partir de reações enzimáticas capazes de detectar reações entre antígenos e anticorpos. Portanto, este teste foi realizado para que fosse verificada a funcionalidade das imunoglobulinas purificadas. A atividade imune da IgG purificada foi analisada a partir do mesmo, afim de avaliar a capacidade da imunoglobulina de se ligar especificamente ao seu antígeno.

[0124] Para os testes foram utilizados o soro sem contato prévio com a bactéria (soro pré-imune), o soro

obtido após a infecção com a bactéria - contendo as imunoglobulinas não purificadas (soro imune) e a IgG purificada obtida do soro imune. Conforme a Figura 1, o ELISA mostrou que a atividade da imunoglobulina não se alterou após a sua purificação, mantendo-se eficiente no reconhecimento de antígenos específicos mesmo depois de ser submetida ao ácido caprílico e sulfato de amônio. Ficando demonstrado, portanto, que este se apresenta como um método eficiente para a obtenção de anticorpos purificados, uma vez que o mesmo não interfere na atividade dos mesmos.

Exemplo 2:

[0125] Após as etapas de conjugação e purificação cromatográfica, as frações purificadas tiveram sua quimiluminescência e absorbância mensuradas. As medidas foram realizadas para se obter a confirmação da conjugação do éster de acridina dimetil N-Hidroxissucmida (DMAE-NHS) à Imunoglobulina G anti-leptospira (IgG). O resultado apresenta o padrão gráfico de acordo com os princípios da cromatografia por filtração gel. Uma vez que os picos de quimiluminescência e absorbância se sobrepõem na mesma fração (Figura 2), é possível afirmar que a conjugação foi eficiente, visto que o pico de quimiluminescência representa a quantidade máxima de DMAE-NHS e o pico de absorbância a quantidade máxima de proteína. Enquanto o

segundo pico de quimiluminescência observado representa o éster de acridina não conjugado. Porém não foi observado um segundo pico de absorvância, o que sugere que não houve proteína não ligada ao éster de acridina, dado que indica ainda um aproveitamento máximo das proteínas ofertadas, uma vez que não foi observada a saída da proteína livre.

Exemplo 3:

[0126] Após a verificação da eficiência de conjugação entre o anticorpo e o éster de acridina, foi realizado um novo ELISA, a fim de avaliar a funcionalidade da imunoglobulina após a conjugação. Observou-se que a atividade biológica da IgG diminuiu após a conjugação com o DMAE-NHS. Provavelmente devido à possível conjugação do éster de acridina nas proximidades Fab da IgG anti-leptospira, porém essa diminuição não foi considerada significativa e não comprometeu o desempenho do anticorpo, por apresentar uma densidade óptica elevada, muito superior ao controle negativo utilizado (soro pré-imune), ainda que a mesma seja menor do que a observada para a IgG não conjugada ao complexo. A Figura 3 apresenta a densidade óptica do complexo IgG-DMAE-NHS comparada às da IgG livre e do soro pré-imune.

Exemplo 4:

[0127] Foi possível observar (Figura 4) a ligação do conjugado IgG-DMAE-NHS às leptospiras, e correlacionar a

quimiluminescência com o número de bactérias, visto que, a medida em RLUs foi proporcional à concentração de bactérias. Ou seja, quanto maior a quantidade de bactérias oferecidas maior quimiluminescência foi observada, uma vez que para a concentração de 10^2 leptospiras a quimiluminescência média foi de 635.736 RLUs, enquanto para 10^8 leptospiras a quimiluminescência média aumentou para 2.365.754 RLUs, comprovando assim que a ligação bactérias-conjugado ocorreu. Neste contexto, é possível realizar uma medida semiquantitativa do número de bactérias por RLUs. Uma vez que devido às dificuldades observadas na contagem celular, próprias da bactéria e deficiência do método de contagem, não foi possível estabelecer um padrão numérico da quantidade exata de bactérias em relação às Unidades Relativas de Luz (RLUs).

Exemplo 5:

[0128] Foram utilizadas diferentes concentrações do conjugado IgG-DMAE-NHS, em iguais volumes da bactéria *Leptospira interrogans* na concentração de 10^8 /mL, a fim de avaliar a menor concentração do complexo necessária para a detecção da bactéria. A partir do ensaio realizado, observou-se que é possível a obtenção de uma quimiluminescência significativa mesmo em baixas concentrações do conjugado. Apesar da diminuição da medida de quimiluminescência com a menor concentração do

conjugado, a mesma torna-se significativamente baixa apenas a partir da concentração de 1:16 do conjugado, que apresenta uma quimiluminescência de 255.543 RLUs (Figura 5). Sendo assim, foi então estabelecida a concentração mínima ideal do conjugado em 1:8. Os resultados sugerem que apenas uma pequena quantidade do conjugado é necessária para a realização do método. O que aumenta a sua precisão e conseqüentemente diminui os custos do mesmo, vantagens importantes para o desenvolvimento de um método de diagnóstico.

Exemplo 6:

[0129] A fim de analisar a menor quantidade necessária para a realização do método, foram realizadas incubações com diferentes volumes da amostra e do conjugado IgG-DMAE-NHS, observou-se que o volume de amostra não interfere na validação do método, visto que a quimiluminescência não foi significativamente alterada com os diferentes volumes utilizados. Sendo possível, a utilização de volumes pequenos (100 μ L de bactérias e 10 μ L do conjugado) e obtendo-se uma quimiluminescência de 3.345.572 RLUs, enquanto que a quimiluminescência do maior volume utilizado foi de 1.889.272 RLUs, para 1mL de bactérias e 100 μ L do complexo (Figura 6). Porém, devido à maior probabilidade de erros em pequenos volumes, foi estabelecido o uso de 200 μ L de leptospiras e 20 μ L do

complexo para os protocolos subsequentes. Baixos volumes de amostras para a realização do método é uma ferramenta importante no desenvolvimento de um método para leptospirose, devido à dificuldade de obtenção das mesmas em muitos casos e ainda por baratear os custos do mesmo.

Exemplo 7:

[0130] A partir das quimiluminescências medidas foi possível observar que não houve diferenças significativas entre as bactérias marcadas nos diferentes períodos de tempo de incubação, apresentando uma medida quimiluminescente uniforme tanto com o maior tempo (2h de incubação, QL = 1.961.954 RLUs) quanto com o menor tempo de incubação (15min de incubação, QL = 2.450.352 RLUs). O ensaio demonstrou que o teste apresenta uma alta quimiluminescência mesmo em curtos períodos de incubação, sendo possível obter um resultado eficiente com apenas 15min de incubação das bactérias e o conjugado (Figura 7). Vantagem que proporciona o desenvolvimento de um possível método de diagnóstico eficaz, com rapidez, ferramentas de alto interesse industrial.

Exemplo 8:

[0131] Foi possível observar que existe uma reação imunológica antígeno-anticorpo específica entre o conjugado e as leptospiras (Figura 8), uma vez que a

complexação prévia do anticorpo frio às bactérias reduz sua quimiluminescência. Nos quais as quimiluminescências observadas são de 756.951 RLUs e 1.390.304 RLUs para leptospiras marcadas com IgG-IgG-DMAE-NHS e IgG-DMAE-NHS, respectivamente. É importante salientar que mesmo após a incubação do anticorpo frio, o complexo IgG-DMAE-NHS é capaz de se complexar às bactérias e produzir quimiluminescência significativa, sugerindo assim que nem todos os epítomos das leptospiras são ocupados. Também é possível notar que o anticorpo sozinho (IgG) não produz quimiluminescência (QL = 872 RLUs), comprovando assim, que a quimiluminescência emitida é devida à ligação entre o antígeno (bactéria) e o anticorpo conjugado ao éster de acridina.

Exemplo 9:

[0132] Foi possível observar que a urina de hamster infectados - Urina Infectada - apresentou uma quimiluminescência superior em relação à observada na urina de hamster não infectados - Urina Controle. De acordo com Faine e colaboradores (1999), espera-se que as leptospiras sejam detectadas na urina a partir de sete dias após a infecção, preconização essa que fornece embasamento para o teste proposto, uma vez que no 10º dia após a infecção a média da quimiluminescência da Urina Infectada (775.894 RLUs) apresentou-se 3,95 vezes maior do que

aquela comparada à média da Urina Controle (195.987 RLUs), enquanto no 19º dia após a infecção as médias de quimiluminescência foram de 1.305.597 RLUs e 625.800 RLUs, respectivamente, para as urinas Infectadas e Controle. Ainda de acordo com Faine e colaboradores (1999), também é esperado um aumento no volume da urina (poliúria) em animais cronicamente infectados, sinal esse também observado no experimento proposto, onde os hamsters infectados apresentaram o volume de urina aproximadamente três vezes maior em relação ao volume de urina apresentado pelos hamsters do grupo controle. Não se obteve resultado positivo na visualização de leptospiras por microscopia de campo escuro, não sendo visualizada nenhuma bactéria em nenhuma das amostras analisadas tanto do grupo de Infectados quanto do grupo Controle. Em todos os dias analisados foi possível observar uma maior quimiluminescência na Urina Infectada em comparação à Urina Controle, mesmo quando não é possível a observação de leptospiras no método padrão outro por microscopia de campo escuro¹. Os sobrenadantes de todas as amostras coletadas também tiveram suas quimiluminescências avaliadas, a fim de se obter um controle negativo para todas as amostras, uma vez que é possível detectar os complexos não conjugados no sobrenadante de cada amostra.

Exemplo 10:

[0133] A partir das análises das amostras por PCR, foi possível detectar a presença de leptospiras na urina apenas no 12º dia após a infecção dos animais (Figura 10). O método de análise por PCR é uma técnica largamente utilizada e comprovada, e atualmente é considerada um dos padrões para o diagnóstico da leptospirose. Porém não foi possível a detecção das bactérias nos primeiros dias de infecção através da utilização deste método.

Exemplo 11:

[0134] As culturas foram realizadas no 12º dia após a inoculação das leptospiras nos hamsters, no último dia de coleta das urinas. Todos os 10 animais tiveram seus rins e fígados coletados para a análise do crescimento das leptospiras em cultura. Foi possível observar a formação do anel de crescimento bacteriano em todos os cinco animais infectados bem como a visualização das leptospiras em microscópio de campo escuro (Figura 11A) após sete dias de inoculação e incubação a 29°C do macerado de rim e fígado no meio semissólido. Já nos animais controle não houve o crescimento das bactérias (Figura 11B).

Exemplo 12:

[0135] Em urina humana experimentalmente contaminada, também observou-se o mesmo padrão da urina de hamster infectado. Ou seja, foi a possível detecção com o aumento da quimiluminescência proporcional à maior

quantidade de bactérias presentes na urina. Conforme ilustrado na Figura 13, para a concentração de 10^4 leptospiras obteve-se uma quimiluminescência média de 1.164.435 RLUs, enquanto para as concentrações de 10^5 e 10^6 as quimiluminescências médias foram, respectivamente, de 1.367.663 RLUs e 1.553.067 RLUs. Já na urina humana não infectada (controle) a quimiluminescência foi de 8.751 RLUs. Os dados sugerem que urina humana também não apresenta-se como um interferente para o desenvolvimento do método, apesar dos seus diversos componentes e contaminantes. Pretende-se ainda comparar a utilização do método com outras bactérias tais como *Legionella* spp., *Serratia* spp., *Borrelia* spp., entre outras que também são eliminadas na urina (Widianty et al, 2013).

Conclusões

[0136] Com a presente invenção verificou-se que:

(1) a conjugação do éster de acridina dimetil N-hidroxisuccinamida (DMAE-NHS) ao anticorpo anti-Leptospira interrogans resultou em um derivado coletado mediante cromatografia por exclusão molecular com Sephadex-G25, separadamente do DMAE- NHS não conjugado;

(2) o complexo formado entre a bactéria e o anticorpo conjugado ao DMAE-NHS emitiu luz quando em meio alcalino e na presença de peróxido de hidrogênio (quimiluminescência);

(3) esta luz emitida mostrou-se proporcional ao

aumento do número de bactérias;

(4) houve redução da luz emitida quando a bactéria foi previamente incubada com o anticorpo não conjugado;

(5) a presença da bactéria na urina de hamster infectado foi detectada mediante o emprego desta metodologia a partir do 5o dia de infecção;

(6) empregando a técnica da PCR a detecção da bactéria na urina dos hamsters infectados ocorreu no 12º dia após infecção; e

(7) mediante cultura de tecidos (macerado de fígado e rim) dos hamsters foi detectada a presença da *Leptospira interrogans*.

[0137] Tais resultados demonstram uma metodologia mais sensível para a detecção de leptospiros e permite o diagnóstico precoce da leptospirose.

[0138] Embora tenham sido mostradas apenas algumas modalidades da presente invenção, será entendido que várias omissões, substituições e alterações podem ser feitas por um técnico versado no assunto, sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção.

[0139] É expressamente previsto que todas as combinações dos elementos que desempenham a mesma função substancialmente da mesma forma para alcançar os mesmos resultados estão dentro do escopo da invenção. Substituições de elementos de uma modalidade descrita para

outra são também totalmente pretendidos e contemplados.

Referências

[0140] Abgueguen, P.; Delbos, V.; Blanvillain, J.; Chennebault, J. M.; Cottin, J.; Fanello, S.; Pichard, E. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *Journal of Infection*, v. 57, p.171-178, 2008.

[0141] Adler, B.; De la pena Moctezuma, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.287-296, 2010.

[0142] Almeida, S. M. V. Síntese, Caracterização e Aplicação Biotecnológica do Dimetil-2-(acridin-9-ilmetileno)malonato. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. 110 p.

[0143] Aviat, F.; Rochereau-Roulet, S.; Branger, C.; Estavoyer, J.M.; Chatrenet, B.; Orsonneau, J.L.; Thorin, C.; Andre-Fontaine, G. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 33, p. 375-387, 2010.

[0144] Bartoloni, F. H.; Ciscato, L. F. M. L.; Peixoto, M. M. M.; Santos, A. P. F.; Santos, C. S.; Oliveira, S.; Augusto, F. A.; Pagano, A. P. E.; Bastos, E. L.; Baader, W. J. Luz: um raro produto de reação. *Química Nova*, v. 34, No. 3, p. 544-554, 2011.

[0145] Barthi, A. R.; Nally, J. E.; Ricaldi, J. N.; Mathias, M. A.; Diaz, M. M.; Lovett, M. A.; Levett, P.N.; Gilman, R. H.; Willig, M. R.; Gotuzzo, E.; Vinetz, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, p. 757-771, 2003.

[0146] Branger, C. ; Sonrier, C. ; Chatrenet, B. ; Klonjowski, B. ; Ruvoen-Clouet, N. ; Aubert, A. ; André-Fontaine, G. ; Eloit, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infection and Immunity*, v. 69, Issue 11, p. 6831-6838, 2001.

[0147] Brasil. Guia de vigilância epidemiológica /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.- 6. ed. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816p.

[0148] Brasil. Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 34p.

[0149] Brasil. Boletim Eletrônico Epidemiológico - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse na Saúde Pública, Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas

por Vetores e Antropozoonoses (Covev). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 24p.

[0150] Brasil. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Departamento de Análise da Situação de Saúde (DASIS). Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

[0151] Campbell, A. K., Hallet, M. B., Weeks, I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods in Biochemistry Analysis*, v. 31, p. 317-416, 1985.

[0152] Campos, L. M.; Cavalcanti, J. L.; Lima-Filho, J. L.; Carvalho JR, L. B.; Beltrão, E. I. C. Acridinum Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2006.

[0153] Cerqueira, G. M.; Picardeau, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 760-768, 2009.

[0154] Chaemchuen, S., Rungpragayphan, S., Poovorawn, Y., Patarakul, K. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. *Veterinary Microbiology*, v. 153,

Issues 1-2, p. 178-185, 2011.

[0155] Chagas-Junior, A. D.; McBride, A. J. A.; Athanazio, D. A.; Figueira, C. P.; Medeiros, M. A.; Reis, M. G.; Ko, A. I.; McBride, F. W. C. An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p.1632-1637, 2009.

[0156] Chagas-Junior, A. D.; Da Silva, C. L. R.; Soares, L. M.; Santos, C. S.; Silva, C. D. C. M.; Athanazio, D. A.; Reis, M. G.; Ko, A. I.; McBride, F. W. C.; McBride, A. J. A. Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. *PloS ONE*, v. 7, Issue 2, p. 1-5, 2012.

[0157] Chen, H.; Zheng, Y.; Jiang, J.H.; Wu, H.L.; Shen, G. L.; Yu, R.Q. An ultrasensitive chemiluminescence biosensor for cholera toxin based on ganglioside-functionalized supported lipid membrane and liposome. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, Issue 4, p. 684-689, 2008.

[0158] Cinco, M. New insights into the pathogenicity of leptospire: evasion of host defences. *New Microbiologica*, v. 33, p. 283-292, 2010.

[0159] Davis, J. M.; Haake, D. A.; Ramakrishnan, L. *Leptospira interrogans* Stably Infects Zebrafish Embryos,

Altering Phagocyte Behavior and Homing to Specific Tissues. *PloS ONE*, v. 3, Issue 6, p. 1-6, 2009.

[0160] Di, Y.; Zhao, M.; Nie, Y.; Wang, F.; Lv, J. A High-Performance Liquid Chromatography:Chemiluminescence Method for Potential Determination of Vardenafil in Dietary Supplement. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 982186. doi: 10.1155/2011/982186, 2011.

[0161] Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R. Chemiluminescence as Diagnostic Tool. A review. *Talanta*, v. 51. p. 415-439, 2000

[0162] Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2. ed. Melbourne: Australia, MediSci, 1999. 272 p.

[0163] García-Campaña, A.M.; Gámiz-Gracia, L.; Baeyens, W. R.G; Barrero, F. A. Derivatization of biomolecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 793, p. 49-74, 2003.

[0164] Genovez, M.E.; Yasuda, P.H. Avaliação da Eficiência de Estirpes de *Leptospira biflexa* no Diagnóstico de Triagem da Leptospirose Animal. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.19, n.4, p. 399-405, 1988.

[0165] Haake, D.A.; Mazel, M.K.; Mccoy, A.M.; Milward, F.; Chao, G.; Matsunaga, J.; Wagar, E.A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41

Exhibit Synergistic Immunoprotection. *Infection and Immunity*, v. 67, Issue 12, p. 6572-6582, 1999.

[0166] Haake, D. A.; Chao, G.; Zuerner, R. L.; Barnett, J. K.; Barnett, D.; Mazel, M.; Matsunaga, J.; Levett, P. N.; Bolin, C. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 2276-2285, 2000.

[0167] Hartwig, D.D.; Forster, K.M.; Oliveira, T.L.; Amaral, M.; McBride, A.J.; Dellagostin, O.A. A Prime-boost Strategy Using the Novel Vaccine Candidate, LemA, Protects Hamsters Against Leptospirosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, Issue 5, p. 747-752, 2013.

[0168] Hinrichsen, S. L.; Godoi, J. T. A. M.; Jucá, M. Godoi, E. T. A. M.; Santos-Neto, L. G.; Silva-Neto, J. M. Leptospirose. In: DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 5ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2005. 1098p.

[0169] Janwitthayanan, W.; Keelawat, S.; Payungporn, S.; Lowanitchapat, A.; Suwancharoen, D.; Poovorawan, Y.; Chirathaworn, C. *In vivo* gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. *Microbiological Research*, v. 168, Issue 5, p. 268-272, 2013.

[0170] Kricka, L. J. Clinical applications of

chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, v. 500, p. 279-286, 2003.

[0171] Lara, F. J.; García-Campaña, A. M.; Aaron, J.-J. Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 679, p. 17-30, 2010.

[0172] Levett, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 4, p. 435-448, 2004.

[0173] Li, W.; Yu, J.; Wang, T.; Wei, B. Electroluminescence of organic light-emitting diodes with an ultra-thin layer of dopant. *Materials Science & Engineering*, v. 149, p. 77-81, 2008.

[0174] Lim, V. K. E. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Malaysian Journal Pathology*, v. 33, Issue 1, p. 1- 5, 2011.

[0175] Lomar, A. V.; Diament, D.; De Brito, T.; Veronesi, R. (*in memoriam*) Leptospiroses. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. *Tratado de Infectologia*. 3^a Edição, vol. 1. São Paulo. Editora Atheneu, 2005. 2167p.

[0176] Lucas, D. S. D.; Cullen, P. A.; Lo, M.; Srikram, A. Sermswanc, R. W.; Adler, B. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine*, v. 29, p. 3413-3418, 2011.

[0177] Luo, M.; Chen, X.; Zhou, G.; Xiang, X.; Chen, L.; Ji, X.; He, Z. Chemiluminescence biosensors for DNA detection using graphene oxide and a horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme. *Chemical Communications*, v. 48, Issue 8, p. 1126-1128, 2012.

[0178] Matos, L.R.B. Utilização da Lectina do Amendoim *Arachis hypogea* Conjugada a Éster de Acridina na Identificação de Carcinoma Mamário. Monografia. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010. 42p.

[0179] Mérien, F.; Amouriaux, P.; Perolat, P.; Baranton, G. & Sanint-Girons, T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

[0180] Monaris, D. Avaliação do Potencial Adjuvante da Flagelina FliC_i de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium no Desenvolvimento de Uma Vacina contra Leptospirose. Dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. 110p.

[0181] Moreira, P. N. T. Planejamento e Otimização de um Método Quimiluminescente para Determinação de Vitamina B12 Usando um Sistema Fluxo-Batelada. Tese. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009. 114p.

[0182] Mu, X.; Zhao, S.; Huang, Y.; Ye, F. Use of capillary electrophoresis with chemiluminescence detection

for sensitive determination of homocysteine. *Journal of Separation Science*, v. 35, Issue, 2, p. 280-285, 2012.

[0183] Murray, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Veterinary Microbiology*, v.162, p. 305-314, 2013.

[0184] Murray, G.L.; Miranda, L.; Bulach, D.M.; Srikrum, A.; Seemann, T.; Quinsey, N.S.; Sermwan, R.W.; Allen, A.; Adler, B. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersernii* sorovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine*, v. 31, p. 495-499, 2012.

[0185] Musso, D.; La Scola, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 46 (4), p. 1-8, 2013.

[0186] Nabity, S. A.; Ribeiro, G. S; Aquino, C. L.; Takahashi, D.; Damião, A. O.; Gonçalves, A. H. O.; Miranda-Filho, D. B.; Greenwald, R.; Esfandiari, J.; Lyashchenko, K. P.; Reis, M. G.; Medeiros, M. A.; Ko, A. L. Accuracy of Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS ONE*, v. 6, Issue 11, p. 1-8, 2012.

[0187] Palaniappan, R. U.M.; Ramanujam, S.; Chang, Y.-F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 20,

p.284-292, 2007.

[0188] Pappas, G.; Cascio, A. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 28, p. 491-496, 2006.

[0189] Perez, J.; Goarant, C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology*, v. 10, Issue 325, p.1-11, 2010.

[0190] Pernambuco. Boletim Epidemiológico da Leptospirose. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Diretoria Geral de controle de Doenças e Agravos. Gerência de Prevenção e Controle de Zoonoses e Outras Endemias e Riscos Ambientais. Recife: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, 2012. 6p.

[0191] Picardeau, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 43, p. 1-9, 2013.

[0192] Pinne, M.; Haake, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. *PloS ONE*, v. 8, Issue 1, p. 1-8, 2013.

[0193] Rongen, H. A. H.; Hoettelmans, R.M.W.; Bult, A.; Van Bennekom, W. P. Chemiluminescence and immunoassays. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v. 12, No 4, p. 433-462, 1994.

[0194] Saengjaruk, P.; Chaicumpa, W.; Watt, G.; Bunyaraksyotin, G.; Wuthiekanun, V.; Tapchaisri, P.; Sittinont, C.; Panaphut, T.; Tomanakan, K.; Sakolvaree, Y.; Chongsa-Nguan, M.; Mahakunkijcharoen, Y.; Kalambaheti, T.; Naigowit, P.; Wambangco, M. A. L.; Kurazono, H.; Hayashi, H. Diagnosis of Human Leptospirosis by Monoclonal Antibody-Based Antigen Detection in Urine. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, No 2, p. 480-489, 2002.

[0195] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[0196] Santa Rosa, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Revista de Microbiologia*, v. 1, Issue 9, p. 97-109, 1970.

[0197] Santos, R. M. S.; Santos, M. F.; Costa, M. F. D. Quimioluminescência e Bioluminescência. *Química Nova*, v. 16, No 3, p. 200-209, 1993.

[0198] Scarcelli, E., Piatti, R. M., Fedullo, J. D. L.; Simon, F.; Cardoso, M. V.; Castro, V., Miyashiro, S.; Genovez, M. E. *Leptospira* spp. Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Clinical Samples of Captive Black-Capped Capuchin Monkey (*Cebus paella*). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p.143-146, 2003.

[0199] Shah, I. Leptospirosis. *Pediatric Infectious Disease*, v. 4 No 1, p. 4-, 2012.

[0200] Silva, E. F.; Medeiros, M. A.; McBride, A. J. A.; Matsunaga, J.; Esteves, G. S.; Ramos, J. G. R.; Santos, C. S.; Croda, J.; Homma, A.; Dellagostin, O. A.; Haake, D. A.; Mitermayer, G. R.; Ko, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

[0201] Sotomayor, M. D. P. T.; Dias, I. L.; Lanza, M. R. V.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*, v. 31, No. 7, p. 1755-1774, 2008.

[0202] Van Dyke, K. Bioluminescent and Chemiluminescence: Instruments and Applications. *Chemiluminescence and Bioluminescence as alternatives to Radioactivity*, v. 1, p. 17, 1988.

[0203] Vasconcellos, S.A. Diagnóstico laboratorial de leptospirose. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 189-195, 1979.

[0204] Verma, R.; Khanna, P.; Chawla, S. Whole-cell inactivated Leptospirosis vaccine: Future prospects. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 9, Issue 4, p.759 - 761, 2013.

[0205] Vijayachari, P.; Sugunan, A. P.; Shriram, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal Biosciences*, v. 33, Issue 4, p. 557-569, 2008.

[0206] Wang, H; Wu, Y.; Ojcius, D. M.; Yang, X. F.; Zhang, C.; Ding, S.; Lin, X.; Yan, J. Leptospiral Hemolysins Induce Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptor 2- and 4-Mediated JNK and NF- κ B Signaling Pathways. *PloS ONE*, v. 7, Issue 8, p. 1-15, 2012.

[0207] Wang, X.; Zhang, Q.Y.; Li, Z.J.; Ying, X.T.; Lin, J.M. Development of high- performance magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay for alpha-fetoprotein (AFP) in human serum. *Clinica Chimica Acta*, n. 393, p. 90-94, 2008.

[0208] Weeks, I.; Beheshti, I.; McCapra, F.; Campbell, A. K.; Woodhead, J. S. Acridinum Esters as High-Specific-Activity Labels in Immunoassay. *Clinical Chemistry*, v. 29, No 8, p. 1474-1479, 1983.

[0209] Widiyanti, D.; Koizumi, N.; Fukui, T.; Muslich, L. T.; Segawa, T.; Villanueva, S. Y. A. M.; Saito, M.; Masuzawa, T.; Gloriani, N. G.; Yoshida, S-I. Development of Immunochromatography-Based Methods for Detection of Leptospiral Lipopolysaccharide Antigen in Urine. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, No 5, p.683-690, 2013.

[0210] Who. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization. Malta. 2003. 122p

[0211] Ximenes, V. F. Estudos de Novos Sistemas Quimiluminescentes Aplicados na Determinação de Atividade Enzimática. Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 191 p.

[0212] Zakeri, S.; Khorami, N.; Ganji, Z. F.; Sepahian, N.; Malmasi, A-A.; Gouya, M. M.; Djadid, N. D. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 10, p. 273-277, 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obtenção de um anticorpo marcado extraído do sangue do coelho inoculado com uma cultura de *Leptospira interrogans* **caracterizado pelo** fato de que compreende as etapas de:

- Purificar o anticorpo IgG anti-*Leptospira interrogans* por meio de precipitação por ácido caprílico;
- Dialisar o anticorpo purificado; e
- Conjuguar o anticorpo purificado ao éster de acridina dimetil N-Hidroxisuccinamida (DMAE-NHS).

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que após a etapa de diálise há uma etapa de avaliação da purificação e atividade funcional dos anticorpos por meio de SDS-PAGE e/ou ELISA.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado pelo** fato de que na conjugação é usado 1 mL de anticorpo purificado e 15 µL de DMAE-NHS a 0,05% em solvente N,N-dimetilformamida (DMF).

4. Método para diagnóstico de leptospirose *in vitro* **caracterizado pelo** fato de que consiste em colocar fluidos biológicos suspeitos de conter leptospiros em contato com o anticorpo IgG anti-*Leptospira interrogans* marcado tal como obtido pelo processo descrito em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e detectar a ligação do anticorpo marcado à leptospira por quimiluminescência.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o fluido biológico é urina.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 5, **caracterizado pelo** fato de que o anticorpo marcado foi usado em uma concentração de 1:8 a 1.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, **caracterizado pelo** fato de que o anticorpo marcado foi usado em um volume entre 10 e 100 µL.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7, **caracterizado pelo** fato de que o tempo de incubação da amostra contendo fluidos biológicos com o anticorpo marcado foi de 15 min a 120 min.

9. Uso do anticorpo marcado tal como obtido pelo processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 **caracterizado pelo** fato de que é para a detecção de leptospiras *in vitro*.

10. Kit para detecção *in vitro* da presença de cepas de leptospira em fluidos biológicos **caracterizado pelo** fato do kit compreender o anticorpo IgG anti-*Leptospira interrogans* associado ao éster de acridina DMAE-NHS.

11. Kit, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que o fluido biológico é urina.

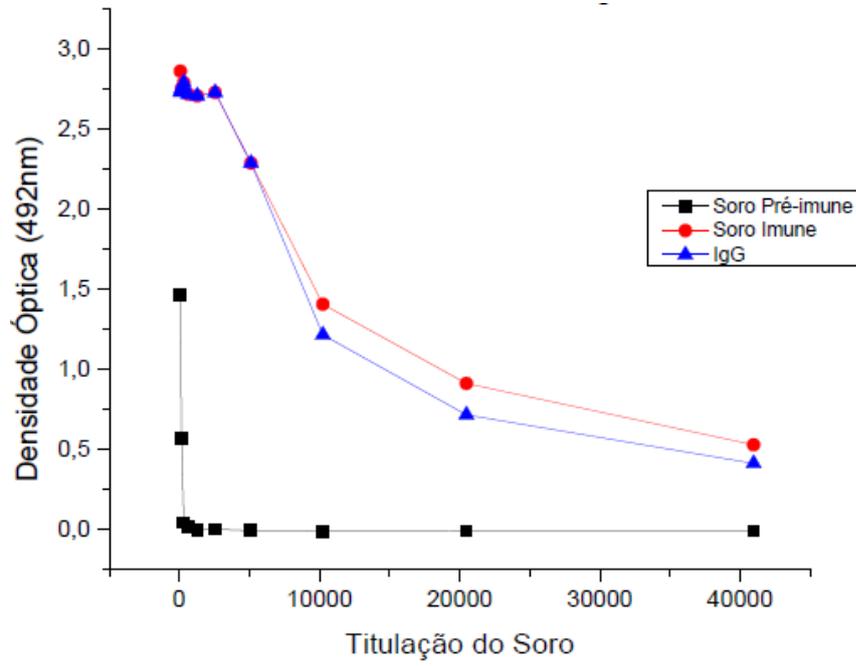


FIGURA 1

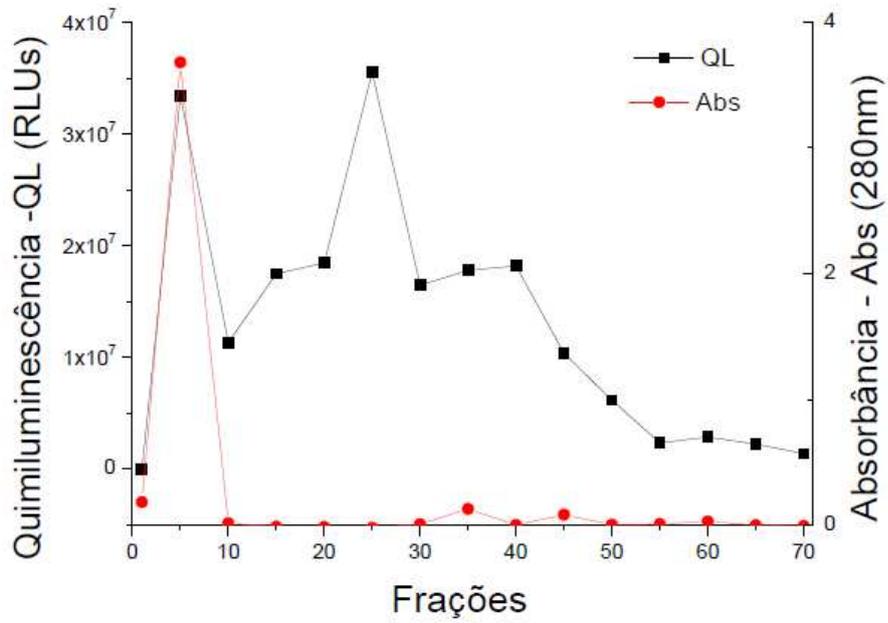


FIGURA 2

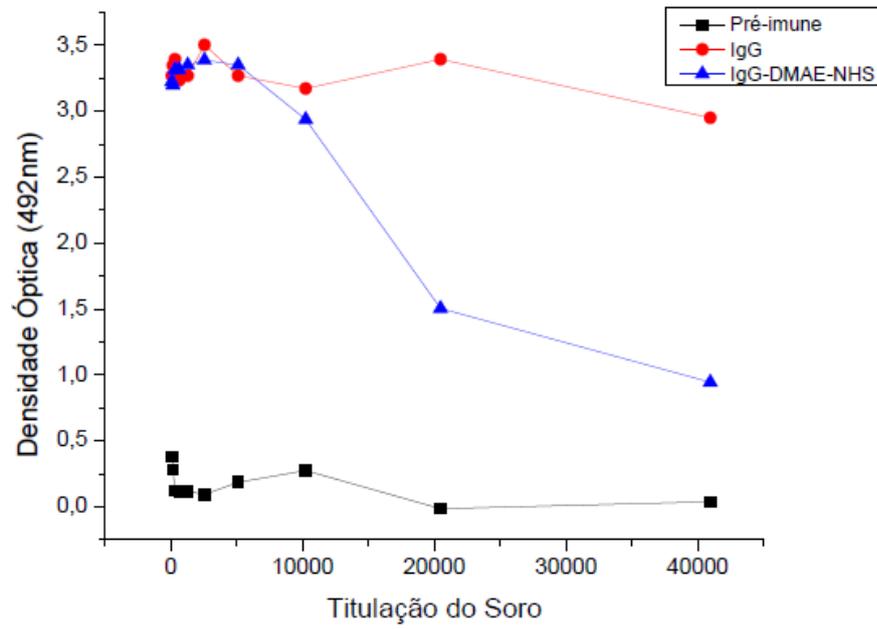


FIGURA 3

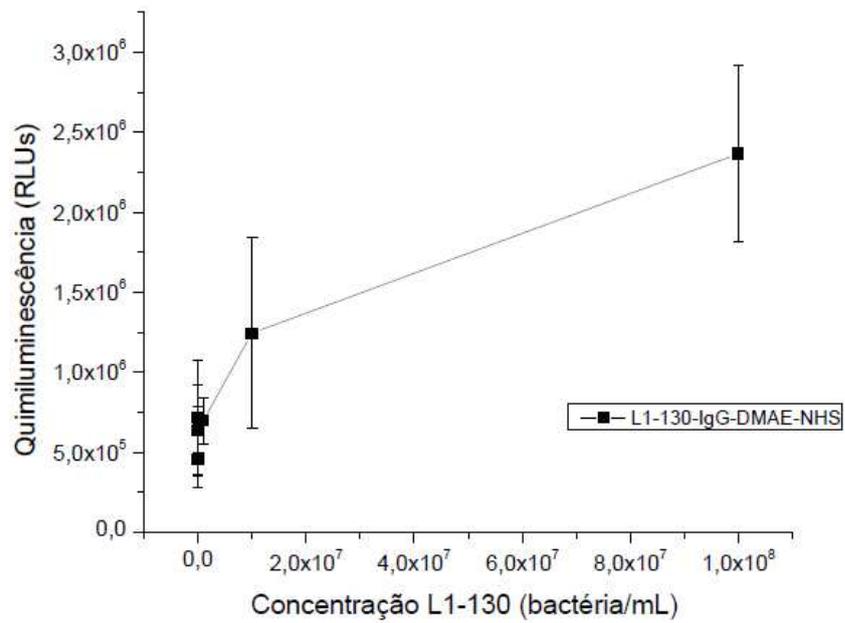


FIGURA 4

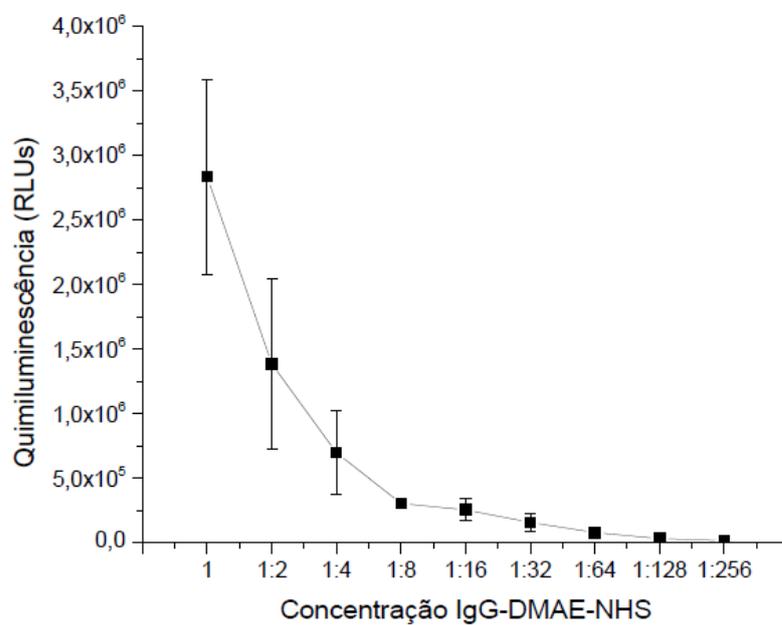


FIGURA 5

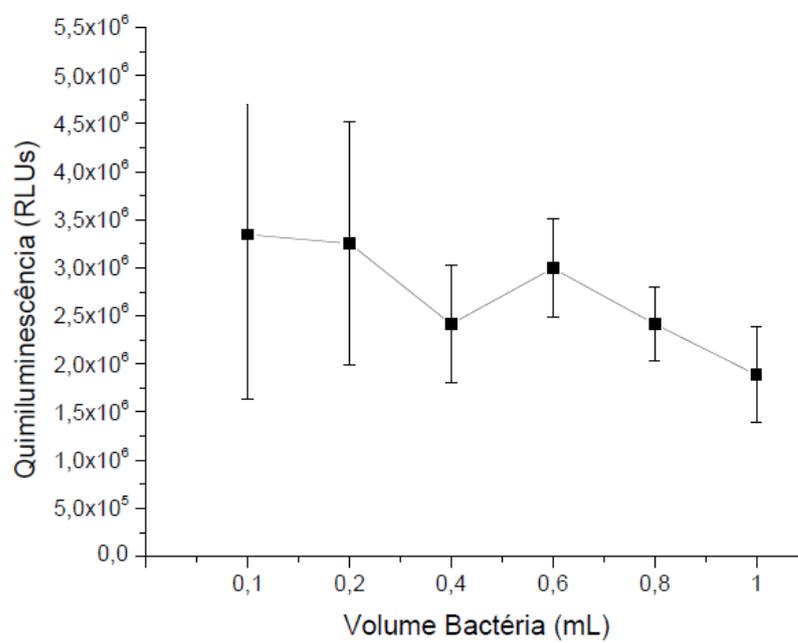


FIGURA 6

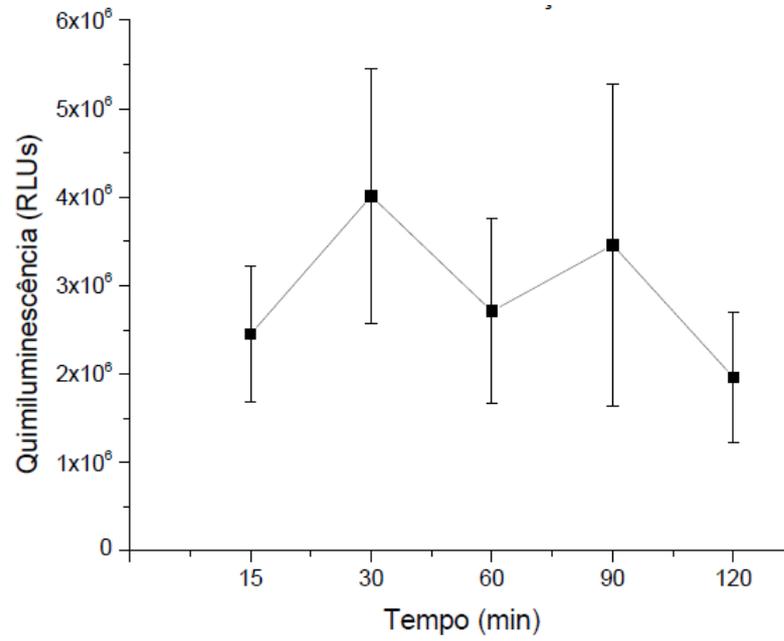


FIGURA 7

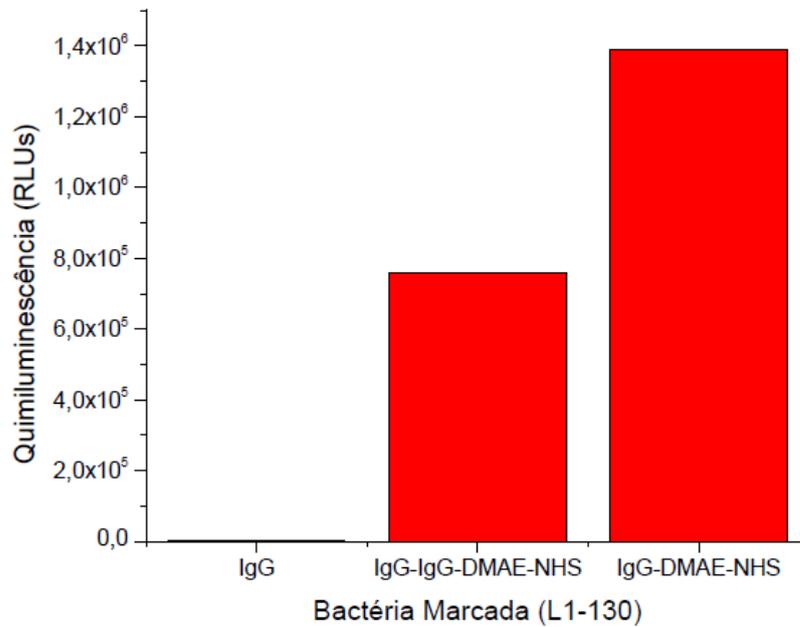


FIGURA 8

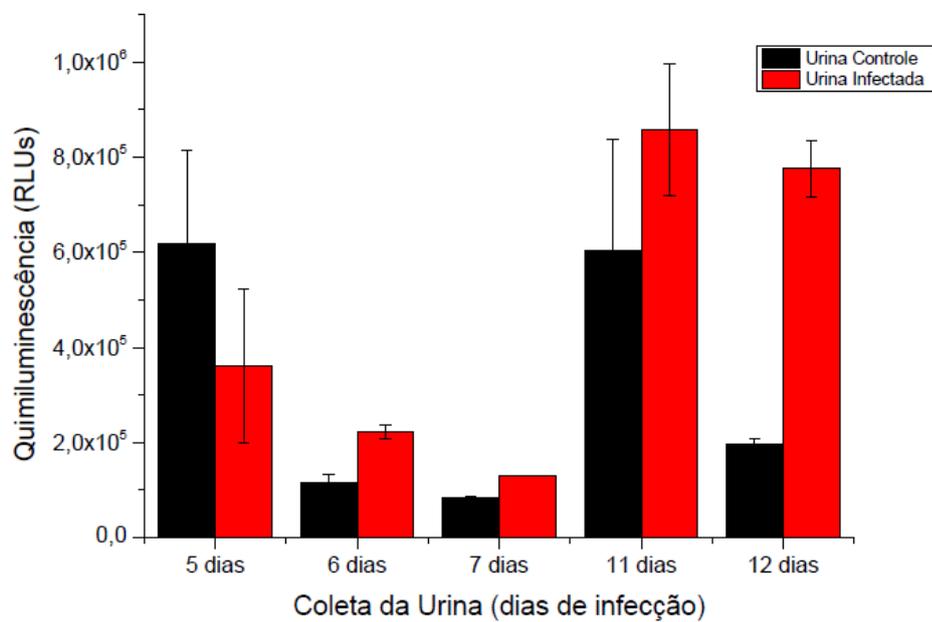


FIGURA 9

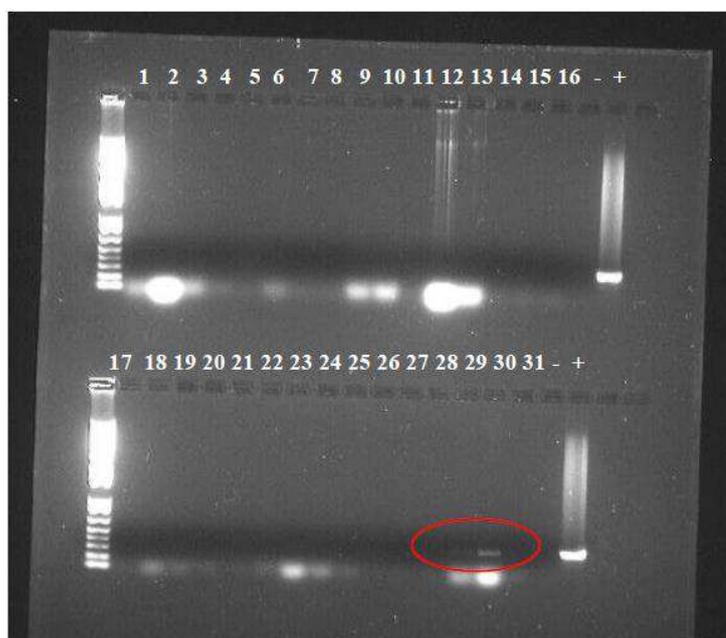


FIGURA 10

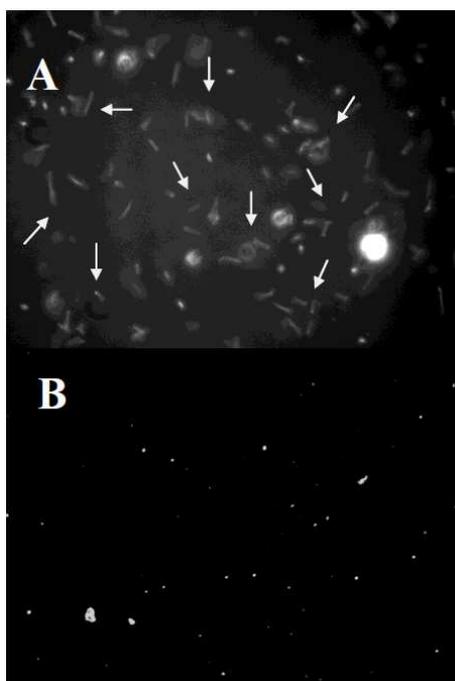


FIGURA 11

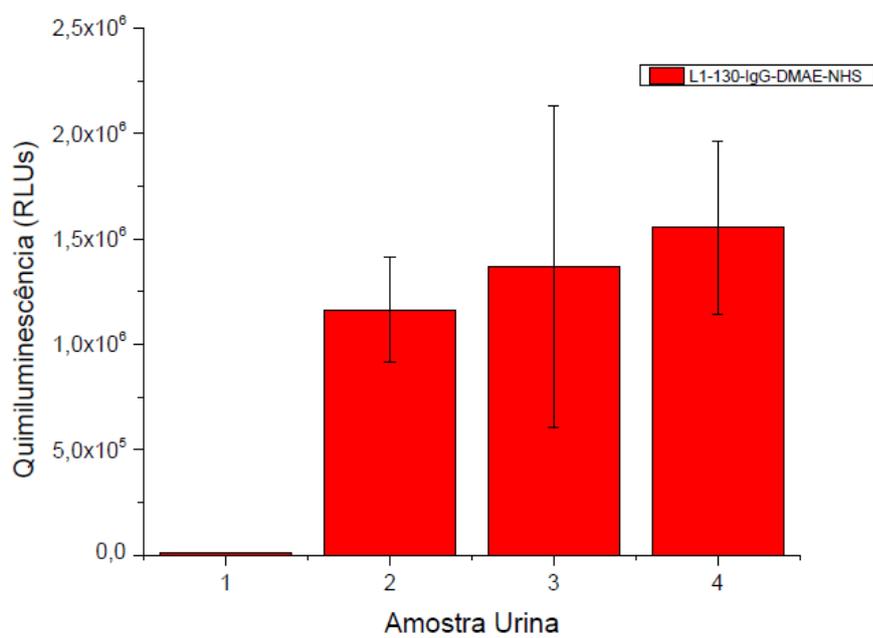


FIGURA 12

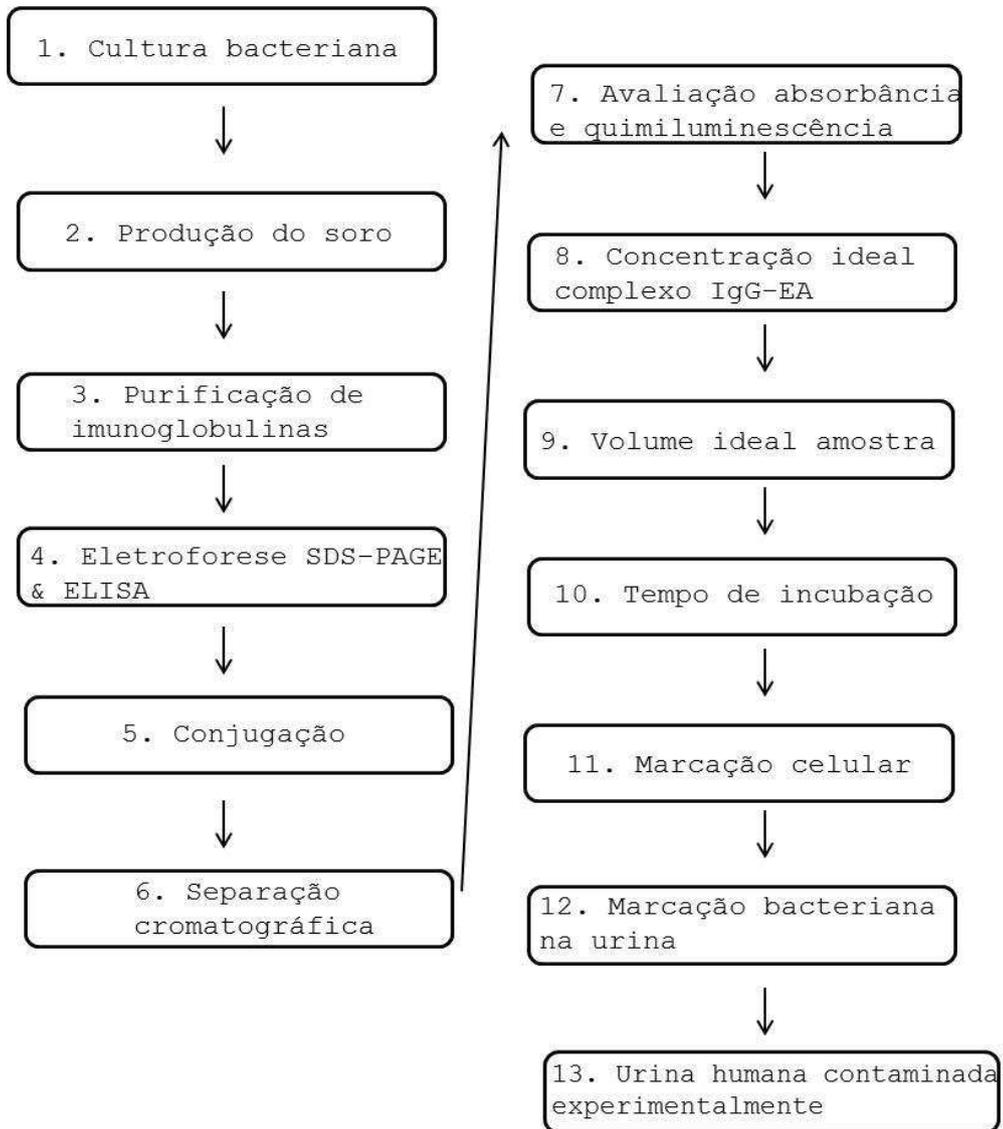


FIGURA 13