


Impl. 19.10.92

MATILDE COTA KOURY 

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DE  
Leptospira interrogans (STIMSON) WENYON, 1926.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas, como um dos requisi-  
tos para obtenção do grau de Dou-  
tor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel. 

Departamento de Microbiologia e Imunologia do  
Instituto de Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas.

Campinas

São Paulo - Brasil

1982

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DE  
Leptospira interrogans (STIMSON) WENYON, 1926.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Humberto de Araújo Rangel pela orientação científica.

Aos professores Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro e Dra. Dária Repka (Departamento de Microbiologia e Imunologia - UNICAMP), pelo apoio e valiosas sugestões.

Ao professor Dr. Eduardo Osório Cisalpino (Departamento de Microbiologia - UFMG), pelo estímulo e apoio na nossa carreira universitária.

Ao professor Dr. Carlos A. Santa Rosa (in memorian) (Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, USP), pela ajuda.

Aos professores Dr. L. Hartman, Dr. Walter Esteves e Dr. P.A. Bobbio (Tecnologia de Alimentos , UNICAMP), pelo apoio recebido.

Ao Cássio Mario Ferreira Costa (Departamento de Bioquímica da UFMG), pela colaboração na análise de aminoácido.

À Financiadora de Estudos e Projetos pelos recursos fornecidos para execução deste trabalho.

Ao Programa Institucional de Capacitação  
Docente (PICD - CAPES), pela bolsa oferecida para  
realização do curso de doutorado.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO -----	1
MATERIAL E MÉTODOS -----	8
I. Leptospiras usadas -----	9
II. Preparação de antígenos -----	10
II.I. Para as reações de soroaglutinação mi- croscópica (AM) -----	10
II.II Para as reações de fixação de complemen- to (RFC) -----	11
III. Purificação do antígeno do tipo II do so- rotipo canícola -----	12
IV. Soros -----	13
IV.I. Soros imunes obtidos em coelhos -----	13
IV.II Soros humanos -----	16
V. Tratamento do antígeno do tipo II com pepsina ou pronase -----	17
VI. Testes de solubilidade -----	18
VII. Reações sorológicas -----	18
VII.I. Reações de soroaglutinação microscópica (AM) -----	18
VII.II Reações de fixação de complemento -----	19
VII.III Reações de imunodifusão em gel -----	20
VIII. Eletroforese em gel de agarose -----	20
IX. Estimativa do peso molecular -----	21
X. Cromatografia de exclusão -----	22

	PÁGINA
XI. Análise química -----	22
XI.I. Análise de açucares -----	24
XI.II. Análise de aminoácidos e aminoa- çucares -----	24
XI.III. Análise de lípides -----	25
RESULTADOS -----	26
I. Especificidade dos antígenos <u>me</u> tílicos do tipo I -----	27
II. Especificidade e propriedades do antígeno do tipo II do sorotipo canicola -----	32
III. Purificação -----	34
IV. Composição química do antígeno do tipo IIc -----	38
DISCUSSÃO -----	41
RESUMO E CONCLUSÕES -----	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	51



ABREVIATURAS

AM - Aglutinação Microscópica  
BSA - Albumina Sérica Bovina  
DNA - Ácido desoxiribonucleico  
DTT - Ditioneitol  
H - Cadeia pesada da IgG  
HA - Hemaglutinação  
HL - Hemolítica  
IgG - Imunoglobulina  
PAS - Ácido Periódico - Schiff  
RFC - Reações de Fixação de Complemento  
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio  
SSH - Substância Sensibilizadora de Hemácias  
UFC - Unidades Fixadoras de Complemento

## INTRODUÇÃO

WEIL (1886) fez a descrição da primeira doença infecciosa causada por leptospira, caracterizada por febre, icterícia, petéquias e envolvimento renal. Entretanto, o agente etiológico da doença só foi isolado trinta anos mais tarde, a partir de sangue e tecidos de pacientes e foi denominada Spirochaeta ictero-haemorrhagiae, INADA et alii (1916).

Posteriormente outras leptospiras foram descobertas. Como as doenças provocadas por essas leptospiras apresentavam um quadro clínico diferente da doença de Weil, receberam nomes distintos, a saber: febre de sete dias ou Nanukayami, causada por L. hebdomadis, IDO et alii (1918); doença de Weil Indonésiana ou febre dos arrozais, causada por L. bataviae (1926); febre do brejo, causada por L. grippotyphosa, TARASSOFF (1931). De acordo com a World Health Organization (WHO) (1967), o complexo interrogans compreende cerca de 130 sorotipos arranjados em dezesseis soro grupos.

No homem a infecção por leptospiras se dá pela penetração do microrganismo através da pele ou mucosas e atingem o sangue circulante. Após um período de incubação de sete a doze dias, o paciente desenvolve febre e duas fases se sobrepõem: a de leptospiremia

seguida da fase de leptospirúria e desenvolvimento de anticorpos, TURNER (1969, 1973).

A sintomatologia das leptospiroses humanas se manifesta sob aspectos diversos e variados, o que torna difícil e pouco seguro o diagnóstico em bases clínicas, fazendo-se necessária a confirmação por diagnóstico laboratorial.

Para o diagnóstico laboratorial das leptospiroses a seleção de métodos adequados depende do curso de infecção. Na fase de leptospiremia é difícil o reconhecimento das leptospiras entre as hemácias. O isolamento do microrganismo através da cultura só é possível durante a fase aguda da doença e mesmo assim o seu crescimento em meios adequados é lento. O isolamento de leptospira a partir da urina é problemático devido à rápida lise do microrganismo neste material. Além do mais, deve-se estabelecer o diagnóstico diferencial com treponemas da genitália e pseudo-espiroquetas, MAILLOUX (1969). A inoculação de amostras de sangue ou urina, líquor, etc. em animais de experimentação é difícil de ser executada em laboratório de rotina. Deste modo, o diagnóstico depende freqüentemente da demonstração de anticorpos nos soros de pacientes.

A WHO (1967) recomenda a reação de AM como teste padrão para o diagnóstico das leptospiroses. No

entanto, esta técnica exige repiques semanais para a manutenção de leptospiros, bem como a técnica para sua execução é laboriosa e necessita de experiência adequada. Em função disso, outros métodos foram propostos, visando a utilização de antígenos mais estáveis para o diagnóstico das leptospiroses.

O primeiro destes antígenos, que era dotado de capacidade de sensibilizar hemácias, e por este fato era conhecido por SSH, foi utilizado em reações HA. Esta SSH foi preparada por CHANG & McCOMB, (1954) através do tratamento das leptospiros com taurocolato de sódio e etanol absoluto.

Posteriormente outros tipos de antígenos para as reações de HA foram preparados a partir de leptospiros desintegradas por ultra-som ou tratadas com desoxicolato de sódio, IMAMURA et alii (1972, 1974) ou extraídas com etanol, SULZER & JONES (1973).

Para a reação HL, COX (1955, 1957) preparou extratos de leptospiros de acordo com CHANG & McCOMB (1954). Usando a técnica de COX (1957), COX et alii (1957) e BAKER & COX (1973) prepararam SSH de leptospiros para as reações de HL, HA e HL respectivamente. De uma maneira geral, as reações de HA e/ou HL com esses antígenos descritos foram específicas de gênero. Essas reações, segundo MAILLOUX (1975) falham em sensibilidade e especificidade.

Vários antígenos foram preparados também para o diagnóstico das leptospiroses pelas RFC utilizando-se diferentes metodologias. BESSEMANS & NELIS (1928) prepararam antígenos por extração alcoólica ou aquosa de fígado de cobaia infectada com L. icterohaemorrhagiae.

Antígenos foram obtidos de sobrenadante de cultura, EZELL et alii (1952) e PIKE et alii (1953) ou de cultura de leptospiras tratadas com piridina e precipitada pela acetona, LABZOFFSKY & KELEN (1960). Esses antígenos mostraram ser tipo específico quando examinados com soros de coelhos anti-leptospiras pelas RFC mas não foram estudados frente a soros de pacientes com leptospiroses, enquanto que o antígeno preparado de sobrenadante de cultura aquecida a 100°C apresentou reação cruzada quando examinado pelos RFC com soros de pacientes com doença de Weil, BOERNER & LUKENS (1941).

SHINAGAWA & YANAGAWA (1972) prepararam um antígeno da cepa Kyoto pela extração com fenol 90% e purificação pela precipitação com etanol. Usando este método de extração, KASAI & YANAGAWA (1974) prepararam antígeno de L. canicola. Quando foram examinados pelas RFC e imunodifusão, ou somente pela reação de imunodifusão, KASAI & YANAGAWA (1974), frente a soros de coelhos anti-leptospiras, estes antígenos se mostraram tipo específicos.

Antígenos gênero específicos foram preparados a partir de leptospiras desintegradas por ultrassom, RANDALL et alii (1949) e YAGER et alii (1951), tratadas com etanol a 70%, ROTHSTEIN & HIATT (1956) ou desintegradas com citrato de sódio, desoxicolato de sódio e tratadas com clorofórmio álcool-amílico, SCHNEIDER (1945a). A extração de leptospiras com etileno glicol liberou um antígeno sorogrupo específico, MURASCHI et alii (1956).

Exceção feita aos antígenos tipo específicos de SHINAGAWA & YANAGAWA (1972) e KASAI & YANAGAWA (1974), que foram obtidos a partir de leptospiras cultivadas em meio sintético de SHENBERG (1967), a maioria desses antígenos descritos foram obtidos a partir de leptospiras cultivadas em meio complexo e examinados como extratos brutos.

Os dados da literatura mostram que os antígenos preparados para o diagnóstico das leptospiroses pelas RFC foram examinados somente com soros de coelhos anti-leptospira ou com pequeno número de soros de pacientes com leptospiroses. Observa-se também que somente alguns desses antígenos foram analisados quimicamente. Assim, a presença de carboidrato e proteína foi demonstrada no antígeno de SCHRICKER & HANSON (1963). Além desses componentes a presença de fósforo foi revelada nos antígenos de ROTHSTEIN & HIATT (1956) e SCH -



NEIDER (1954a, 1954b). O antígeno tipo específico de KASAI & YANAGAWA (1974) era composto de lípides, carboidratos e proteínas, enquanto que o de SHINAGAWA E YANAGAWA (1972) revelou também a presença de fósforo.

Embora vários tipos de antígenos tenham sido propostos para o diagnóstico das leptospiroses por diferentes reações sorológicas, nenhum deles foi usado para tal finalidade. A reação ainda usada como padrão e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é reação de AM.

Assim, o objetivo desse trabalho foi isolar antígenos a partir de leptospira, cultivadas em meio complexo ou sintético, por extração com álcool metílico para o diagnóstico das leptospiroses pela RFC. Posteriormente, tentar a purificação, bem como estudar as propriedades e composição química do antígeno metílico preparado a partir de leptospiras cultivadas em meio sintético. Esses estudos tem como finalidade tentar simplificar o diagnóstico das leptospiroses, pelo uso de um antígeno estável, que possa ser utilizado pelos laboratórios de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

## I. Leptospiras usadas

As amostras de leptospiras usadas no presente trabalho estão relacionadas no Quadro I. Foram fornecidas pelo Dr. Carlos A. Santa Rosa da USP, e pelo Dr. Elvio C. Moreira da UFMG.

## QUADRO I

SOROTIPO	CEPA DE REFERÊNCIA
1. <u>icterohaemorrhagiae</u>	RGa
2. <u>javanica</u>	Veldrat Batavia 46
3. <u>canicola</u>	Hond Utrecht IV
4. <u>pyrogenis</u>	Salinem
5. <u>butembo</u>	Butembo
6. <u>autumnalis</u>	Akiyami A
7. <u>pomona</u>	Pomona
8. <u>grippotyphosa</u>	Moskva V
9. <u>wolfii</u>	3705
10. <u>tarassovi</u>	Perepelicin
11. <u>patoc</u>	Patoc I
12. <u>brasiliensis</u>	LT 966
13. <u>andamana</u>	CH 11
14. <u>sejroe</u>	M 84
15. <u>sentot</u>	Sentot
16. <u>ballum</u>	MUS 127
17. <u>panama</u>	CZ 214 K

Todos os sorotipos de leptospiras foram mantidos em meio semi-sólido de FLETCHER (1928) (Difco Lab., USA) com sub-cultivos mensais. Do meio de Fletcher foram transferidas para o meio de STUART (1946) (Difco Lab., USA), com repiques a cada sete dias por três vezes no mínimo, sendo então usadas como antígenos para as reações de AM ou transferidas para meio quimicamente definido de SHENBERG (1967) e repicadas cada três dias por quatro vezes. Essas leptospiras cultivadas tanto no meio de Stuart como no de Shenberg foram utilizadas como inóculo para obtenção de massa de células para preparação dos antígenos usados na RFC.

## II. Preparação de antígenos

### II.I. - Para a reação de soroaglutinação microscópica (AM)

Antígenos vivos para a reação de AM foram preparados a partir de 17 sorotipos (Quadro I) de leptospiras, como indicado pela WHO (1967).

## II.11. - Para as reações de fixação de complemento(RFC)

Para as RFC dois diferentes tipos de antígenos foram usados:

- Tipo I. Obtidos a partir dos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc.

A obtenção de massa de leptospiras para preparação desse antígeno foi feita em frascos de erlenmeyers ou balões contendo 1/3 da sua capacidade de meio de Stuart inoculados com cultura de leptospiras na proporção de 1:10 e incubados a 28 - 30°C durante 8 - 10 dias. Após esse período as culturas eram centrifugadas por fluxo contínuo a 10.800 g a 4°C e o sedimento lavado com solução de cloreto de sódio 0,15M por três vezes e liofilizado. Um grama de leptospiras liofilizado foi ressuspenso em 100 ml de álcool metílico e submetido ao ultra-som (Sonifier Cell Disruptor, Model W 185 - Heat Systems - Ultrasonics, Inc.) (9.400 ciclos/segundo) durante 15 min. O controle de desintegração das células foi feito em microscopia de campo escuro. As preparações permaneceram a 25°C durante 8-10 dias ao abrigo da luz. Após esse período foram centrifugadas a 2.500 g durante 15 min e os sobrenadantes foram denominados de antígenos metílicos do tipo I.

- Tipo II. Obtido a partir do sorotipo canicola. A metodologia utilizada tanto para a obtenção de

massa de leptospiras como para a preparação desse antígeno foi semelhante à utilizada para o antígeno do tipo I, com as seguintes modificações: a) para a obtenção de massa de leptospiras essas foram cultivadas em meio quimicamente definido de Shenberg; b) para a preparação desse antígeno utilizaram-se leptospiras íntegras. O antígeno obtido por esse processo de preparação foi denominado antígeno metílico do tipo II.

### III. Purificação do antígeno do tipo II do sorotipo canicola

O antígeno do tipo II foi dialisado contra água destilada e o sedimento obtido foi redissolvido em álcool metílico (antígeno do tipo IIb) ou em tampão barbital (antígeno do tipo IIa).

A tentativa de purificação do antígeno do tipo IIb foi realizada por dois processos. No primeiro adicionou-se gota a gota, com agitação, a um volume do antígeno do tipo IIb, um volume de acetona. No segundo processo, a um volume do antígeno IIb acrescentou-se gota a gota, com agitação, um volume de acetona e dois volumes de clorofórmio. Estes volumes, via de regra, variaram entre 1 a 5 ml, na dependência da quantidade

de antígeno que se queria purificar. Os materiais as sim preparados foram deixados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante três h com agitação ocasional. Em seguida, os precipitados foram separados por centrifugação a 4.500 g durante 30 minutos e redissolvidos em álcool metílico para o volume original constituindo os antígenos do tipo IIc e IID. Determinou-se posteriormente os teores de polissacárides e proteínas e a atividade fixadora de complemento frente a anti-soros homólogos e heterólogos.

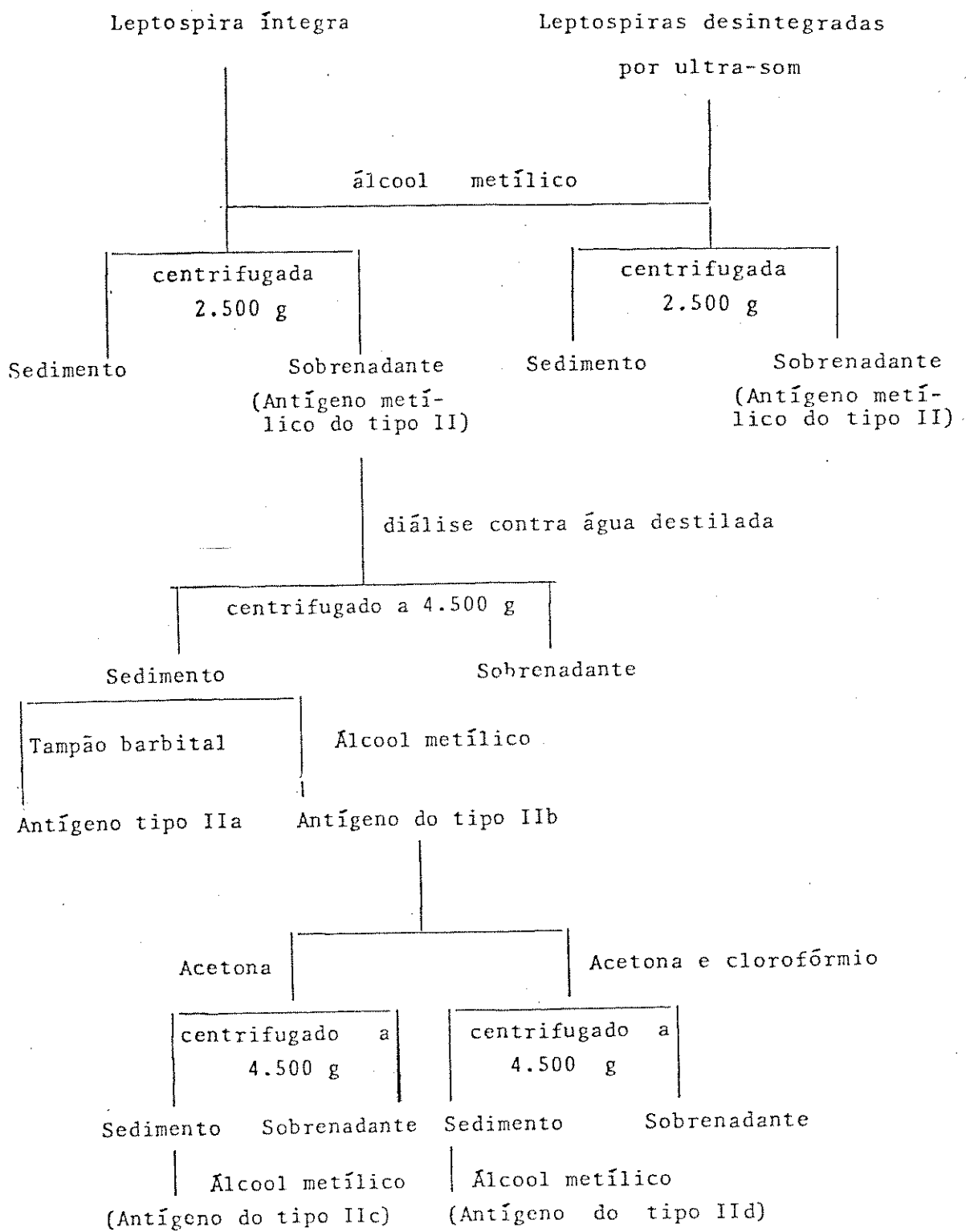
O esquema para obtenção e purificação par cial dos antígenos de leptospiras está apresentado no Quadro II.

#### IV. Soros

##### IV.I. - Soros imunes obtidos em coelhos

Soros anti-leptospiras dos sorotipos ictero-haemorrhagiae, canicola e patoc foram obtidos inoculando-se coelhos adultos, albinos, normais, por via en dovenosa, na veia marginal com dose de 1 ml de cultura de sete dias em meio de Shenberg de leptospiras vivas ou mortas pelo formol (concentração final de 0,3%). As inoculações foram feitas em dias alternados, durante 30

QUADRO II - Esquema para obtenção e purificação parcial dos antígenos de leptospiaras





dias, sendo que após esse período os animais foram san-  
grados e o título dos soros determinado pela reação de  
AM.

Soros de coelhos imunizados com antígeno  
do tipo IIa, do sorotipo canicola, foram obtidos pela  
inoculação deste antígeno contendo 0,2 mg/ml de polis-  
sacáride, em três coelhos adultos, albinos, por via in-  
tradérmica em diferentes pontos da pele. Outros três a-  
nimais foram injetados de modo semelhante, só que o an-  
tígeno foi misturado a igual quantidade de adjuvante  
completo de Freund.

Após 30 dias uma sangria de prova era rea-  
lizada e o título de anticorpo verificado pela RFC. Os  
animais que não apresentavam anticorpos receberam uma  
dose adicional de 100  $\mu$ g/ml de polissacáride do antíge-  
no em igual volume de adjuvante completo de Freund. A  
pós 15 dias nova sangria era feita e os soros examina-  
dos para a presença de anticorpos fixadores de comple-  
mento ou aglutinantes.

Soros de coelhos imunizados com antígeno  
do tipo IIc, do sorotipo canicola, ligado a BSA, foram  
obtidos adicionando-se ao antígeno do tipo IIc contem-  
do 1 mg/ml de polissacáride, 0,3 ml de glutaraldeído  
2,5% com agitação. Após 1 a 2 min 20 mg/ml de BSA (Pen-  
tex) foram acrescentados e a preparação deixada a 25°C  
durante 2h. Acrescentou-se em seguida 1 ml de glicina

1M, AVRAMEAS & TERNYNCK (1969). Esse material foi misturado em adjuvante completo de Freund, e inoculado em dois coelhos por via intradérmica, no dorso, em mais ou menos 50 pontos. Após 30 dias os animais receberam uma dose adicional desse material. Os coelhos foram sangrados após 15 dias e os soros examinados para a presença de anticorpos precipitantes e fixadores de complemento.

#### IV.II - Soros humanos

Foram usados 167 soros de indivíduos normais sendo que 100 foram obtidos de doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e 67 de soldados da Base Aérea de Belo Horizonte. Foram ainda examinados quarenta soros de pacientes com outras doenças infecciosas, sendo que dez soros foram obtidos de pacientes chagásicos, dez de leprosos, dez de sífilíticos e dez de pacientes com hepatite. Esses soros foram obtidos do Laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG. Para cada grupo de soros o diagnóstico destas doenças foi confirmado pela demonstração do agente etiológico ou por testes sorológicos.

Finalmente soros de 140 pacientes suspeitos de leptospiroses foram coletados durante a epidemia de

leptospirose que ocorreu em Recife (1975), quando da enchente do Rio Capibaribe.

#### V. Tratamento do antígeno do tipo IIa com pepsina ou pronase.

A atividade enzimática da pepsina (Worthington Biochemical Co.) e da pronase (Sigma Chemical Co.) foi realizada seguindo-se a técnica de ANSON (1939) utilizando-se como substrato a hemoglobina e caseína respectivamente.

Ao antígeno do tipo IIa, contendo 100mg/ml de proteína, acrescentou-se 1 mg das enzimas pepsina ou pronase.

As preparações foram incubadas a 37°C por 18 horas e a 56°C por uma hora. Em seguida foram dialisadas contra água destilada a 4°C por 24 horas e então centrifugadas. O sedimento foi reconstituído ao volume original com água destilada e a atividade do material examinada pela RFC.

## VI. Testes de solubilidade

Testes de solubilidade dos antígenos metálicos do tipo II e IIa foram realizados empregando-se água destilada, solventes orgânicos como clorofórmio, acetona, isopropanol, SDS e triton X 100. Esses testes foram feitos em tubos de ensaio contendo o antígeno do tipo II ou IIa para o qual se acrescentava igual volume dos diferentes solventes gota a gota, com agitação, à temperatura de 25°C.

## VII. Reações sorológicas

### VII.I. - Reação de soroaglutinação microscópica

A reação de AM foi realizada segundo as recomendações do Comitê da WHO (1967). Aliquotas de 0,2 ml dos diferentes soros diluídos a 1:100 em salina fisiológica eram misturadas com igual quantidade de cada antígeno e incubadas a 28°C por 3h. Para a leitura, uma gota de cada tubo era colocada sobre uma lâmina e examinada em microscópio de campo escuro.

A reação foi considerada positiva quando 50% das leptospiras estavam aglutinadas em relação ao controle negativo. Os soros que apresentavam reações positivas eram titulados utilizando-se diluições sucessivas em razão de 2.

#### VII.II. - Reação de fixação de complemento

A RFC foi feita de acordo com a técnica de MAYER et alii (1948) e as seguintes quantidades foram usadas: 0,25 ml da dose ótima dos antígenos determinada pela titulação em bloco, 0,25 ml de soro, 0,5 ml de complemento de cobaia contendo 5 CH50 e 1,0 ml de tampão barbital isotônico contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$  e íons  $\text{Mg}^{2+}$  e 1% de gelatina.

As misturas foram incubadas em banho-maria, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 45 min, acrescentando-se em seguida, 0,5ml de hemácias sensibilizadas. Após nova incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, os materiais foram centrifugados e a densidade ótica dos sobrenadantes lidas a 550 nm.

### VII.III. - Reação de imunodifusão em gel

Os antígenos dos tipo I, II, IIa, IIc e IID foram submetidos à imunodifusão em gel de agarose frente a soros de coelhos antisorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc, segundo as recomendações de OUCHTERLONY (1967).

### VIII. Eletroforese em gel de agarose

Volumes de 20  $\mu$ l de antígeno do tipo IIa e de soro humano normal foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão barbital, pH 8.6, força iônica 0,02 $\mu$ , com o gel na espessura de 0,15 cm.

A análise eletroforética foi realizada aplicando-se uma diferença de potencial de 6 volts/cm durante 1h. Após eletroforese, a lâmina foi revelada pelo Coomassie blue a 1%, em mistura ácido acético-etanol. Quando se desejou verificar a presença de polissacaríde no material submetido à eletroforese, utilizou-se para revelação das lâminas a coloração pelo P.A.S.

## IX. Estimativa do peso molecular

A estimativa do peso molecular dos antígenos IIC e IID foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida, a 5,6%, contendo SDS 1% de acordo com FAIRBANKS et alii (1971) e os seguintes padrões de referência foram usados:

- BSA (PM = 68.000 daltons), obtida da Pentex Biochemicals; ribonuclease (PM = 13.700 daltons), obtida da Sigma Chemical Co. (USA); IgG humana (PM = 150.000 daltons) com cadeia H (PM = 50.000 daltons) e cadeia L (PM = 25.000 daltons).

Os antígenos na concentração de 5 mg/ml de polissacáride foram aplicados à coluna dos géis e submetidos à eletroforese (3 mA/tubo) até que a marcação da pironina atingisse 1cm da base.

Os géis foram retirados dos tubos, fixados e revelados para polissacáride pela reação de PAS e para proteína usando Coomassie blue.

## X. Cromatografia de exclusão

A cromatografia de exclusão em gel do antígeno do tipo IIa foi feita numa coluna de dimensão (100 x 1 cm) contendo Sephacex G-200, equilibrada com solução de cloreto de sódio 0,15M a 25°C.

O material foi eluído com essa solução numa velocidade de 4 gotas por min e amostras de 1,8 ml foram coletadas. Absorbância dessas amostras era medida a  $\lambda = 280$  nm em espectrofotometro Zeiss, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Os eluatos foram reunidos, concentrados e dosados para polissacáride, proteína e atividade fixadora de complemento.

## XI. Análise química

A determinação do peso seco, do antígeno do tipo IIc foi feita da seguinte maneira:

Um ml do antígeno do tipo II dialisado e ressuspenso em álcool metílico foi colocado em vários tubos, com peso conhecido, e 1 ml de acetona foi acrescentado, em cada tubo, gota a gota, com agitação cons



tante. Os tubos foram deixados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 3 h e em seguida centrifugados durante 15 min a 4.500 g. Os precipitados obtidos foram deixados a  $37^{\circ}\text{C}$  ou a  $100^{\circ}\text{C}$  até peso constante, sendo em seguida ressuspensos para o volume original com álcool metílico e dosados para carboidrato, proteína, fósforo e DNA.

A quantidade de carboidrato total foi determinada pelo método fenol -  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , DUBOIS et alii (1956), tendo a glicose como padrão de referência.

Pentose foi determinada pelo método cisteína -  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , DISCHE (1949), tendo a arabinose como padrão de referência.

A determinação de 6-deoxihexose foi feita pelo método de DISCHE & SHETTLES (1948), usando-se a ramnose como padrão de referência.

Hexose foi determinada pelo método de antrona -  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , TREVELYAN & HARRISON (1952), tendo a glicose como padrão de referência.

A determinação de proteína foi realizada pelo método modificado de Lowry, HARTREE (1972), usando-se o soro albumina bovina como padrão.

Ácido desoxiribonucleico foi determinado usando-se o reagente de difenilamina, tendo DNA como padrão com as indicações de KABAT & MAYER (1961). A dosagem de fósforo total foi feita pelo método de FISK & SUBARROW (1925).

### XI.I. - Análise de açucares

A identificação dos açucares do antígeno do tipo IIc foi feita em cromatografia descendente em papel (Whatman nº 1), usando-se o antígeno hidrolisado pelo HCl 2N a 70°C e a 100°C por tempos variáveis (15, 30, 45 min e 1, 2, 3 e 16 h) com os seguintes sistemas de solventes:

- acetado de etila : piridina : água (8:2:1), ou butanol : ácido acético : água destilada(4:1:5), com o tempo de corrida de mais ou menos 15 h.

Como padrão foram usadas soluções a 0,1% de glicose, D(+) galactose, D(-) frutose, D(-) ribose, xilose, D(+) manose e ramnose; todas as drogas adquiridas da Merck (Darmstadt, Germany). Após o tempo de corrida o papel foi seco e os açucares revelados pelo reagente de nitrato de prata, TREVELYAN et alii (1950).

### XI.II. - Análise de aminoácidos e aminoaçucares

A análise de aminoácidos e aminoaçucares do antígeno do tipo IIc foi feita com esse antígeno concentrado, de modo a obter 1 mg/ml de proteína. Este

material foi hidrolisado com HCl 6N em ampôlas seladas, com pressão reduzida a 110°C por 20 e 40 h. A análise quantitativa de aminoácidos e aminoaçucres foi feita de acordo com a técnica de MORRE & STEIN (1963), em analisador automático de aminoácido, modelo 120 C Beckman, do Departamento de Bioquímica da UFMG.

### XI.III. - Análise de lípidos

A determinação de lípidos totais do antígeno do tipo IIc foi feita seguindo-se as recomendações descritas em YANAGAWA & SHINAGAWA (1972). O antígeno foi hidrolisado com HCl 4N a 100°C durante 5 horas e o hidrolisado foi extraído com clorofórmio-metanol(2:1). A fase clorofórmica foi seca e pesada como lípidos.

Para a identificação da composição de ácidos graxos, foram preparados ésteres metílicos de acordo com a técnica de HARTMAN & LAGO (1973). O material foi analisado por cromatografia gasosa (Perkin-Elmer - 990) com detector de ionização de chama (FID) utilizando-se coluna de dietilenoglicolsuccinato (DEGS) à temperatura de 190°C. Os seguintes padrões foram usados : ácido palmítico (C 16:0); ácido esteárico (C 18:0); ácido oleico (C 18:1) e ácido linoleico (C 18:2).

RESULTADOS

Os três sorotipos (icterohaemorrhagiae, canicola e patoc) utilizados no preparo do antígeno do tipo I, quando cultivados em meio complexo, apresentaram bom crescimento. No entanto, quando cultivados em meio sintético de Shenberg, apenas o sorotipo canicola apresentou melhor adaptação a esse meio. Esta adaptação foi verificada observando-se a motilidade das leptospiras.

#### I. Especificidade dos antígenos metílicos do tipo I

A especificidade destes antígenos foi examinada utilizando-se soros de pacientes com leptospiroses, lepra, chagas, sífilis e hepatite e de indivíduos normais selecionados entre doadores de banco de sangue e soldados da base aérea. Para esta finalidade foram empregadas técnicas de RFC e AM. As RFC foram realizadas com antígenos do tipo I dos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc. Considerou-se resultado positivo quando soro diluído a 1:10 era capaz de reagir com pelo menos um dos três antígenos do tipo I.

As reações de AM foram feitas empregando-se os 17 sorotipos de leptospiras. Os soros obtidos de pacientes com leptospiroses apresentaram reações posi

tivas para pelo menos um dos sorotipos. Os soros de indivíduos normais ou de pacientes com lepra, chagas, sífilis e hepatite não foram capazes de reagir com os 17 sorotipos empregados.

Os resultados apresentados na Tabela I mostram que reações de fixação de complemento positivas foram obtidas em 87,5% dos pacientes com leptospiroses. Nenhuma reação foi observada com soros de indivíduos normais ou de pacientes com outras doenças infecciosas.

Uma vez determinada a especificidade dos antígenos do tipo I, soros de 100 pacientes suspeitos de leptospiroses foram examinados pela AM utilizando-se os 17 sorotipos de leptospiras e pela RFC com os antígenos obtidos dos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc. Considerou-se como soro positivo aquele que apresentou reação positiva com pelo menos um dos sorotipos testados. Dos 100 soros examinados de pacientes suspeitos de leptospirose, 51 apresentaram reações de AM e/ou RFC positivas e 49 foram negativos para ambas as reações. Os dados apresentados na Tabela II mostram que dos 51 soros positivos nas reações de AM ou RFC, 35 apresentaram RFC e reações de AM positivas, 5 soros apresentaram reações de AM positivas e RFC negativas e os 11 soros restantes resultado inverso (RFC positivas e reações de AM negativas). Esses dados mos

Tabela I - Especificidade das reações de fixação de complemento com antígenos do tipo I dos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc.

SOROS DE	NÚMERO DE SOROS TESTADOS	NÚMERO DE REAÇÕES POSITIVAS
PACIENTES COM		
a) Leptospiroses	40	35
b) Hepatite	10	0
c) Sífilis	10	0
d) Lepra	10	0
e) Chagas	10	0
Indivíduos normais	167	0

tram que os resultados obtidos pelas RFC e reações de AM concordam em 84% dos casos examinados. Em 40 soros examinados, diagnóstico de leptospiroses foi estabelecido observando-se reações de AM positiva com pelo menos um dos 17 sorotipos testados. Reações de AM positiva para os sorotipos (icterohaemorrhagiae, canicola ou patoc) utilizados na extração do antígeno para RFC foram encontrados em 21 soros que também apresentaram RFC positivas. Análise dos dados obtida com antígenos individuais mostram que 21 soros reagiram com os três antígenos com título médio 1:160 - 1:320. Reações positivas para apenas dois antígenos (patoc e icterohaemorrhagiae) foram observadas em sete casos com título médio de 1:80 - 1:160 e reações para apenas um antígeno foram observadas em 18 casos (13 com patoc, 3 com icterohaemorrhagiae e 2 com canicola) com título médio de 1:40 - 1:80) (Tabela II).

Quando os antígenos do tipo I foram testados com soros de coelhos anti-sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc, observaram-se reações de precipitação e fixação de complemento positivas somente quando era usado o sistema antígeno anticorpo homólogo.



Tabela 11 - Comparação dos resultados obtidos pelas reações de AM e RFC realizada com soro de pacientes suspeitos de leptospiroses

SROS DE PACIENTES (N°)	RFC			REAÇÕES DE AM																
	PATO	ICTERUWENBUAGIA	CANICOLA	PATO	ICTERUWENBUAGIA	CANICOLA	SENTOT	ANDAMANA	AUTUMALIS	BUTERO	SEJROE	NOLFFI	ROLLUM	JAVANICA	CRIPTOHYPHOSA	PYROGENIS	FONONA	TARASSOVI	BRASILIENSIS	PANAMA
1	160	320	320	200	200	200	200	0	200	0	200	0	200	200	0	200	0	0	0	0
7	80	160	640	200	200	0	200	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0
10	160	640	640	200	200	200	200	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	320	80	1280	0	200	0	800	0	0	0	0	200	200	0	200	0	0	0	0	0
42	160	160	80	200	0	0	400	200	0	800	0	200	200	0	0	0	0	0	0	0
46	160	640	1280	0	0	0	200	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	20	80	640	0	0	200	800	0	400	200	200	200	200	200	0	0	0	0	0	0
64	40	160	1280	0	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	10	80	1280	0	0	3200	3200	800	0	0	0	0	200	400	0	6400	0	0	0	0
78	1280	1280	1280	200	200	0	200	0	200	0	0	0	200	0	200	0	0	0	0	0
83	160	320	640	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0
151	320	320	1280	200	200	0	0	0	0	800	200	200	200	0	0	0	0	0	0	0
155	640	640	1280	0	200	400	200	0	200	800	200	1600	200	1600	0	0	0	0	0	0
215	160	640	1280	0	0	0	200	0	0	1600	200	200	200	0	0	0	0	0	0	0
400	160	1280	1280	0	6400	0	12800	0	6400	200	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0
33	40	160	320	0	200	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	20	40	320	0	0	200	0	0	200	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0
21	40	320	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	80	160	0	0	0	0	0	0	0	0	3200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	80	640	0	0	800	0	0	200	0	200	200	0	1600	0	0	0	200	0	0	0
27	160	40	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	80	260	0	0	0	200	200	0	0	0	0	200	200	0	200	0	0	0	0	0
312	640	80	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0
17F	40	0	0	0	0	200	0	0	0	200	0	200	200	0	0	0	0	0	0	0
20F	80	0	0	0	0	0	6400	0	3200	0	200	0	200	0	0	0	200	0	0	0
61	40	0	0	0	0	0	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	20	0	0	0	0	0	200	0	0	200	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0
256	160	0	0	0	200	0	0	0	200	0	800	0	200	200	0	200	200	0	0	0
291	320	0	0	0	0	0	0	200	0	400	0	0	1600	200	0	0	200	0	0	0
60	0	20	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0
76	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	200	0	0	0	0	0	0	0
26	0	20	0	0	0	0	1600	0	0	800	200	200	400	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	320	0	0	0	200	0	0	0	200	0	0	0	200	0	0	0	0	0
75	0	0	160	200	0	0	0	0	0	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0
5	160	320	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	40	640	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	320	160	1280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	80	80	320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	200	0	200	0	0	200	200	0	200	0	0	0	200	0	0	0
37	0	0	0	0	200	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	200	0	200	0	0	0	0	0	200	200	0	0	0	0	0	0
218	0	0	0	0	200	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
294	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	200	0	200	0	0	0	400	0	0	0

## II. Especificidade e propriedades do antígeno do tipo II do sorotipo canicola

A especificidade do antígeno do tipo II foi estudada pelas RFC com os soros obtidos de pacientes com leptospiroses e com outras doenças infecciosas. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados para o antígeno do tipo I frente aos mesmos soros (Tabela I e II).

As reações de imunodifusão realizadas com os antígenos do tipo I e tipo II ou IIb, IIc ou IID, do sorotipo canicola, usando-se soro de coelho anti canicola, mostraram um padrão de identidade. Os antígenos do tipo I obtidos dos sorotipos icterohaemorrhagiae e patoc não foram capazes de reagir com o soro anti-canicola.

A diálise contra água destilada do antígeno do tipo II levou à formação de um precipitado que mostrou-se insolúvel em acetona e em clorofórmio, mas completamente solúvel em álcool metílico, isopropanol, SDS 1% e triton X 100 a 1%.

Quando se fez a reação de imunodifusão em gel de agarose, contendo 1% de SDS, ou 1% de triton X 100 (0,01 a 1%), frente a anti-soros homólogos e heterólogos, verificou-se que, com o antígeno do tipo IIa tratado com

SDS ou álcool metílico, ocorreu maior difusão. Com o antígeno tratado com triton X 100 observou-se precipitação inespecífica.

Os testes realizados com RFC mostraram que o antígeno tratado com triton X 100 apresentou-se anticomplementar.

Nenhuma alteração da antigenicidade foi observada nas RFC e imunodifusão, usando-se soro de coelho anti-canicola, quando o antígeno do tipo IIa e IIb foi aquecido a 100°C por 30 min; 56°C por 1 hora ou a 37°C durante 24 horas. Também não se observou alteração de antigenicidade quando o antígeno do tipo IIa foi tratado com HCl, 0,1N, durante 18 h a 37°C, ou com as enzimas pepsina 1% ou pronase 1%. Entretanto, completa perda de antigenicidade foi observada quando a susensão aquosa foi tratada com ácido periódico, 0,01N, durante 1 h a 25°C.

Verificou-se que os soros de coelhos imunizados com os antígenos do tipo IIa misturado ou não com adjuvante completo de Freund ou com o antígeno do tipo IIc complexado com soro albumina não apresentaram anticorpos fixadores de complemento ou precipitantes.

### III. Purificação

Tentativas de purificação do antígeno do tipo II foram feitas com base nas propriedades de solubilidade. O antígeno do tipo IIb foi precipitado com acetona ou acetona e clorofórmio e solubilizado em álcool metílico.

Os materiais obtidos após os processos de purificação foram examinados segundo a sua atividade frente a soros de coelhos anti-sorotipo canicola, obtido pela inoculação de leptospira íntegra, pela técnica de fixação de complemento. A atividade específica do antígeno foi determinada pela relação entre o número de unidades fixadores de complemento e o conteúdo de polissacáride:

$$\left( \frac{\text{UFC}}{\text{mg de polissacáride}} \right)$$

Uma unidade fixadora de complemento do antígeno foi considerada como aquela quantidade capaz de dar 50% de lise no sistema contendo 5 CH50 e um soro de coelho anti-sorotipo canicola diluído a 1:40, tomado como padrão.

Os dados obtidos pelos dois processos de

purificação acham-se resumidos na Tabela III, onde se verifica que qualquer deles levou a uma purificação similar, aumentando a atividade específica do antígeno, cerca de 1,6 - 1,7 vezes.

A cromatografia em Sephadex G-200 do antígeno do tipo IIa apresentou somente um pico. O material eluído foi obtido no volume de exclusão da coluna, determinado pelo corante dextran blue.

Nas experiências para estimativa do peso molecular, em gel de poliacrilamida 5,6%, contendo SDS 1%, os antígenos do tipo IIc, IID apresentaram apenas um único componente PAS positivo, e que reagia fracamente com Coomassie blue, com  $R_m = 0,60$ . O peso molecular estimado, tendo em vista os padrões utilizados, foi de 38.000 daltons (Figura nº 1).

Os resultados obtidos na reação de imunodifusão em gel de agarose com os antígenos do tipo IIc e IID, utilizando-se a técnica de Ouchterlony, frente a soros de coelhos anti-sorotipos canicola, icterohaemorrhagiae ou patoc mostraram somente um sistema precipitante com o sorotipo homólogo.

Tabela III - Purificação parcial do antígeno do tipo II

ANTÍGENOS	POLISSACÁRIDE	RELAÇÃO POLIS SACÁRIDE/PRO- TEÍNA	ATIVIDADE ESPECÍFICA UFC/ mg DE POLISSACÁRIDE	FATOR DE PURIFICAÇÃO
Tipo IIb	1,10	5,0	4.000	1
Tipo IIc	1,10	9,2	6.900	1,7
Tipo IId	0,97	9,7	6.500	1,6

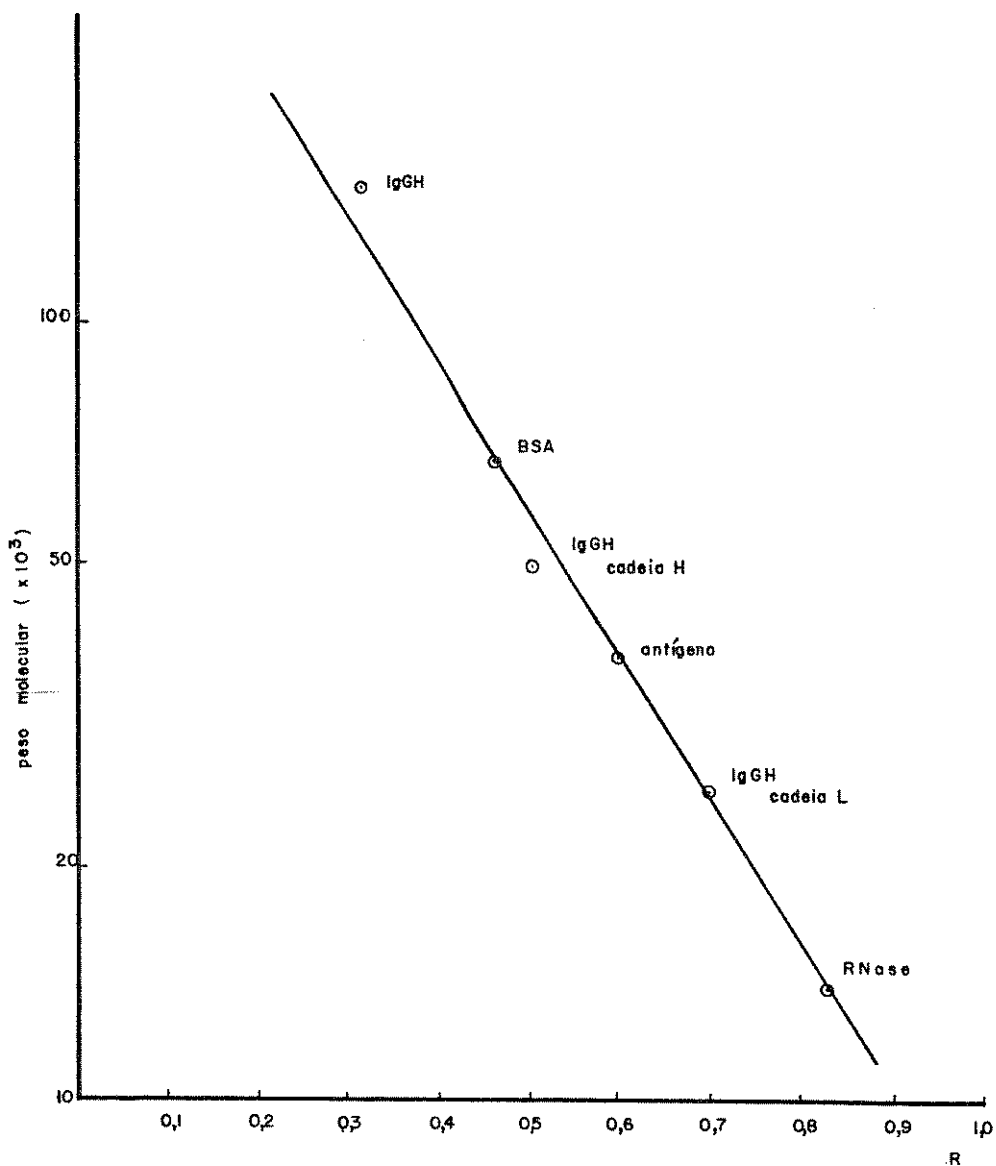


Figura nº 1 - Estimativa do PM dos antígenos em gel de poliacrilamida com SDS 1% e DTT. Representação gráfica da relação entre mobilidade relativa e o logaritmo do peso molecular das diferentes moléculas analisadas.

#### IV. Composição química do antígeno do tipo IIc

Os resultados obtidos na análise química do antígeno do tipo IIc estão na Tabela IV-

Análise de açúcares do antígeno submetido à hidrólise com HCl 2N indicou a presença de glicose, xilose, arabinose, manose e ramnose.

Análises de aminoácidos e aminoaçúcares do antígeno do tipo IIc submetido à hidrólise com HCl 6N a 100°C, durante 20 ou 40 h, estão apresentadas na Tabela V. Como pode ser observado, lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e glicina foram encontrados em maior concentração, sendo que outros aminoácidos somente foram encontrados em baixa concentração.

Análise em cromatografia gasosa indicou a presença dos seguintes ácidos graxos: láurico (C 12:0); mirístico (C 14:0); palmítico (C 16:0); palmitoleico (C 16:1); esteárico (C 18:0); oleico (C 18:1) e linoleico (C 18:2).



Tabela IV - Composição química do antígeno do tipo II<sub>c</sub>

COMPONENTES	PORCENTAGEM
Carboidratos	40
Pentose	25
Metilpentose	22
Hexose	28
Proteína	4,0
Lípides	20,0
Fósforo	2,7
DNA	0

Tabela V - Composição de aminoácidos e aminoaçucares do antígeno do tipo II c.

AMINOÁCIDOS E AMINOAÇUCARES	ANTÍGENO HIDROLI		Nº INTEIRO MAIS PRÓXIMO*
	SADO POR 20 μ moles	hs SADO POR 40 μ moles	
Lisina	0,309	0,114	6
Histidina	0,012	0,009	-
Arginina	0,033	0,030	-
Ác. Aspártico	0,525	0,480	10
Treonina	0,015	0,015	-
Serina	0,051	0,045	1
Ác. Glutâmico	0,165	0,153	3
Prolina	0,015	0,015	-
Glicina	0,102	0,129	2
Alanina	0,066	0,069	1
Valina	0,036	0,030	-
Isoleucina	0,018	0,018	-
Leucina	0,024	0,021	-
Glicosamina	1,365	0,426	26
Galactosamina	0	0	-

\* Considerando a concentração de serina como unidade.

DISCUSSÃO

Para as RFC vários tipos de antígeno foram preparados por diferentes metodologias. Análise dos dados da literatura mostram que as experiências com esses antígenos foram limitadas pelo uso de pequeno número de soros de pacientes com leptospiroses ou foram examinados somente com soros de coelhos anti-leptospiroses. Assim, a questão da possibilidade do uso de antígenos para o diagnóstico das leptospiroses, pela RFC, continua em aberto.

Os extratos metélicos de diferentes microrganismos têm se mostrado úteis para o diagnóstico de algumas doenças infecciosas, como calazar, CISALPINO et alii (1958 , 1962) e MAYRINK (1961), blastomicose sulamericana, CISALPINO et alii (1964) e cromomicose, OLIVEIRA (1966, 1969). Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que as leptospiroses possam ser acrescentadas a essa lista.

Os resultados obtidos com os antígenos do tipo I dos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc mostraram que esse antígeno é específico para o diagnóstico das leptospiroses, sendo capazes de diagnosticar 87,5% dos casos de leptospiroses (Tabela I).

A comparação dos resultados obtidos nas RFC usando-se apenas três antígenos do tipo I, dos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola e patoc, com as reações de AM, usando-se 17 sorotipos com 100 soros de pacientes suspeitos de leptospiroses, mostrou um alto

grau de concordância (84%) (Tabela II). Quando se comparou os antígenos do tipo I isoladamente, verificou-se que as RFC detectaram maior número de casos que os correspondentes antígenos nas reações de AM.

Dentre os antígenos do tipo I utilizados, o do sorotipo patoc detectou maior número de casos, o que pode estar relacionado com a sua constituição antigênica, que é capaz de dar maior número de reações cruzadas com sorotipos patogênicos.

Resultados discrepantes foram observados em 16% dos casos examinados (Tabela II). Dentre estes, 5% apresentaram reações negativas na RFC e positivas nas reações de AM e nos 11% dos casos restantes o resultado foi inverso. É possível que essas discrepâncias sejam apenas aparentes. TURNER (1968) demonstrou o aparecimento de anticorpos fixadores de complemento antes dos anticorpos aglutinantes, no início da doença, e sugeriu que esses persistam por mais tempo que os anticorpos fixadores de complemento. Assim, os 11% dos casos (com RFC positivas e reações de AM negativas) poderiam estar relacionadas com o início da doença, e os 5% (RFC negativas e reações de AM positivas) com a fase final. No entanto, esses dados representam um "flash" sorológico da população num determinado período, não se sabendo se se encontravam no início ou no final da infecção.

O conjunto dos dados em relação às RFC com soros de pacientes com leptospiroses sugerem que os antígenos são capazes de reagir com anticorpos para sorotipos homólogos e heterólogos, mostrando, portanto, uma ampla especificidade (Tabela II). Esses resultados estão de acordo com os descritos por RANDALL et alii (1949) e YAGER et alii (1951) que usaram como antígeno suspensão de leptospiras sonicadas em salina fisiológica; por MURASCHI et alii (1956), que prepararam antígeno de leptospiras extraído com etilenoglicol e por ROTHSTEIN & WOLMAN (1959), que usaram extrato etílico de leptospiras como antígeno.

Os antígenos dos tipos I e II mostraram, entretanto, ser tipo específico com soros de coelhos anti-leptospiras. Resultados semelhantes foram encontrados por KASAI & YANAGAWA (1974), SHINAGAWA & YANAGAWA (1972), LABZOFFSKY & KELEN (1960), PIKE et alii (1953) e EZELL et alii (1952), embora esses autores tenham examinado seus antígenos somente com soros de coelhos; enquanto que MURASCHI et alii (1956), ROTHSTEIN & HIATT (1956) e SCHNEIDER (1954a, 1954b) obtiveram também reações cruzadas com sorotipos heterólogos.

Essas diferenças de resultados encontradas entre soros de coelho anti-leptospiras e soros de pacientes com leptospirose, podem estar relacionadas com a diferença de espécie, em relação à resposta imune e ao sorotipo responsável pela infecção do homem.

Os resultados obtidos com os antígenos dos tipos I e II não mostraram diferenças significativas, do ponto de vista sorológico, com soros de coelhos anti-leptospiras, ou com soros de pacientes com leptospirose. Isto significa que o antígeno pode ser preparado a partir de leptospiras cultivadas em meio quimicamente definido, não sendo necessário romper a célula para extração metélica do antígeno. A análise do antígeno do tipo IIc mostrou a presença de apenas um único componente corável pelo PAS e Coomassie blue.

O antígeno do tipo II mostrou-se pouco solúvel em soluções aquosas, insolúvel em acetona e clorofórmio, mas completamente solúvel em metanol, isopropanol e SDS. Esses fatos sugerem a presença de alta porcentagem de grupos hidrofóbicos, o que foi confirmado pela análise do material purificado que mostrou 20% de lípidos na sua composição química.

Como o antígeno do tipo II apresentou forte tendência à agregação em soluções aquosas, era esperado que não migrasse na eletroforese em gel de agarose, bem como a não separação do material quando cromatografado em Sephadex G-200.

Os antígenos do tipo IIa e IIc mostraram-se não imunogênicos quando inoculados em coelhos; e isto provavelmente se deva à sua estrutura química.

O antígeno do tipo II parece ser constituído de um complexo de lipopeptidofosfoglican de PM = 38.000 . Resíduos polissacarídicos dessa molécula parecem desempenhar importante papel na antigenicidade, pelo fato de que essa antigenicidade não foi alterada pelo tratamento do antígeno com as enzimas pepsina ou pronase, mas totalmente perdida pelo tratamento com ácido periódico. O antígeno do tipo II apresenta uma composição química semelhante às endotoxinas de bactérias Gram negativas, LUDERITZ et alii (1966), e o lipopeptidofosfoglican isolado de T. cruzi, LEDERKREMER et alii (1977). Composição química semelhante foi encontrada no antígeno do tipo específico de leptospira da cepa Kyoto, preparada por SHINAGAWA & YANAGAWA (1972). Embora outros autores como SCHNEIDER (1954a, 1954b) e ROTHSTEIN & HIATT (1956) não tenham pesquisado a presença de lípidos nos antígenos por eles preparados com outros sorotipos de leptospira, encontraram também hexose, pentose e 6-deoxihexose, proteína e fósforo, enquanto que SCHRICKER & HANSON (1963) mostraram a presença de carboidrato e proteína nos antígenos de L. pomona, mas não revelaram o conteúdo de lípido e fósforo. KASAI & YANAGAWA (1974) encontraram carboidrato, lípido e proteína, mas não revelaram a presença de fósforo no antígeno tipo específico do sorotipo canicola. A composição química dos antígenos descritos pelos diferentes autores apresentou-se variável em relação ao so



rotipo de leptospira usado. Essas variações poderiam estar relacionadas com diferentes metodologias usadas na preparação dos antígenos ou com técnicas de dosagens usadas para determinação dos componentes químicos.

O antígeno do tipo IIC por nós isolado a apresentou 40% de carboidrato e os seguintes açúcares foram identificados: glicose, galactose, xilose, arabinose, manose e ramnose. Esses resultados estão relacionados com os de PARNAS et alii (1968) e KASAI & YANAGAWA (1974), com execução de manose e glicose, que não foram encontradas no antígeno preparado a partir do sorotipo canicola por KASAI & YANAGAWA (1974).

O antígeno do tipo IIC parece apresentar u ma proporção de aminoácidos compatível com um peptídeo de PM = 1.520. Contudo, foram encontrados vários resíduos de diferentes aminoácidos, mas se considerarmos a penas os que apresentam maior concentração, o peptídeo teria a seguinte fórmula: 10 ácido aspártico : 6 lisina : 3 ácido glutâmico : 2 glicina : 1 serina : 1 alanina. Entretanto, a presença de outros aminoácidos, além desses, indica que o material contém mistura ou concentrações de diferentes peptídeos.

Os resultados da composição qualitativa de aminoácidos do antígeno do tipo IIC apresentaram certa correlação com os do antígeno tipo específico do sorotipo canicola, KASAI & YANAGAWA (1974), com exceção dos

aminoácidos fenilalanina, tirosina e metionina, que não foram observados no antígeno do tipo II.

O conjunto de dados obtidos mostrou que é possível obter antígeno de leptospiras pela extração com álcool metílico que apresentou um alto grau de especificidade e portanto, útil para o diagnóstico das leptospiroses pela RFC. O antígeno do tipo II, preparado a partir de leptospiras cultivadas em meio sintético, foi obtido numa forma relativamente pura. A análise química desse antígeno revelou a presença de carboidrato, lípidos, proteína e fósforo. Quando esse antígeno foi comparado com o antígeno do tipo I, pelas RFC frente a diferentes soros, obtiveram-se resultados semelhantes, em relação à especificidade e à sensibilidade. Na reação de imunodifusão foi observado um padrão de identidade. No entanto, experiências com soros de pacientes com outras doenças infecciosas devem ser testadas para que se possa comprovar a especificidade dos antígenos metílicos do tipo I ou II.

RESUMO E CONCLUSÕES

Pelo tratamento de leptospiras desintegradas por ultra som ou íntegras com álcool metílico foi possível isolar os antígenos do tipo I e II respectivamente. Esses antígenos, quando examinados com soros de pacientes com outras doenças infecciosas pelas reações de fixação de complemento, mostraram-se específicos para o diagnóstico das leptospiroses.

As reações de aglutinação microscópica e fixação de complemento com os antígenos do tipo I e II concordaram em 84% dos casos suspeitos de leptospiroses. Esses antígenos foram capazes de reagir com anticorpos para os sorotipos homólogos e heterólogos, mostrando, portanto, uma ampla especificidade.

Fez-se uma tentativa de purificação do antígeno do tipo II pela precipitação com acetona (antígeno do tipo IIc) ou acetona e clorofórmio (antígeno do tipo II d). A análise química do antígeno do tipo IIc revelou a presença de carboidrato, proteína, lípide e fósforo.

Na reação de imunodifusão observou-se um padrão de identidade entre os antígenos do tipo I e II.

Assim o diagnóstico das leptospiroses pode ser feito utilizando-se os antígenos do tipo I ou II. Pode-se sugerir o uso de uma mistura dos antígenos do tipo I ou do tipo II para o diagnóstico das leptospiroses, a fim de que se possa obter um aumento da sensibilidade.

4/702/BC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22: 79, 1939.
- AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry*, 6: 53-66, 1969.
- BAKER, L.A. & COX, C.D. Quantitative assay for genus specific leptospiral antigen and antibody. *Appl. Microbiol.*, 35: 697-698, 1973.
- BESSEMANS, A. & NÉLIS, P. Sur la fixation du complement dans la spirochetose ictéro-hémorragique. *C. R. Soc. Biol.* 98: 1234-1236, 1928.
- BOERNER, F. & LUKENS, M. A complement fixation technic for the diagnosis of Weil's disease. *Amer. J. Med. Technol.*, 7(5): 194-201, 1941.
- CHANG, R.S. & McCOMB, D.E. Erythrocyte sensitizing substances from five strains of leptospirae. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 3: 481 - 489, 1954.
- CISALPINO, E.O.; BATISTA, S.M. & MAYRINK, W. Estudos de antígeno homólogo em Calazar. *Rev. Assoc. Med. Minas Gerais*, 9: 135, 1958.
- \_\_\_\_\_, MAYRINK, W. & BATISTA, S.M. Antígeno metílico em Calazar. *Hospital*, 61 (1): 115-160, 1962.

- CISALPINO, E.O.; OLIVEIRA, L.G. & CARDOSO, J.P. Expe  
riência com antígeno metílico para o diagnóstico da  
blastomicose sul-americana. Arq. Cent. Est. Odont.  
1 (2): 117 - 121, 1964.
- COX, C.D. Hemolysis of sheep erythrocytes sensitized  
with leptospiral extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. &  
Med., 90: 610-615, 1955.
- \_\_\_\_\_ Standardization and stabilization of an ex-  
tracts from Leptospira biflexa and its use in the  
hemolytic test for leptospirosis. J. Infec. Dis.,  
101: 203-209, 1957.
- \_\_\_\_\_, ALEXANDER, A.D. & MURPHY, L.C. Evaluation of  
the test hemolytic in serodiagnostic of human lep-  
tospirosis. J. Infec. Dis., 101: 210-218, 1957.
- DISCHE, Z. Spectrophotometric method for the determi-  
nation of free pentose and pentose in nucleotides .  
J. Biol. Chem., 181: 379 - 392, 1949.
- \_\_\_\_\_ & SHETTLES, L.B. A specific color reaction of  
methylpentoses and a spectrophotometric micromethod  
for their determination. J. Biol. Chem., 175: 595 -  
603, 1948.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS; P. A.  
& SMITH, F. Colorimetric method for determination  
of sugars and related substances. Anal. Chem., 28  
(3): 350 - 356, 1956.

- EZELL, S.B.; HOAG, W.G.; WARMER, A.R.; YAGER, R.H. & GOEHENOUR, Jr. W.S. Soluble specific leptospiral complement fixing antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80 (29): 220 - 223, 1952.
- FAIRBANKS, G.; STECK, T.L. & WALLACH, D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 10 (13): 2606 - 2617, 1971.
- FISK, C.H. & SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66: 375- , 1925.
- FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis, tsutsu - gamushi disease, and tropical typhus in the Federated Malay States. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 21: 265 - 288, 1928.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Pract , 22 (6): 475 - 476, 1973.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem., 48: 122 - 127, 1972.
- IDO, Y.; ITO, H. & WANI, H. Spirochaeta hebdomadis , the causative organism of seven day fever (nanukayami). J. Exp. Med. 28 (4): 435 - 448, 1918.



- IMAMURA, S.; MATSUI, H. & ASHIZAWA, Y. Studies on indirect hemagglutination test for leptospirosis. Japan J. Exp. Med., 42 (6): 563 - 568, 1972.
- \_\_\_\_\_; MATSUI, H. & ASHIZAWA, Y. Indirect hemagglutination test for the detection of leptospiral antibodies. Japan J. Exp. Med., 44 (2): 191 - 197, 1974.
- INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R. & ITO, H. The etiology mode of infection and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med., 23: 377 - 402, 1916.
- KABAT, E.D. & MAYER, M.M. Experimental immunochemistry. 2nd. ed., CHARLES C. THOMAS, Springfield, Illinois, USA, 1961.
- KASAI, N. & YANAGAWA, R. Studies on the antigenic determination group of the type-specific antigen of leptospira canicola. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., A 228: 533 - 541, 1974.
- LABZOFFSKY, N.A. & KELEN, A.E. Studies on complement fixing antigens of leptospirae. Can. J. Microb., 6: 453 - 462, 1960.
- LEDERKREMER, R.M.; TANAKA, C.T.; ALVES, M.J.M. & COLI, W. Lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi. Eur. J. Biochem. 74: 263 - 267, 1977.

- LUDERITZ, O.; STAUB, A.M. & WESTPHAL, O. Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related enterobacteriaceae. Bact. Rev., 30 (1): 192 - 255, 1966.
- MAILLOUX, M. A propos des séro-diagnostic des leptospiroses. Biol. Med. Paris, 58 (2): 89 - 132, 1969.
- \_\_\_\_\_; Leptospiroses = Zoonoses. Int. J. Zoon., 2 (1): 45 - 54, 1975.
- MAYER, M.M.; OSLER, A.G.; BIER, O.G. & HEILDERBERGER; M. Quantitative studies of complement fixation. I. A method. J. Immunol., 59: 195 - 206, 1948.
- MAYRINK, W. Antígenos homólogos em Calazar. Belo Horizonte, \_\_\_\_\_, 62 p. Tese de livre docência. 1961.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. Chromatographic determination of aminoacids by the use of automatic recording equipment. Meth. Enzymol., 6: 819 - 831, 1963.
- MURASCHI, T.; CLEMONS, O. & TOMPKINS, V. Ethylene glycol extracts of leptospirae in complement fixation tests. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92: 274 - 277, 1956.

- OLIVEIRA, L.G. Métodos imunológicos na cromomicose.  
Belo Horizonte, Fac. Odontologia, 68 p., Tese Doutorado, 1966.
- \_\_\_\_\_ Experiências com antígeno metílico e cromomici  
na no diagnóstico da cromomicose. Arq. Cent. Est.  
Fac. Odont., 6 (2): 253 - 260, 1969.
- OUCHTERLONY, O. Immunodifusion and immunoelectropho-  
resis. In: WEIR, B.M. (eds.) Handbook of Experimen  
tal Immunology, Blackwell Sci. Publ. Oxford. p. 665,  
1967.
- PARNAS, J.; POPLAWSKI, S.; CYBULSKA, M.T. & KSTAZEK, A.  
The sugars, aminosugars and amino acid building  
blocks (chemotypes) and the serotypes of leptospirae.  
Boll. Acad. Pol. Sci., 16(6): 347 - 351, 1968.
- PIKE, R.M.; OWENS, H.B. & BURDETTE, R.I. Complement  
fixation with leptospiral antigens. Proc. Soc. Exp.  
Biol. Med. 84: 552 - 554, 1953.
- RANDALL, R.; WETMORE, P.W. & WARMER Jr., A.R. Sonic -  
vibrated leptospirae as antigens in the complement  
fixation test for the diagnosis of leptospirosis.  
J. Lab. Clin. Med. 34 (10). 1411 - 1415, 1949.
- ROTHSTEIN, N. & HIATT, C.W. Studies of immunochemistry  
of leptospirae. J. Immunol., 77 (4): 257 - 265, 1956.

- ROTHSTEIN, N. & WOLMAN, F. Studies of the immunochemistry of leptospire. J. Infect. Dis., 105: 280 - 287, 1959.
- SCHNEIDER, M.D. Polysaccharide antigens of leptospire. J. Infect. Dis., 94: 297 - 305, 1954a.
- \_\_\_\_\_ Isolation and chemical composition of complement fixing antigens from leptospire. Proc. Soc. Exp. Biol., 85: 32 - 37, 1954b.
- SCHRICKER, R.L. & HANSON, L.E. Precipitating antigens of leptospire. I. Chemical properties and serologic activity of soluble fractions of Leptospira pomona. Amer. J. Vet. Res., 24: 854 - 860, 1963.
- SHENBERG, E. Growth of pathogenic leptospira in chemically defined media. J. Bact., 93: 1598 - 1606, 1967.
- SHINAGAWA, M. & YANAGAWA, R. Isolation and characterization of a leptospiral type - specific antigen. Infect. Immun., 5 (1): 12 - 19, 1972.
- STUART, R.D. The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Pathol. Bact., 58: 343 - 349, 1946.
- SULZER, C.R. & JONES, W.L. Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. Appl. Microbiol., 26 (5): 655 - 657, 1973.

TARASSOFF, S. Sur la découverte de l'agent infectieux de la schlammfieber ou leptospirosis grippotyphosa aquatilis. Ann. Inst. Pasteur, 46: 222 - 227, 1931.

TREVELYAN, W.W. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. Biochem. J., 50: 298 - 303, 1952.

\_\_\_\_\_; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444-445, 1950.

TURNER, L. H. Leptospirosis. II. Serology. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 62: 880 - 899, 1968.

\_\_\_\_\_. Leptospirosis. Brit. Med. J., 1: 231 - 235, 1969.

\_\_\_\_\_. Leptospirosis. Brit. Med. J., 1: 537 - 540, 1973.

WEIL, A. Über eine eigentümliche mit milztumor, icterus, und nephritis einhergehende akute infektion skrankheit. Dtsch. Arch. Klin. Med., 39: 209, 1886.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Current problems in leptospirosis research. Wld. Hlth. Orgn. Tech. Rep. Ser., 380: 5- 25, 1967.

YAGER, R.H.; COWHENOUR, W.S.; WARMER, A.R.; WETMORE, P.  
W. & HALL, H. Complement fixation in diagnosis  
of human leptospirosis. Fed. Proc., 10 (1): 424 -  
425, 1951.