

**VICTOR HUGO SOUSA GONÇALVES**

**PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE  
DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Gustavo Costa Bressan

Coorientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G635p  
2022  
Gonçalves, Victor Hugo Sousa, 1994-  
Prospecção tecnológica e desenvolvimento de estratégias de diagnóstico de leptospirose / Victor Hugo Sousa Gonçalves. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 50-55.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.265>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Leptospira*. 2. Leptospirose em animais. 3. Diagnóstico. 4. Ensaio de imunoabsorção enzimática. I. Bressan, Gustavo Costa, 1983-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 636.089457


**VICTOR HUGO SOUSA GONÇALVES**

**PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE  
DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 15 de julho de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 VICTOR HUGO SOUSA GONCALVES  
Data: 15/05/2023 11:50:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Victor Hugo Sousa Gonçalves  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 GUSTAVO COSTA BRESSAN  
Data: 15/05/2023 15:33:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Gustavo Costa Bressan  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a meus pais, Irineu e Degmar, pois sem seu apoio incondicional em todos os aspectos da vida essa conquista nunca teria sido possível. Agradeço ainda a meus irmãos, Marcus Paulo e Maria Alice, pela força que me deram nos momentos de dificuldade, e pelos momentos felizes que passamos juntos.

Agradeço à Iara, minha companheira, pela amizade, carinho, cuidado e, acima de tudo, pelo amor que tem me dado desde que nos conhecemos, e que foram determinantes para essa vitória.

Aos amigos, sejam eles mais antigos ou aqueles que conheci em Viçosa, por sempre caminharem comigo, me fazendo rir.

Aos integrantes dos Laboratórios de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBB's) e do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), que me acolheram com tanto carinho. Em especial Janine, Flávia e Luana, que estiveram ao meu lado durante o desenvolvimento desse trabalho, sempre dispostas a me passar um pouco do seu conhecimento e me auxiliar nos momentos de dificuldade.

Aos professores que tive durante minha formação, que me ajudaram a perceber como a ciência é extraordinária. E principalmente ao professor Gustavo Costa Bressan, que me aceitou em seu grupo e me possibilitou realizar este e outros trabalhos, dos quais tenho muito orgulho de ter feito parte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço ainda as agências de fomento, CNPq, FAPEMIG, e à FUNARBE, que ajudam a manter nossos laboratórios funcionando. E à Universidade Federal de Viçosa, por esses anos maravilhosos de aprendizado e muita felicidade.

Obrigado!

*“Se eu vi mais longe foi porque estava sobre os ombros de gigantes”*

*(Sir Isaac Newton – 1675)*

## RESUMO

GONÇALVES, Victor Hugo Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Prospecção tecnológica e desenvolvimento de estratégias de diagnóstico de leptospirose.** Orientador: Gustavo Costa Bressan. Coorientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto.

A leptospirose é uma doença infecciosa febril causada por variedades patogênicas do gênero *Leptospira*, e é considerada uma das zoonoses de maior projeção mundial. Os roedores são os principais reservatórios dessas bactérias, mas outros animais silvestres e domésticos, como equinos, bovinos e cães, também participam da sua transmissão, que se dá principalmente através do contato com a urina de indivíduos infectados. Apesar do crescente interesse na área, ainda há uma falta de alternativas acessíveis e eficientes para o diagnóstico de leptospirose em cães. Assim, neste trabalho propomos a utilização de duas proteínas quiméricas como antígenos para o diagnóstico sorológico de leptospirose canina. As proteínas recombinantes foram produzidas em *E. coli*, e recuperadas purificadas com rendimento de 4,467 e 7,957 mg/L. Foi empregado a técnica de ELISA indireto, utilizando ambas as quimeras como antígeno, para detectar anticorpos dos tipos IgG e IgM em amostras de soro. Resultados de MAT das amostras foram utilizados como referência para avaliação da eficiência do diagnóstico por ELISA. Foram avaliadas diferentes condições para o diagnóstico, e a acurácia geral dos ensaios variou de 57 à 80 %, sendo que a capacidade de predição de valores positivos foi de aproximadamente 85 % para IgG e 75 % para IgM. Demonstramos assim que as quimeras construídas apresentam potencial para auxiliar no diagnóstico de leptospirose canina. Além disso, foi construído um *patent landscape* com objetivo de descrever o cenário de desenvolvimento de soluções biotecnológicas para o campo de doenças infecciosas caninas. Esses dados demonstraram a relevante participação das instituições de ensino públicas no desenvolvimento de produtos de biotecnologia, e reforçaram a importância das parcerias público-privadas no avanço científico.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose em animais. Diagnóstico. Ensaio de imunoabsorção enzimática.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Victor Hugo Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022.  
**Technological prospecting and development of diagnostic strategies for leptospirosis.**  
Advisor: Gustavo Costa Bressan. Co-advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leptospirosis is a febrile infectious disease caused by pathogenic varieties of the genus *Leptospira*, and is considered one of the most widespread zoonoses worldwide. Rodents are the main reservoirs of these bacteria, but other wild and domestic animals, such as horses, cattle and dogs, also participate in their transmission, which occurs mainly through contact with the urine of infected individuals. Despite the growing interest in the area, there is still a lack of affordable and efficient alternatives for the diagnosis of leptospirosis in dogs. Thus, in this work we propose the use of two chimeric proteins as antigens for the serological diagnosis of canine leptospirosis. Recombinant proteins were produced in *E. coli*, and recovered and purified in yields of 4.467 and 7.957 mg/L for Chimeras 1 and 4, respectively. The indirect ELISA technique was performed, using both chimeras as antigen, to detect IgG and IgM antibodies in serum samples. MAT results of the samples were used as a reference to evaluate the efficiency of the ELISA diagnosis. Different conditions for diagnosis were evaluated, and the general accuracy of the assays ranged from 57 to 80 %, and the ability to predict positive values was approximately 85 % for IgG and 75 % for IgM. We thus demonstrate that the constructed chimeras have the potential to aid in the diagnosis of canine leptospirosis. Additionally, a patent landscape was constructed with the aim of describing the scenario of biotechnological solutions development for the field of canine infectious diseases. These data demonstrated the relevant participation of public educational institutions in the development of biotechnology products, and reinforced the importance of public-private partnerships in scientific advancement.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis in animals. Diagnosis. Enzyme-linked immunosorbent assay.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Micrografia de bactéria do gênero Leptospira. ....  | 12 |
| Figura 2 - Representação esquemática da superfície celular de uma bactéria do gênero Leptospira. ....                                    | 16 |
| Figura 3 - Desenho esquemático da Quimera 1, construída pela junção de diferentes antígenos imunogênicos de Leptospira. ....             | 26 |
| Figura 4 - Desenho esquemático da Quimera 4, construída pela junção de diferentes domínios com potencial imunogênico de Leptospira. .... | 27 |
| Figura 5 - Tipos de instituições responsáveis pelo depósito dos pedidos de patentes. ....  | 34 |
| Figura 6 - Tipos de Instituições de Ensino responsáveis pelo depósito dos pedidos de patentes na área. ....                              | 35 |
| Figura 7 - Distribuição das instituições por países. ....  | 36 |
| Figura 8 - Quantidade de documentos assinados por cada organização. ....   | 36 |
| Figura 9 - Distribuição de pedidos de patentes por países. ....  | 37 |
| Figura 10 - SDS-PAGE demonstrando a expressão e purificação das quimeras. ....   | 39 |
| Figura 11 - Estabilidade térmica das quimeras em diferentes temperaturas de armazenamento. ....  | 40 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Critérios utilizados na primeira busca realizada na plataforma Orbit Intelligence.  | 23 |
| Tabela 2 - Critérios utilizados na segunda busca realizada na plataforma Orbit Intelligence.   | 25 |
| Tabela 3 - Códigos das combinações de quantidade de proteína e diluições de soro, testadas na etapa de triagem.                                  | 30 |
| Tabela 4 - Códigos das combinações de quantidade de proteína e diluições de soro testadas na padronização da detecção de anticorpos do tipo IgM. | 31 |
| Tabela 5 – Triagem para determinação das condições de testagem mais promissoras para diagnóstico de leptospirose.                                | 41 |
| Tabela 6 - Padronização das condições para detecção de anticorpos do tipo IgG.   | 42 |
| Tabela 7 - Padronização das condições para detecção de anticorpos do tipo IgM.   | 43 |
| Tabela 8 - Avaliação da performance do ELISA com as Quimeras 1 e 4, em comparação com os resultados do MAT.                                      | 44 |
| Tabela 9 - Análise conjunta dos resultados obtidos com as Quimeras 1 e 4.  | 45 |
| Tabela 10 - Avaliação da estabilidade dos antígenos.   | 47 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 11 |
| 1.1. Leptospirose.....   | 11 |
| 1.2. Leptospira .....  | 12 |
| 1.3. Patogenicidade .....  | 13 |
| 1.4. Vacina .....  | 14 |
| 1.5. Diagnóstico .....   | 16 |
| 1.5.1. ELISA.....  | 17 |
| 1.5.2. Ensaio imunocromatográfico.....   | 19 |
| 1.6. <i>Patent landscape</i> .....   | 19 |
| 2. OBJETIVOS GERAIS .....  | 21 |
| 2.1. Objetivos específicos .....   | 21 |
| 2.1.1. Construir um <i>Patent Landscape</i> sobre produtos da medicina veterinária empregados na saúde de cães. ....         | 21 |
| 2.1.2. Desenvolver um teste de diagnóstico sorológico do tipo ELISA IgG/IgM para a investigação da leptospirose canina. .... | 21 |
| 3. METODOLOGIA .....   | 22 |
| 3.1. <i>Patent Landscape</i> .....   | 22 |
| 3.1.1. Escolha do tema e construção da estratégia de busca para recuperação dos documentos.....                              | 22 |
| 3.1.2. Tratamento e análise dos dados .....  | 24 |
| 3.2. Desenvolvimento do teste de diagnóstico por ELISA .....   | 25 |
| 3.2.1. Estrutura das quimeras.....   | 26 |
| 3.2.2. Obtenção das proteínas quiméricas .....   | 27 |
| 3.2.3. Avaliação da estabilidade térmica das quimeras .....  | 29 |
| 3.2.4. Soros .....   | 29 |
| 3.2.5. Avaliação do potencial no sorodiagnóstico .....   | 29 |
| 3.2.6. Avaliação da estabilidade dos antígenos no diagnóstico.....   | 32 |
| 3.2.7. Análise estatística .....   | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....   | 33 |
| 4.1. <i>Patent Landscape</i> .....   | 33 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 4.1.1.   | Escolha do tema e construção da estratégia de busca para recuperação dos documentos..... | 33 |
| 4.1.2.   | Características dos depositantes de patentes .....                                       | 34 |
| 4.2.     | Desenvolvimento do teste de diagnóstico.....   | 38 |
| 4.2.1.   | Expressão, purificação e estabilidade das quimeras.....                                  | 38 |
| 4.2.2.   | Avaliação do potencial no sorodiagnóstico .....  | 40 |
| 4.2.2.1. | Triagem inicial das condições de ensaio.....   | 40 |
| 4.2.2.2. | Padronização das condições de detecção de anticorpos IgG e IgM.....                      | 41 |
| 4.2.2.3. | Avaliação da performance do ELISA .....  | 43 |
| 4.2.2.4. | Avaliação da estabilidade dos antígenos .....  | 46 |
| 5.       | CONCLUSÕES.....  | 49 |
|          | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 50 |
|          | APÊNDICE A – CÓDIGOS DOS PAÍSES .....  | 56 |
|          | APÊNDICE B – GRÁFICOS TRIAGENS .....   | 57 |
|          | APÊNDICE C – GRÁFICOS PADRONIZAÇÕES.....   | 63 |

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. Leptospirose

A leptospirose é uma doença bacteriana, causada por microrganismos do gênero *Leptospira*. É amplamente difundida em países de clima tropical e sub-tropical, tornando-se ainda mais comum em regiões com baixo índice de saneamento básico, e em períodos com alta pluviosidade (Acha e Szyfres, 2003; Sarkar *et al.*, 2012). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, podendo se tornar epidêmica em épocas chuvosas, fazendo com que seja considerada um problema de saúde pública e, sendo assim, figurando na lista de doenças de notificação compulsória (Brasil, 2019). Dados mostram que, no período de 2007 a 2016 foram confirmados 39.263 casos, sendo que a taxa de letalidade chega a 8,9% (Brasil, 2018).

Esta doença pode se apresentar com sintomatologia diversificada, podendo variar de pacientes assintomáticos até casos mais graves que levam ao óbito do indivíduo. Os principais sintomas são febre, cefaleia e mialgias, e geralmente ocorrem na fase aguda da doença. Essa fase é caracterizada ainda pela presença de grandes quantidades do patógeno na corrente sanguínea, o que se dá o nome de leptospiremia, e dura cerca de uma semana. Em seguida inicia-se a fase imune, onde o corpo começa a produção de anticorpos e ocorre a eliminação das bactérias na urina, levando ao desaparecimento dos sintomas. Cerca de 15% dos pacientes diagnosticados tem ainda uma progressão para uma forma mais grave da doença, conhecida como doença de Weil, caracterizada por sintomas como febre e dor muscular, que pode progredir para insuficiência renal e hemorragia pulmonar, podendo levar ao óbito (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

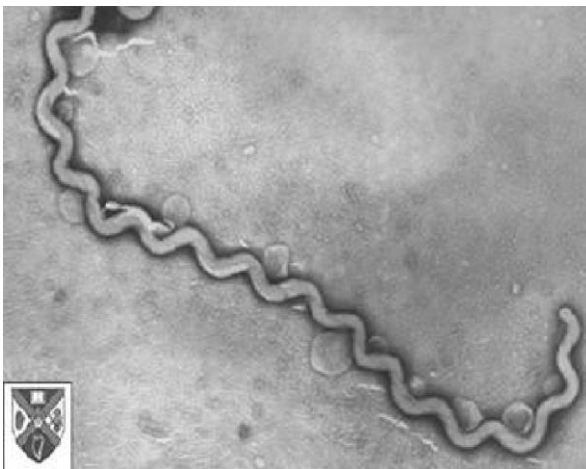
Além do impacto na saúde humana, a leptospirose é muito relevante quando se trata de saúde animal, uma vez que animais domésticos e de criação, como cães, bovinos, suínos e equinos, são frequentemente acometidos pela doença. Ela é responsável por grandes perdas econômicas, em especial quando se trata de animais de criação. Rebanhos não vacinados podem apresentar taxa de abortamento de até 68%, além de reduções de até 47% nas taxas de fertilidade (Pires, 2010). Além disso, mesmo os animais que se recuperam da doença podem se tornar portadores assintomáticos das leptospiras por longos períodos (Levett, 2001; Kurilung *et al.*, 2017), o que pode levar à manutenção da doença em rebanhos, além de aumentar as chances das pessoas que tiverem contato com os animais contraírem a doença. Em cães, a doença pode apresentar um amplo espectro de sintomas, que vão desde febre leve até insuficiência renal e hepática com distúrbios de coagulação, podendo levar ao óbito (Miotto *et al.*, 2018; IEO, 2021).

A infecção, tanto de humanos quanto de animais, se dá através do contato com a urina de indivíduos infectados. Apesar de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos também participarem da transmissão da doença (Bharti *et al.*, 2003; Barragan *et al.*, 2017), destaca-se nesse processo os roedores. Quando infectados, estes animais apresentam colonização persistente dos túbulos renais, entretanto os sintomas da doença não se desenvolvem, fazendo com que se tornem reservatórios das bactérias e potenciais distribuidores das mesmas (Faine *et al.*, 1999).

## 1.2. Leptospira

As bactérias do gênero *Leptospira*, são aeróbicas obrigatórias, e podem ser saprófitas ou patogênicas. Podem medir de 6 a 20 nm de comprimento, com 1 nm de diâmetro. Elas têm um formato espiralado muito característico, que lhes confere grande mobilidade. Têm, além da membrana citoplasmática, uma parede de peptidoglicano e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS) (Faine *et al.*, 1999).

**Figura 1 - Micrografia de bactéria do gênero *Leptospira*.**



Fonte: Alcayaga *et al.*, 2007.

Técnicas de sequenciamento de DNA revelam que existem 22 espécies diferentes dentro do gênero *Leptospira*, e essas espécies podem ser divididas entre saprófitas, intermediárias ou patogênicas. Entretanto a classificação mais relevante do ponto de vista clínico se refere à classificação sorológica das leptospiras. Esta classificação leva em conta a imunoreatividade de cada cepa, e vai além das barreiras de espécies, sendo influenciada pela composição dos carboidratos dos LPS's que compõe a membrana externa. São estes resíduos de carboidratos que conferem as características de imunogênicidade de cada bactéria, e as semelhanças entre

eles que permite a determinação das sorovariedades, e em alguns casos dos sorogrupos, quando as composições são semelhantes (Faine *et al.*, 1999; Schuller *et al.*, 2015; Picardeau, 2017).

### 1.3. Patogenicidade

A infecção por leptospirose ocorre quando um indivíduo saudável entra em contato com a urina ou tecidos contaminados de outros indivíduos infectados, ou ainda com água ou solo contaminados pela bactéria. As *Leptospiras* penetram no organismo principalmente através das mucosas e de lesões na pele. Uma vez dentro do organismo, as bactérias se disseminam através do sangue e podem afetar órgãos, como baço, pâncreas, músculo esquelético e cardíaco, entre outros, mas os mais afetados geralmente são o fígado, os rins e os pulmões (Da Rocha Medeiros *et al.*, 2010).

Inicialmente as leptospiras atuam inibindo a ativação do sistema complemento, um dos principais componentes do sistema imune inato, através da ligação ao Fator H. Este fator é considerado um importante inibidor da cascata de reações do sistema complemento, pois atua tanto sobre a via de ativação clássica deste, como sobre a via alternativa. Este processo diminui a eficácia da atuação do sistema imune nos estágios iniciais da infecção, e permite que as bactérias se proliferem no sangue, o que damos o nome de leptospiremia, desencadeando a fase aguda da doença (Meri *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2009).

Durante a fase aguda as bactérias se espalham por diversos órgãos do indivíduo afetado, entretanto os mais afetados, principalmente em cães, costumam ser rins, fígado e pulmões. Os danos causados em rins e fígados estão relacionados diretamente com a presença das leptospiras nestes dois órgãos. As lesões renais mais frequentemente observadas são relacionadas à nefrite intersticial aguda, com necrose, apoptose e regeneração das células tubulares. Entretanto anormalidades glomerulares também têm sido observadas em cães. Já no fígado o principal efeito da presença das leptospiras é o desencadeamento de uma hepatite colestática, que pode ou não se apresentar de forma icterica em cães. A forma icterica geralmente é considerada mais grave, e está diretamente associada com a morte desses animais (Schuller *et al.*, 2015).

Nos pulmões de cães as lesões mais comumente encontradas são hemorragias intra-alveolares, que podem se apresentar em diferentes graus. Entretanto, os efeitos da leptospirose no tecido pulmonar são causados por fatores diferentes daqueles observados nos rins e fígado. Neste órgão, as lesões não estão relacionadas diretamente com a presença e atuação das leptospiras, mas acredita-se que possam estar ligadas com efeitos inflamatórios sistêmicos

(Schuller *et al.*, 2015). Isso pode estar relacionado à ativação de outro mecanismo imunológico por parte das leptospiros, como por exemplo a ativação de citocinas. A infecção por leptospiros desencadeia, num primeiro momento, a ativação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, cuja função é combater a infecção. Em sequência são ativadas as citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, que tem como objetivo restaurar a homeostase do organismo. Entretanto em infecções severas ocorre um efeito conhecido como “tempestade de citocina”, onde uma ativação exagerada da resposta pró-inflamatória pode, além de causar danos teciduais, em especial nos pulmões (Yamagata *et al.*, 2009), levar à uma ativação precoce e exagerada de citocinas anti-inflamatórias, causando um estado de “paralisia imunológica”, que pode resultar num fortalecimento da infecção e agravamento da doença. As causas dessa perda de regulação do processo inflamatório mediado por citocinas ainda não foram completamente elucidadas, mas acredita-se que possa estar relacionado com fatores genéticos ou ainda com a virulência do patógeno (Cagliero *et al.*, 2018).

Por fim, quando o indivíduo infectado inicia a produção de anticorpos anti-leptospira, estas começam a serem eliminadas do sangue e dos outros órgãos e tecidos os quais haviam alcançado, levando ao abrandamento dos sintomas, o que se dá o nome de fase imune. Na maioria dos indivíduos a fase imune leva ao fim da infecção, entretanto, em alguns casos, pode haver ainda uma colonização persistente em órgãos imunoprivilegiados, em especial os túbulos renais. Nesses casos, apesar de não mais apresentar os sintomas que caracterizam a doença, os indivíduos continuam sendo portadores das leptospiros, e ainda eliminam as bactérias através da urina. Principalmente para cães e outros animais domésticos e de criação, a colonização renal pode torna-los reservatórios das bactérias no meio onde vivem (Levett, 2001; Kurilung *et al.*, 2017).

#### **1.4. Vacina**

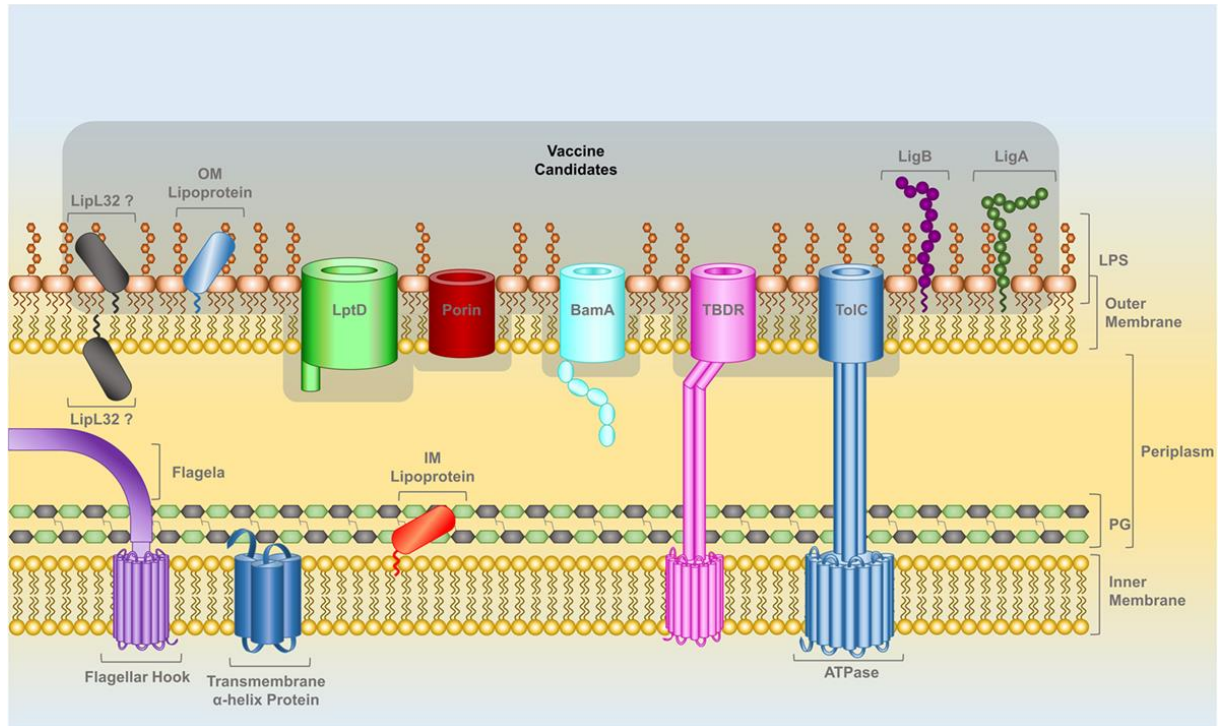
As vacinas disponíveis comercialmente contra a leptospirose se resumem às do tipo bacterina, ou seja, composições vacinais que contém em suas formulações bactérias inativadas. Como a doença pode ser causada por uma variedade muito grande de sorovares e sorogrupos, os produtores desses insumos são levados a produzirem vacinas de amplo espectro, ou seja, que contemplam mais de um sorogrupo. Entretanto, apesar de conseguirem atender uma demanda mais diversificada, a resposta imunológica destas vacinas é de pouca intensidade e ainda restrita aos sorogrupos representados, se tornando assim uma medida profilática pouco eficiente. Somando-se a isso o fato de as vacinas inativadas poderem apresentar um risco de reações

adversas, temos que as opções atualmente disponíveis não são recomendadas para o uso na saúde humana, sendo voltadas principalmente para imunização de rebanhos bovinos e suínos, e em cães (Rodrigues *et al.*, 2011).

Entretanto, ainda é considerável a diferença de patogenicidade dos variados sorovares frente as espécies alvo. Em cães as sorovariedades mais comuns são Copenhageni e Canicola, entretanto Pomona, Grippotyphosa e Autumnalis também já foram reportados (Schuller *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2017). Já em bovinos, apesar dos sorovares Wolffi, Canicola e Copenhageni já terem sido relatados (Zacarias *et al.*, 2008; Tonin *et al.*, 2010; Miraglia e Morais, 2013), a variedade Hardjo é a mais adaptada (Araújo *et al.*, 2005; Tonin, *et al.*, 2010; Prajapati *et al.*, 2018). Em suínos, há relatos de ocorrência de leptospirose a partir dos sorovares Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Shermani e Grippotyphosa (Soto *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2008). Isso faz com que a busca por alternativas eficientes, em relação às bacterinas, seja cada vez maior. Uma vacina eficiente contra leptospirose deve ser imunogênica, efetiva na prevenção de leptospirose aguda e crônica, ser capaz de evitar estabelecimento de colonização renal, abranger um amplo espectro de variedades, possuir longa duração, além de ser segura (Faine *et al.*, 1999). Com isso em mente, vários estudos estão sendo realizados na busca de proteínas que apresentassem potencial antigênico, de forma que pudessem vir a ser aplicadas na produção de vacinas recombinantes. Alguns exemplos encontrados foram as lipoproteínas da superfície celular LipL32, LipL21, LipL41, LigA, LigB, Lp49, Lp29 (Cullen *et al.*, 2005; Bashiru e Bahaman, 2018), bem como proteínas do tipo porinas, como a OmpL1 (Shang *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2008), que foram demonstradas como antigênicas.

Vacinas de subunidade possuem vantagens como a produção de poucos efeitos colaterais e maior segurança, porém, como a maioria das vacinas, apresentam pouca imunogenicidade (Karch e Burkhard, 2016). Sendo assim, elas também requerem em sua formulação o uso de adjuvantes ou moduladores da resposta imune (Perrie *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2019). Os mais utilizados atualmente são derivados de alumínio, como o hidróxido de alumínio. Apesar de ser considerado um adjuvante pouco potente, este adjuvante vem sendo amplamente utilizado pela segurança já constatada (Marrack *et al.*, 2009).

**Figura 2 - Representação esquemática da superfície celular de uma bactéria do gênero *Leptospira*.** Podemos observar a existência de duas membranas celulares, interna e externa, e das cadeias de peptídeoglicanos no periplasma. A membrana externa ser encontrado a maioria das proteínas que vêm sendo empregadas no desenvolvimento de vacinas de subunidade para leptospirose.



Fonte: Grassmann *et al.*, 2017.

## 1.5. Diagnóstico

O teste considerado referência pela Organização Mundial pela Saúde Animal (OIE) para a confirmação de um indivíduo infectado é o MAT (*Microagglutination Teste*; OIE Terrestrial Manual, 2021). Este teste é realizado pela exposição do soro do indivíduo que está sendo testado à exemplares de diferentes sorogrupos de leptospirose, e então é observado se ocorre o processo de aglutinação das bactérias em decorrência da presença de anticorpos aglutinantes no soro. A confirmação de um diagnóstico por este teste é dada pela soroconversão da amostra do indivíduo, ou pelo aumento significativo do título de anticorpos em duas amostras coletadas com duas semanas de diferença (Cerqueira e Picardeau, 2009).

Entretanto, o MAT é considerado um teste de difícil implantação, tendo em vista que depende da utilização de uma grande variedade de cepas representante dos diferentes sorogrupos, e a manutenção dessas bactérias vivas é trabalhosa e de alto custo. Além disso, a avaliação dos resultados é considerada subjetiva, tornando necessário um técnico altamente treinado para a obtenção de resultados confiáveis (Ko *et al.*, 2009; Picardeau, 2013).

Uma alternativa ao MAT é o exame direto, que consiste na observação de amostras de sangue em microscópio. Apesar de ser uma técnica de menor custo operacional, ela depende de um microscópio de campo escuro, tendo em vista que as leptospiros são pequenas e não podem ser vistas num microscópio comum, além de um técnico treinado para a realização da análise. Para o diagnóstico positivo considera-se uma contagem de  $10^4$  leptospiros/mL. Para a realização deste exame, a coleta da amostra deve ser realizada na primeira semana após o aparecimento dos primeiros sintomas e até, no máximo, dois dias após o início do tratamento com antibióticos. Esse curto período da janela de coleta da amostra pode fazer com que a sensibilidade do método seja baixa. Deve-se atentar ainda aos falso-positivos que podem ser obtidos devido à detritos celulares e outros artefatos (Vjayachari *et al.*, 2001; Reagan e Sykes, 2019).

A cultura direta das leptospiros de amostras de sangue, urina e tecido, apesar de poder ser empregada no diagnóstico, não é tão utilizada devido a fatores como o alto custo dos materiais necessários para realizar o cultivo, e o longo tempo de incubação. Sendo assim, essa técnica é mais utilizada em estudos epidemiológicos (Reagan e Sykes, 2019).

Outros testes podem ser utilizados no diagnóstico da leptospirose, mas nenhum deles pode ser considerado um teste confirmativo como o MAT e o exame direto, sendo utilizados apenas como testes presuntivos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma das alternativas. O princípio da técnica passa pela amplificação, na amostra, de regiões de genes específicos das bactérias do gênero *Leptospira*. Ela tem como principal vantagem a alta sensibilidade, pois necessita apenas de algumas cópias dos genes para retornar um resultado positivo. Contudo, essa também é uma técnica que apresenta custos elevados para padronização, preparo do material a ser analisado e realização da análise, fazendo com que haja poucas vantagens em relação ao teste padrão. Além disso, o fato de não detectar diretamente as bactérias, mas apenas o material genético, faz com que possa resultar em resultados positivos mesmo na ausência de bactérias viáveis (Schreier *et al.*, 2013).

Outras alternativas que vem sendo cada vez mais aplicadas são o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e o Ensaio Imunocromatográfico, que se baseiam em um princípio semelhante ao utilizado no MAT, onde são detectados os anticorpos contra leptospiros presentes na amostra.

### **1.5.1. ELISA**

O ELISA consiste em um teste que permite a detecção de uma molécula de interesse em uma amostra através de interações antígeno-anticorpo. Existem muitas possibilidades de

variações na metodologia empregada, sendo os tipos mais comuns o direto, o indireto e o sanduíche. As principais diferenças entre eles estão nas etapas de fixação e detecção das moléculas alvo, e a escolha depende do objetivo da análise.

Para o diagnóstico de leptospirose, a metodologia mais empregada é o ELISA indireto, onde o antígeno é fixado na placa com objetivo de capturar anticorpos anti-leptospira presentes na amostra, que serão revelados através de outro anticorpo conjugado com uma enzima reveladora. Para tal, são utilizados principalmente extratos totais de leptospirosas para a captura dos anticorpos. Geralmente utiliza-se a estirpe saprófita *Leptospira biflexa* para produção dos extratos, devido a presença de antígenos comuns às estirpes patogênicas em sua superfície, mas em alguns casos são empregados extratos de estirpes patogênicas endêmicas de cada região. É possível ainda a utilização de proteínas recombinantes das leptospirosas. Apesar de haver relatos da utilização de outras proteínas, a LipL32 é a mais comumente empregada, pelo fato de ser expressa apenas em variedades patogênicas e possuir um alto nível de conservação entre os diversos sorogrupos (Picardeau, 2013; Reagan e Sykes, 2019). Além da LipL32, outras proteínas tem sido alvo de estudos para avaliar seu potencial para aplicação como antígenos para o diagnóstico, como por exemplo LipL41, LigB e LigA (Joseph *et al.*, 2018; Ambily *et al.*, 2019; Behera *et al.*, 2021).

Além de não demandar o uso de bactérias vivas para a detecção dos anticorpos, o ELISA apresenta ainda outra importante vantagem em relação ao MAT, que é a possibilidade de detectar e diferenciar anticorpos dos tipos IgM e IgG, algo que não é possível no teste de referência. Isso é importante pois em cães, por exemplo, a produção de IgG se inicia duas semanas após o aparecimento dos sintomas, já no fim da leptospiremia, enquanto a produção de IgM se inicia ainda na primeira semana, quando as bactérias ainda estão se proliferando no sangue (Reagan e Sykes, 2019). Isso permite ao ELISA um diagnóstico precoce da doença (Dounghawee *et al.*, 2008; Aviat *et al.*, 2010; Limmathurotsakul *et al.*, 2012).

Entretanto, é importante ressaltar que a acurácia desse tipo de diagnóstico ainda apresenta grande variação (Ambily *et al.*, 2019; Behera *et al.*, 2021). Isso se deve, possivelmente, a necessidade de validação de muitas das metodologias empregadas nos estudos e a diferenças que podem ser encontrados entre os sorogrupos predominantes em cada localidade. Além disso, o ELISA não tem a capacidade de fazer a identificação dos sorovares ou sorogrupos causadores da infecção, algo que é possível com o MAT (Picardeau, 2013; Penna *et al.*, 2017).

### 1.5.2. Ensaio imunocromatográfico

Uma alternativa de diagnóstico sorológico para leptospirose é o Ensaio Imunocromatográfico, ou Lateral Flow Assay (LFA). Esse teste funciona através da interação antígeno-anticorpo, de maneira semelhante ao ELISA. A diferença desse método está na forma como ele é construído. Ao invés de serem fixados numa placa, os antígenos são colocados numa membrana cromatográfica.

Os antígenos empregando nessa técnica são, geralmente, os mesmos utilizados no ELISA. Isso leva a vantagens e desvantagens semelhantes a esse teste, quando comparado com o padrão ouro, MAT. Apesar disso, o LFA tem a grande vantagem em relação ao ELISA de não necessitar de um aparato laboratorial complexo e um analista treinado para a realização do teste, permitindo que seja aplicado diretamente no local onde o indivíduo com suspeita de leptospirose de encontra, como uma clínica veterinária ou mesmo em campo. Entretanto esse teste tem a desvantagem de apresentar uma menor sensibilidade em relação ao ELISA (Picardeau, 2013; Maze *et al.*, 2019; Reagan e Sykes, 2019).

### 1.6. *Patent landscape*

A patente é um título concedido pelo Estado a um inventor, que garante direitos de exclusividade da exploração econômica sobre um produto, por um determinado período de tempo e em um determinado território. Para a obtenção desse título, é necessário que seja comprovada a novidade do produto, bem como a atividade inventiva necessária à sua criação e sua aplicabilidade industrial (Brasil, 1996). Outra característica importante das patentes é que elas devem conter uma descrição clara da invenção, que fica em domínio público. Dessa forma, o sistema de patentes garante os direitos sobre a propriedade intelectual gerada pelo inventor, ao mesmo tempo que estimula cada vez mais avanços tecnológicos, ao garantir acesso à informação (Pereira *et al.*, 2004).

Sendo assim, quando se pensa em prospecção tecnológica, ou seja, estudos que visam a criação de panoramas da evolução de tecnologias, os documentos das patentes se tornam um importante aliado. Tais trabalhos tem como característica marcante a possibilidade de obtenção de previsões de quais caminhos determinada área deve seguir no futuro próximo (Abbas *et al.*, 2014).

Nesse contexto de trabalhos de prospecção tecnológica podemos destacar os *Patent Landscapes*, estudos que se baseiam em diversos tipos de informações relevantes que podem

ser encontradas nos documentos de patentes para criar perfis de patenteamento em determinada área da tecnologia. Esses estudos podem ser utilizados de forma a permitir um maior embasamento durante tomadas de decisões, como alocação de recursos, por exemplo (Smith *et al.*, 2017).

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho buscou desenvolver um protótipo de teste sorológico do tipo ELISA IgG/IgM para a aplicação no diagnóstico de casos de leptospirose em cães. Além disso, propôs-se realizar um estudo de *Patent Landscape* sobre tecnologias relacionadas à leptospirose e outras doenças infecciosas relevantes à saúde canina.

### 2.1. Objetivos específicos

#### 2.1.1. Construir um *Patent Landscape* sobre produtos da medicina veterinária empregados na saúde de cães.

- Delinear o tema de estudo, elencando as principais doenças infecciosas que afetam a saúde canina;
- Obter documentos de patentes relacionados a inovação biotecnológica na área de doenças infecciosas que afetam cães;
- Criar um perfil das instituições que desenvolvem tecnologias na área de saúde de cães e comparar com a realidade do grupo de pesquisa.

#### 2.1.2. Desenvolver um teste de diagnóstico sorológico do tipo ELISA IgG/IgM para a investigação da leptospirose canina.

- Obter proteínas recombinantes através de expressão heteróloga em *Escherichia coli*;
- Avaliar a capacidade de detecção de infecção em comparação com soros caracterizados previamente por MAT;
- Padronizar a metodologia de análise.

### 3. METODOLOGIA

Este trabalho será dividido em duas partes, onde a primeira etapa trata da construção do *Patent landscape* sobre produtos relacionados a doenças infecciosas que afetam cães, e a segunda etapa trata do desenvolvimento de um teste capaz de diagnosticar a leptospirose canina, baseando-se na reatividade de proteínas recombinantes quiméricas, desenvolvidas pelo grupo de pesquisa, com anticorpos encontrados no soro de animais positivos ou negativos para a leptospirose.

#### 3.1. *Patent Landscape*

##### 3.1.1. Escolha do tema e construção da estratégia de busca para recuperação dos documentos

Afim de entender melhor o mercado, e a evolução dos tipos de tecnologias aplicadas no segmento de doenças infecciosas que afetam a saúde canina, foi realizada a construção de um *Patent Landscape*. Para tal, o primeiro passo foi delimitar os objetos de estudo. Nesse trabalho, os objetos principais são as doenças infecciosas que afetam estes animais e os tipos de tecnologias relacionadas a elas. A escolha das doenças alvo do estudo foi realizada através de busca na literatura, de forma a selecionar aquelas que apresentam maior importância no contexto de saúde animal no Brasil. Foram selecionadas sete doenças, cinomose, parvovirose, erliquiose, coronavirose, babesiose, leishmaniose e leptospirose. Já os tipos de tecnologias a serem investigados foram selecionados conforme o interesse do grupo de estudos, sendo escolhidas tecnologias relacionadas a vacinas e diagnósticos para este trabalho.

Para a recuperação dos documentos e construção da base de patentes relacionadas ao tema de estudo, foi utilizado a plataforma *Orbit Intelligence*, que permite que a pesquisa seja realizada através de diversos tipos de parâmetros. Para limitar o período temporal utilizamos o parâmetro *Earliest Priority Date*, que está associado ao momento em que foi realizado o pedido da primeira patente da família. Em seguida foram selecionados os termos para a busca referentes ao tipo de hospedeiro alvo, e os termos para designar os tipos de tecnologias. Por fim, inserimos nos parâmetros de pesquisa os termos relativos as doenças e patógenos de interesse. Foram considerados os campos “título”, “resumo” e “reivindicações” dos documentos para a busca dos termos selecionados.

Tabela 1 - Critérios utilizados na primeira busca realizada na plataforma *Orbit Intelligence*.

| <b>Parâmetro</b>              | <b>Critério</b>  |  |
|-------------------------------|--|--|
| <b>Período Temporal</b>       |  |  |
| <i>Earliest Priority Date</i> | 1998-01-01:2017-12-31  |  |
| <b>Hospedeiro</b>             | <b>Sinonímia</b>   |  |
| <i>Palavras-chave</i>         | Dog OR Canine?   |  |
| <b>Produto</b>                | <b>Sinonímia</b>   |  |
| <i>Palavras-chave</i>         | Vaccin+ OR Immunogen+ OR Antigen+ OR (Diagnostic kit) OR (Diagnostic test) OR (Diagnosis kit)  |  |
|                               | <b>OR</b>  |  |
| <i>IPC</i>                    | (identificado para cada doença abaixo)   |  |
| <b>Doença (7)</b>             | <b>Sinonímia</b>   | <b>IPC</b>   |
| <i>Cinomose</i>               | Distemper OR (Hardpad disease) OR (Hard pad disease) OR CDV OR (Distemper Virus)   | A61K-039/00 OR A61K-039/12 <b>OR A61K-039/155</b> OR A61K-039/175 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53  |
| <i>Parvovirose</i>            | Parvo OR CPV? OR CPV-1? OR CPV-2? OR Parvovirus OR (Parvovirus disease) OR Parvovirus  | A61K-039/00 OR A61K-039/12 OR A61K-039/23 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53                          |
| <i>Coronavirose</i>           | (Coronavirus disease) OR (Coronavirus infection) OR Coronavirus OR CCoV  | A61K-039/00 OR A61K-039/12 OR A61K-039/215 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53                         |
| <i>Erliquiose</i>             | Ehrlichiosis OR Rickettsiosis OR (Hemorrhagic fever) OR Typhus OR (Tracker dog disease) OR (Tropical canine pancytopenia) OR (Ehrlichia canis) | A61K-039/00 OR A61K-039/02 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53   |
| <i>Babesiose</i>              | Piroplasmosis OR Babesia OR Babesiosis   | A61K-039/00 OR A61K-039/002 <b>OR A61K-039/015</b> OR A61K-039/018 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53 |
| <i>Leishmaniose</i>           | Leishmania+  | A61K-039/00 OR A61K-039/002 OR A61K-039/008 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53                        |
| <i>Leptospirose</i>           | (L. interrogans) OR Leptospira OR Leptospirosis  | A61K-039/00 OR A61K-039/02 OR G01N-33/50 OR G01N-033/53  |

Fonte: Autor.

Foram realizadas duas buscas na plataforma *Orbit Intelligence*, na tentativa de estabelecer uma estratégia de busca válida e que permitisse a recuperação de um número relevante de documentos. A primeira busca (cujos critérios utilizados estão mostrados na *Tabela 1*) retornou 450 famílias de patentes, um número considerado baixo para os propósitos do estudo. Sendo assim, foram realizadas modificações nos termos de busca, em especial nos relacionados ao hospedeiro e às doenças alvo, com objetivo de torna-la menos restritiva, permitindo a recuperação de um número maior de documentos (*Tabela 2*).

Com as modificações realizadas, a segunda busca retornou 1084, mais do que o dobro da primeira. Esta escolha de terminologias menos restritivas pode acarretar na recuperação de documentos não relacionados com o tema em estudo, contudo evita perdas de documentos relevantes, o que é essencial num campo de estudo restrito, como este se apresentou.

Foi realizada ainda uma terceira busca, que utilizou os mesmos parâmetros da segunda, com exceção do período temporal. Essa busca teve o objetivo complementar o período temporal em estudo, aumentando de 20 para 30 anos, sendo assim foi utilizado o termo “1988-01-01:1997-12-31” no campo correspondente. Essa busca adicional retornou mais 174 famílias de patentes que, somadas àquelas recuperadas na segunda busca, resultou numa base de 1258 documentos.

### **3.1.2. Tratamento e análise dos dados**

Após a recuperação dos documentos de interesse, os dados dos mesmos foram exportados em formato de planilha, e em seguida realizamos uma curadoria manual para corrigir possíveis erros oriundos da base de dados, como documentos duplicados, erros de digitação, entre outros. Tal curadoria teve como objetivo ainda a retirada de patentes que tratam de assuntos não relacionados, que foram recuperados de maneira errônea, devido a possíveis falhas na estratégia de busca. Após a etapa de curadoria, a base de patentes obtidas foi reduzida de 1258 para 1155, sendo 995 do período entre 1998-2017, e 160 entre 1988-1997.

A análises dos dados, que se seguiu, permitiu a criação de um perfil dos principais depositantes das patentes e dos financiadores das pesquisas, bem como um mapeamento geográfico dos criadores das tecnologias.

Tabela 2 - Critérios utilizados na segunda busca realizada na plataforma *Orbit Intelligence*.

| <b>Parâmetro</b>              | <b>Critério</b>   |
|-------------------------------|---|
| <b>Período Temporal</b>       |   |
| <i>Earliest Priority Date</i> | 1998-01-01:2017-12-31   |
| <b>Hospedeiro</b>             | <b>Sinonímia</b>  |
| <i>Palavras-chave</i>         | Dog OR Canine? OR Canis OR canid?   |
| <b>Produto</b>                | <b>Sinonímia</b>  |
| <i>Palavras-chave</i>         | Vaccin+ OR Immunogen+ OR Antigen+ OR Diagnos+   |
| <b>IPC</b>                    | <b>OR</b><br>(identificado para cada doença abaixo)   |
| <b>Doença (7)</b>             | <b>Sinonímia</b> <b>IPC</b>   |
| <i>Cinomose</i>               | Distemper OR (Hardpad) OR (Hard pad) OR CDV<br>A61K-039/00 OR A61K-039/12 <b>OR A61K-039/155</b> OR A61K-039/175 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53  |
| <i>Parvovirose</i>            | Parvovir+ OR Parvo OR CPV? OR CPV-1? OR CPV-2? OR<br>A61K-039/00 OR A61K-039/12 OR A61K-039/23 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53  |
| <i>Coronavirose</i>           | Coronavirus OR CCoV<br>A61K-039/00 OR A61K-039/12 OR A61K-039/215 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53   |
| <i>Erliquiose</i>             | Ehrlichiosis OR Rickettsiosis OR (H?emorrhagic fever) OR Typhus OR (Tracker dog disease) OR (Tropical canine pancytopenia) OR (Ehrlichia canis) OR (E. canis)<br>A61K-039/00 OR A61K-039/02 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53 |
| <i>Babesiose</i>              | Babesi+ OR Piroplasmosis<br>A61K-039/00 OR A61K-039/002 <b>OR A61K-039/015</b> OR A61K-039/018 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53  |
| <i>Leishmaniose</i>           | Leishman+<br>A61K-039/00 OR A61K-039/002 OR A61K-039/008 OR G01N-033/50 OR G01N-033/53  |
| <i>Leptospirose</i>           | Leptospir+ OR (L. interrogans)<br>A61K-039/00 OR A61K-039/02 OR G01N-33/50 OR G01N-033/53   |

Fonte: Autor.

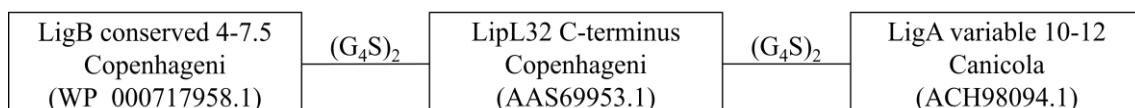
## 3.2. Desenvolvimento do teste de diagnóstico por ELISA

### 3.2.1. Estrutura das quimeras

As proteínas recombinantes utilizadas nesse estudo foram construídas em trabalho anterior do grupo. Brevemente, a proteína denominada Quimera 1 foi construída pela união de domínios de três diferentes proteínas da membrana externa de leptospiros, LigA, LigB e LipL32, cujo potencial imunogênico e protetivo já havia sido demonstrado na literatura. A Quimera 4 foi construída utilizando também domínios de proteínas da membrana externa, mas com a diferença que esses domínios foram modificados, de forma a aumentar a imunogenicidade de regiões desses domínios que normalmente não contribuíam para a estrutura tridimensional do domínio e não apresentassem imunogenicidade relevante (Silva, 2019).

A Quimera 1 é formada pelos domínios 10-12 de LigA, 4-7.5 de LigB e região C-terminal de LipL32. Esses domínios foram escolhidos pelo seu potencial imunogênico e capacidade de gerar resposta imune protetiva (Lin *et al.*, 2010; Coutinho *et al.*, 2011). A escolha dos sorovares, cujas sequências seriam utilizadas na construção da quimera, foi feita com intuito de criar uma proteína capaz de ser reconhecida por uma ampla variedade de sorogrupos. Foi levado em consideração os resultados de um extenso levantamento de dados feito por Pinto e colaboradores (2017), que identificou os sorogrupos Canicola, Icthaemoharrhagiae e Pomona como sendo aqueles de maior relevância no contexto epidemiológico e clínico no Brasil e América Latina. Com isso, foi realizado uma análise das sequências de diversos sorovares, obtidas da base de dados do NCBI, a fim de encontrar aquelas com maior potencial de reconhecimento dos sorogrupos de interesse. A estrutura final da Quimera 1 está mostrada na *Figura 3*.

**Figura 3 - Desenho esquemático da Quimera 1, construída pela junção de diferentes antígenos imunogênicos de Leptospira.** Arranjo da região N-terminal (esquerda) para C-terminal (direita). Os domínios utilizados na construção foram unidos por um linker de serina-glicina (GGGGSGGGGS). Em cada retângulo estão indicados o domínio, o sorovar e o número de acesso da sequência na base de dados do NCBI.

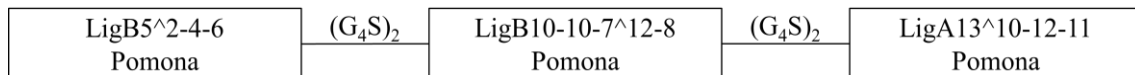


Fonte: Autor.

A construção da Quimera 4 foi realizada usando uma estratégia diferente. Inicialmente foram selecionadas três regiões das proteínas LigA e LigB, que apresentassem boa estabilidade térmica, para compor a base de construção da quimera. Os elementos selecionados foram o domínio 5 de LigB, o domínio 13 de LigA e a quimera LigB10-B10-B7 (Ptak *et al.*, 2018). Em

seguida foi realizada a predição dos possíveis epítomos lineares das sequências completas de LigA e LigB (usando o *software Cell Epitope Prediction Tools*). Esses epítomos foram utilizados para substituir fragmentos semelhantes de regiões dos domínios utilizados que já haviam sido descritas como sendo desordenadas e não-imunogênicas (Ptak *et al.*, 2018). No domínio 5 de LigB foram inseridos epítomos lineares presentes nos domínios 2, 4 e 6 desta proteína. No domínio 13 de LigA foram inseridos epítomos encontrados nos domínios 10, 11 e 12 da própria LigA. Já na quimera LigB10-B10-B7 foram inseridos epítomos dos domínios 12 e 8 de LigB. Os epítomos inseridos nos três domínios foram selecionados por se mostrarem conservados entre diversos sorovares, como Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippotyphosa.

**Figura 4 - Desenho esquemático da Quimera 4, construída pela junção de diferentes domínios com potencial imunogênico de Leptospira.** Arranjo da região N-terminal (esquerda) para C-terminal (direita). Os domínios utilizados na construção foram unidos por um *linker* de serina-glicina (GGGSGGGGS). Em cada retângulo estão indicados o domínio e o sorovar.



Fonte: Autor.

A Quimera 1 foi sintetizada quimicamente pela GenScript (USA) em vetor pET28a (NdeI e SalI), resultando em uma proteína com peso molecular esperado de 73,2 kDa, pI teórico de 7,22 e coeficiente de extinção molar à 280 nm de 63.370 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (calculados através do *software ProtParam tool*; ExpASy). Já a Quimera 4 foi sintetizada quimicamente pela General Biosystems (USA) em vetor pET-28b (NdeI e XhoI), com a proteína final apresentando 29,5 kDa, pI teórico de 8,58 e coeficiente de extinção molar à 280 nm de 27.960 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Para a ligação dos diferentes domínios que compõe cada uma das quimeras foi utilizado um *linker* de serina-glicina (GGGSGGGGS), considerado semi-rígido, com o intuito de permitir flexibilidade para as quimeras, mas evitando que os diferentes domínios interajam entre si.

### 3.2.2. Obtenção das proteínas quiméricas

O protocolo a seguir foi utilizado na obtenção de ambas as quimeras utilizadas nesse estudo: o plasmídeo recombinante contendo o cDNA da proteína foi inserido em 100 µL de células *E. coli* BL21 competentes através de choque térmico (90 segundos à 42 °C, seguido de 2 min em gelo). Em seguida foi adicionado 900 µL de meio LB (Luria-Bertani) e incubado sob leve agitação por 45 min à 37 °C. 500 µL das células transformadas foram diluídas em 25 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e incubadas sob agitação de 180 rpm e 37 °C por 12 h. Em seguida foi adicionado 1 L de meio LB (50 µg/mL de canamicina) e incubado

(180 rpm e 37 °C) até atingir a DO600 na faixa de 0,6-0,8. A expressão de cada uma das quimeras foi induzida pela adição de IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) na concentração final de 0.5 mM, e sob incubação (120 rpm e 20 °C) por 16 h. Após o período de indução o material foi centrifugado (5000 g por 15 min) e o precipitado foi armazenado à -20 °C.

O precipitado coletado foi ressuspense no tampão A (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 40 mM imidazol, pH 8.0), na proporção de 3 mL por 100 mL de indução. A lise celular foi realizada com ciclos de sonicação (2 min, 10 s:10 s, à amplitude 25) com os tubos em gelo, para evitar o aquecimento. O lisado foi centrifugado (5000 g por 15 min) e o sobrenadante (fração solúvel) foi armazenado. O precipitado foi novamente ressuspense em tampão A (1 mL por 100 mL de indução), e outra etapa de lise foi realizada com ciclos de sonicação. Após nova centrifugação, a fração solúvel foi coletada e reunida com a coletada anteriormente, e utilizada para purificação.

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel em FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography; GE-AKTA FPLC System). Foi utilizado coluna His Trap FF Crude (5 mL; GE) previamente equilibrada com tampão A (3x volumes da coluna). 20 mL da fração solúvel foi injetada num fluxo de 1 mL/min, e em seguida a coluna foi lavada com tampão A (6x volumes de coluna; 1,5 mL/min). Foi realizado gradiente em degraus de 10 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 % do tampão B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 250 mM imidazol, pH 8,0; 1x volume da coluna para cada degrau; 1 mL/min), e por fim foi feita a eluição da quimera com 100 % do tampão B (3x volumes da coluna; 1 mL/min).

Após a purificação em FPLC a solução com cada quimera foi dialisada à 4 °C overnight em 1 L de tampão de diálise. Para a Quimera 1 foi utilizado tampão Carbonato (20 mM, pH 9,6), enquanto para a Quimera 4 foi utilizado tampão PSB (pH 7,4). As quimeras purificadas passaram por etapa de congelamento rápido utilizando nitrogênio líquido, a fim de preservar a estrutura tridimensional das proteínas, e em sequência foram armazenadas a -80 °C.

As proteínas recombinantes foram analisadas por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), como descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1 % (SIGMA-ALDRICH; 9 % de ácido acético, 45 % de etanol).

A concentração das quimeras foi estimada por absorvância a 280 nm ( $A_{280}$ ). O coeficiente de extinção molar utilizado nos cálculos foi estimado utilizando o *software ProtParam tool* (ExPASy).

### 3.2.3. Avaliação da estabilidade térmica das quimeras

Alíquotas de 50  $\mu$ L das proteínas recombinantes foram armazenadas pelo período de dois meses em quatro condições distintas de temperatura, -80 °C, -20 °C, 4 °C e temperatura ambiente. Após o armazenamento, as alíquotas foram centrifugadas (6000 g por 5 min) e a concentração de proteínas foi determinada no sobrenadante através do ensaio de Bradford, segundo protocolo do fabricante. Inicialmente foram preparadas soluções padrão de BSA numa faixa de 0,1-1,4 mg/mL. 5  $\mu$ L de cada padrão de proteína e das amostras após centrifugação foram adicionados em diferentes poços de uma placa de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 250  $\mu$ L do reagente de Bradford (SIGMA). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min, e em seguida foi feita a leitura de absorvância à 595 nm.

### 3.2.4. Soros

Os soros de cães utilizados nos ensaios de ELISA foram fornecidos pela TECSA Laboratórios Ltda, uma empresa brasileira que realiza o diagnóstico de leptospirose por MAT. Os soros cedidos foram recebidos de tutores e seriam descartados após a execução dos testes de MAT. Nesse estudo, todas as amostras reagentes foram consideradas como sendo positivas ( $n = 57$ ), independente do título apresentado, enquanto as amostras não reagentes foram consideradas como sendo negativas ( $n = 22$ ). Além disso, foram utilizadas amostras de soro de cães criados no canil livre de contaminação por leptospirose ( $n = 5$ ), pertencentes à soroteca do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), gentilmente doadas pela professora Dr.<sup>a</sup> Juliana Rangel Lopes Fietto.

### 3.2.5. Avaliação do potencial no sorodiagnóstico

Após purificadas, as quimeras foram avaliadas quanto a seu potencial de aplicação no diagnóstico de leptospirose. Para tal, foi empregado ensaio de ELISA indireto, onde as proteínas recombinantes foram confrontadas com soros de cães previamente caracterizados, via MAT, quanto à presença de anticorpos para leptospirose.

A busca das condições ideais de ensaio iniciou-se com uma triagem, onde foram testadas três concentrações de proteína e três diluições de soro (*Tabela 3*). Essa etapa do trabalho

envolveu a detecção nos soros de anticorpos do tipo IgG, e foram utilizados oito soros MAT-positivos e oito MAT-negativos. As diferentes condições de concentração de proteínas e diluições de soro empregadas para cada quimera resultam de resultados preliminares obtidos pelo grupo (Silva, 2019). A efetividade das diferentes condições testadas foi avaliada através dos valores de acurácia, obtidos pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), construída no software *GraphPad Prism* (versão 6.0, para *Windows*).

**Tabela 3 - Códigos das combinações de quantidade de proteína e diluições de soro, testadas na etapa de triagem.** Para triagem foram testadas nove combinações para cada quimera, e realizado a detecção de anticorpos do tipo IgG. A Quimera 1 foi testada nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/poço, com soros diluídos nas proporções de 1:200, 1:400 e 1:600. Para a quimera 4 foram utilizadas as concentrações de 25, 50 e 100 ng/poço, com soros diluídos nas proporções de 1:400, 1:60 e 1:800. Foram empregados oito soros MAT-positivos e oito MAT-negativos.

| <b>Quimera 1 - IgG</b>   |   |                    |                   |
|--------------------------|---|--------------------|-------------------|
| <b>Diluições do soro</b> | <b>Quantidade de proteína (ng/poço)</b> |                    |                   |
|                          | <b>200</b>                              | <b>100</b>         | <b>50</b>         |
| <b>1:200</b>             | <i>Q1G.200.200</i>                      | <i>Q1G.100.200</i> | <i>Q1G.50.200</i> |
| <b>1:400</b>             | <i>Q1G.200.400</i>                      | <i>Q1G.100.400</i> | <i>Q1G.50.400</i> |
| <b>1:600</b>             | <i>Q1G.200.600</i>                      | <i>Q1G.100.600</i> | <i>Q1G.50.600</i> |
| <b>Quimera 4 - IgG</b>   |   |                    |                   |
| <b>Diluições do soro</b> | <b>Quantidade de proteína (ng/poço)</b> |                    |                   |
|                          | <b>100</b>                              | <b>50</b>          | <b>25</b>         |
| <b>1:400</b>             | <i>Q4G.100.400</i>                      | <i>Q4G.50.400</i>  | <i>Q4G.25.400</i> |
| <b>1:600</b>             | <i>Q4G.100.600</i>                      | <i>Q4G.50.600</i>  | <i>Q4G.25.600</i> |
| <b>1:800</b>             | <i>Q4G.100.800</i>                      | <i>Q4G.50.800</i>  | <i>Q4G.25.800</i> |

Fonte: Autor.

Em seguida, as condições mais promissoras para cada quimera foram testadas frente a 45 soros da biblioteca (26 MAT-positivos e 19 MAT-negativos), para a padronização da condição de trabalho. Os 45 soros foram utilizados também para padronização das condições para a detecção dos anticorpos do tipo IgM. Para isso foram testadas duas concentrações das proteínas e três diluições dos soros (*Tabela 4*).

Por fim, com as condições de trabalho padronizadas, os ELISAs foram realizados utilizando todos os 84 soros disponíveis na biblioteca, afim de avaliar o potencial de aplicação das quimeras no diagnóstico de leptospirose, em comparação com o MAT.

**Tabela 4 - Códigos das combinações de quantidade de proteína e diluições de soro testadas na padronização da detecção de anticorpos do tipo IgM.** Para triagem das condições para detecção de anticorpos do tipo IgM foram testadas seis combinações para cada quimera. Para ambas as quimeras foram testadas as concentrações de 50 e 100 ng/poço, com soros diluídos nas proporções de 1:100, 1:200 e 1:400. Foram empregados 26 soros MAT-positivos e 19 soros MAT-negativos.

| <b>Quimera 1 - IgM</b>   |   |                   |
|--------------------------|---|-------------------|
| <b>Diluições do soro</b> | <b>Quantidade de proteína (ng/poço)</b> |                   |
|                          | <b>100</b>                              | <b>50</b>         |
| <b>1:100</b>             | <i>Q1M.100.100</i>                      | <i>Q1M.50.100</i> |
| <b>1:200</b>             | <i>Q1M.100.100</i>                      | <i>Q1M.50.200</i> |
| <b>1:400</b>             | <i>Q1M.100.400</i>                      | <i>Q1M.50.400</i> |
| <b>Quimera 4 – IgM</b>   |   |                   |
| <b>Diluições do soro</b> | <b>Quantidade de proteína (ng/poço)</b> |                   |
|                          | <b>100</b>                              | <b>50</b>         |
| <b>1:100</b>             | <i>Q4M.100.100</i>                      | <i>Q4M.50.100</i> |
| <b>1:200</b>             | <i>Q4M.100.200</i>                      | <i>Q4M.50.200</i> |
| <b>1:400</b>             | <i>Q4M.100.400</i>                      | <i>Q4M.50.400</i> |

Fonte: Autor.

Todos os ELISAs das etapas de triagem, padronização e avaliação das quimeras foram realizados com o seguinte protocolo: as placas (Costar), foram sensibilizadas com as proteínas diluídas em tampão Carbonato (20 mM, pH 9,6) e incubadas a 4 °C overnight. Após as etapas de lavagem (200 µL de PBS-Tween 20 0,05 %) e bloqueio (200 µL de PBS-T, 3 % de BSA), foram aplicados os soros de cães diluídos em PBS-T (0,05 %). Após lavagem, as placas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (produzido em coelho; 1:2000; Imuny). Após lavagem, as placas foram incubadas com 100 µL/poço do substrato TMB (Scienco) à temperatura ambiente e protegidas da luz por 30 min. A reação foi parada pela adição de 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M. As leituras de absorbância foram realizadas a 450 nm numa leitora de microplacas Thermo Plate (TP-Reader).

Para as análises de IgM foi utilizado protocolo semelhante ao descrito anteriormente, mas substituindo a etapa de incubação com anticorpo anti-IgG por duas etapas de incubação, a primeira com anticorpo anti-IgM de cão (produzido em coelho; 1:10.000; SIGMA), e a segunda com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (produzido em cabra; 1:10.000; Bio-Rad). Além disso, após a adição de TMB as placas foram incubadas por 5 min antes da parada da reação.

O coeficiente de reatividade foi calculado pela divisão da D.O. medida obtida para cada soro pela média de D.O. dos controles negativos na placa. Sendo assim, esperou-se resultados negativos próximos de 1,0 e positivos maiores que 1,0 (De Souza *et al.*, 2020).

A performance do ELISA foi avaliada pelos parâmetros de acurácia, sensibilidade, especificidade, capacidade de predição de valores positivos (PPV) e negativos (NPV). O grau de concordância com o MAT, representado pelo índice kappa, foi calculado utilizando a ferramenta *QuickCalcs (GraphPad)*, e foi interpretado segundo Landis e Koch (1977): < 0.00, sem concordância; 0.00-0.20, ligeira concordância; 0.21-0.40, concordância aceitável; 0.41-0.60, concordância moderada; 0.61-0.80, concordância substancial; 0.81-1.00, concordância quase perfeita. O valor de cut-off, que representa o limite mais baixo do coeficiente de reatividade para um resultado positivo, foi determinado com base nos valores máximos de sensibilidade e especificidade, definidos pela métrica estatística *maximum-likelihood*.

### **3.2.6. Avaliação da estabilidade dos antígenos no diagnóstico**

Para a avaliação da estabilidade dos antígenos no diagnóstico foi utilizado ELISA indireto com protocolo semelhante ao descrito anteriormente, e empregando as mesmas condições de trabalho encontradas para cada quimera na etapa anterior do estudo. Entretanto, após a etapa de sensibilização com as quimeras, as placas foram armazenadas à 4 °C pelo período de três meses, e só então o ELISA foi finalizado (De Souza *et al.*, 2020). Neste ensaio foram utilizados 42 soros (25 MAT-positivos e 17 MAT-negativos).

### **3.2.7. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism* (versão 6.0, para *Windows*) e a ferramenta *QuickCalcs (GraphPad)*. A normalidade de cada conjunto de dados analisado foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. Para comparações de dois conjuntos de dados foi empregado teste t de Student, em caso de distribuição normal, e teste Mann-Whitney, caso contrário. A comparação de múltiplas médias foi feita através de ANOVA, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, para conjuntos de dados com distribuição gaussiana, e pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, para conjuntos de dados com distribuição não-normal. Todas as análises foram bicaudais e foi considerado significativo valor de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. *Patent Landscape*

#### 4.1.1. Escolha do tema e construção da estratégia de busca para recuperação dos documentos

Nessa etapa do trabalho temos como objetivo principal o entendimento do mercado de produtos biotecnológicos relacionados à medicina veterinária, particularmente àqueles voltados à saúde dos cães. Dentro desse campo, voltamos nosso foco para o estudo das doenças infecciosas, relatada como sendo a principal causa de morte desses animais no país. Damos ênfase ainda nas tecnologias relacionadas com o diagnóstico e prevenção dessas doenças. Foram selecionadas para o estudo as quatro doenças mais comumente relatadas como causa dos óbitos, cinomose, parvovirose, erliquiose e coronavirose, além de outras de importância reconhecida, babesiose, leishmaniose e leptospirose (Bentubo *et al.*, 2007; Trapp *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2016).

A obtenção dos documentos das patentes analisadas nesse trabalho foi realizada através da plataforma *Orbit Intelligence*. Além de ser uma das bases mais completas, essa plataforma permite uma busca facilitada dos documentos, bem como a exportação dos dados obtidos nas pesquisas em formato de planilha, facilitando sua análise.

Para a obtenção destes documentos foi necessário traçar a estratégia de busca, que permitiu a recuperação do máximo possível de patentes relevantes para a área de estudo, recuperando o mínimo de patentes não relacionadas. Empregamos para tal uma combinação de palavras-chave relacionadas ao tema, códigos de classificação do sistema internacional (Classificação Internacional de Patentes, IPC) e períodos temporais.

Realizamos diferentes buscas para recuperar documentos relacionados à cada uma das patologias estudadas. Em cada uma dessas buscas os campos referentes ao período temporal, o hospedeiro e as tecnologias foram mantidos. Os códigos ICP mais específicos, relacionados à cada uma das doenças e tecnologias estudadas, foram adicionados nas buscas, de forma a aumentar a abrangência da pesquisa.

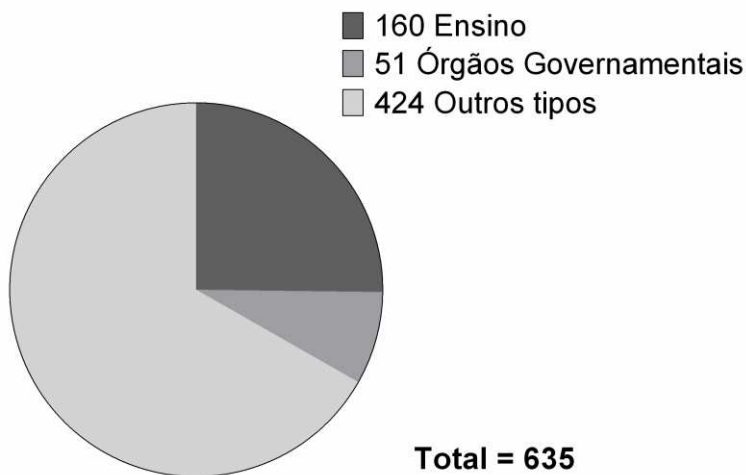
As buscas permitiram a recuperação de um total de 1258 documentos, que em seguida foram reduzidos para 1155, após uma etapa de curadoria manual, que envolveu a remoção de documentos duplicados e de famílias de patentes que tratam de assuntos não relacionados ao

tema proposto, e que foram recuperados de maneira errônea, devido a possíveis falhas na estratégia de busca ou ainda devido à erros no processo de cadastro dos pedidos, erros de digitação, entre outros.

#### 4.1.2. Características dos depositantes de patentes

A análise da base de documentos de patentes recuperados da plataforma *Orbit*, teve como objetivo a criação de um perfil acerca das instituições responsáveis pelo depósito dos pedidos de patentes. O estudo desta característica é importante pois são estas instituições que serão detentoras dos direitos comerciais sobre as tecnologias, caso os pedidos venham a ser aprovados.

**Figura 5 - Tipos de instituições responsáveis pelo depósito dos pedidos de patentes.** As instituições responsáveis foram divididas em três grupos, Ensino, Órgãos Governamentais e Outros tipos. No grupo Ensino estão instituições cujo foco principal seja o ensino, como faculdades e universidades, e outras ligadas à estas, como hospitais veterinários universitários. O grupo Órgãos Governamentais é composto por instituições governamentais não ligadas ao ensino, como centros de pesquisa. No grupo outros estão agrupadas instituições não governamentais cujo foco não seja ensino, principalmente empresas da área da saúde animal.



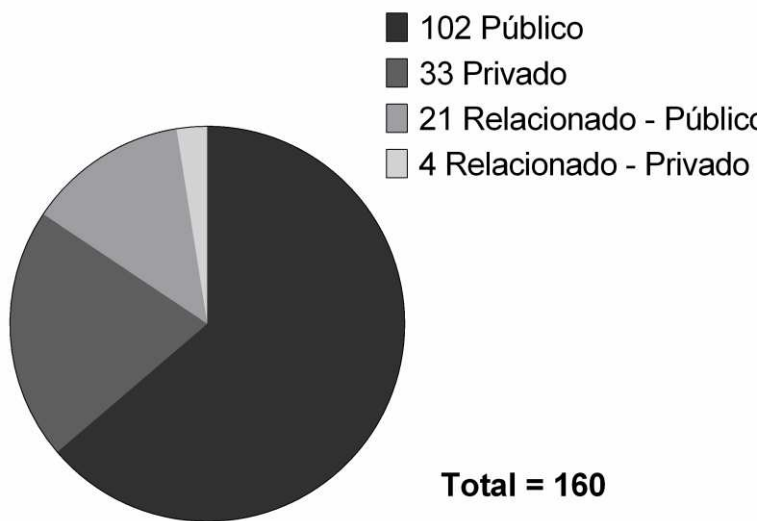
Fonte: Autor.

O primeiro dado obtido desta análise é o número de instituições. Os 1155 documentos recuperados são assinados por 635 instituições diferentes. Desse total, 160 instituições (cerca de 25 %) são instituições de ensino, como a Universidade Federal de Ouro Preto (BR) e a Colorado State University (US); 51 (8 %) são ligadas diretamente à algum órgão governamental, como por exemplo a Marinha e o Exército dos EUA (US) e a Sociedade Max Planck (DE). O restante são organizações privadas, em sua maioria com foco comercial, onde podemos citar a Zoetis (US) e a Merial (FR).

Das 160 instituições do grupo Ensino, mostradas na *Figura 5*, 135 (84 %) são efetivamente organizações dedicadas ao ensino, como universidades e faculdades, e 25 (16 %) são

delas são instituições relacionadas, como por exemplo o Boyce Thompson Institute, ligado à Cornell University (US), e o Imperial College of Science, Technology & Medicine, ligado ao Imperial College of London (GB). Além disso, 123 (77 %) delas são custeadas principalmente com verbas públicas, enquanto 37 (23 %) são organizações privadas.

**Figura 6 - Tipos de Instituições de Ensino responsáveis pelo depósito dos pedidos de patentes na área.** As instituições ligadas ao ensino foram divididas em Públicas e Privadas, considerando sua fonte primária de financiamento. Elas foram discriminadas ainda como sendo instituições de ensino diretamente, como as universidades, e instituições ligadas à estas, como hospitais veterinários universitários.



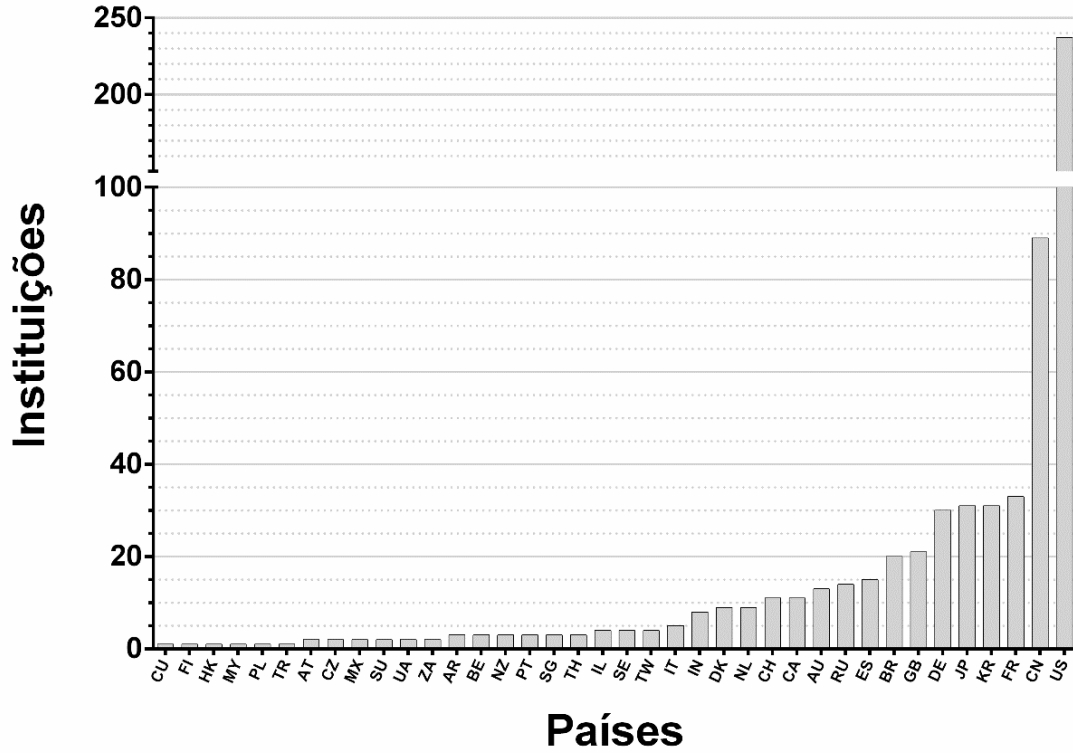
Fonte: Autor.

As organizações estão distribuídas por 38 países diferentes, mas 37 % delas (237) estão concentradas num mesmo território, os Estados Unidos da América. Em seguida estão a China, onde 89 instituições têm sua sede, França com 33, e Coréia do Sul e Japão com 31 cada. O Brasil aparece na oitava posição, com 20 instituições.

Em relação à quantidade de documentos, observamos que a maioria das organizações não tem um grande número de pedidos de patente, e poucas são as empresas que concentram grande número de documentos. Isso pode ser visto na *Fonte*: Autor.

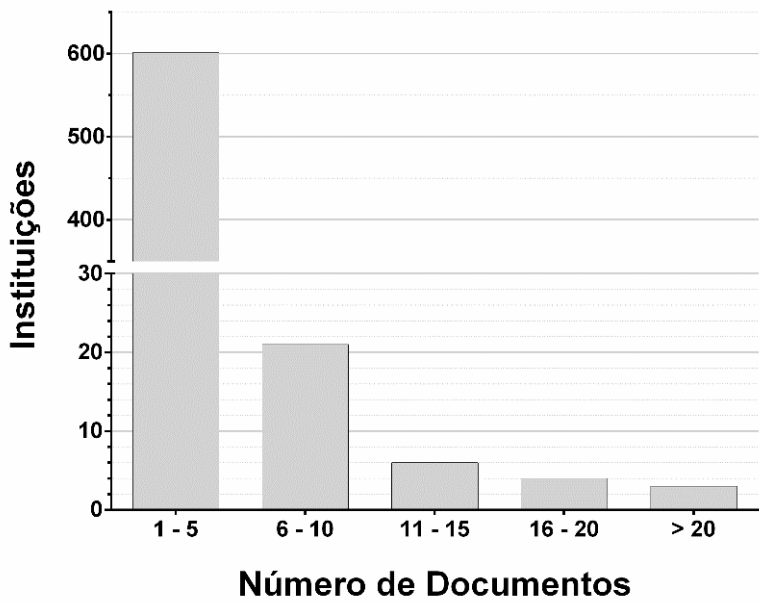
**Figura 8**, que mostra que mais de 600 organizações assinam entre um e cinco documentos, e somente três têm mais de 20 pedidos de patentes.

**Figura 7 - Distribuição das instituições por países.** As instituições foram agrupadas pelos países de suas sedes, mostrando que apesar de ter representantes de vários países ao redor do mundo, alguns poucos países concentram a maior parte dos responsáveis pelo desenvolvimento de novas tecnologias na área de saúde canina. A lista de correspondências entre códigos e nomes dos países está no *APÊNDICE A – CÓDIGOS DOS PAÍSES*.



Fonte: Autor.

**Figura 8 - Quantidade de documentos assinados por cada organização.** As instituições foram agrupadas conforme a quantidade total de pedidos de patentes realizada, mostrando que apenas algumas delas gera grande quantidade de novas tecnologias na área de saúde de cães, enquanto a maioria desenvolve trabalhos pontuais na área.

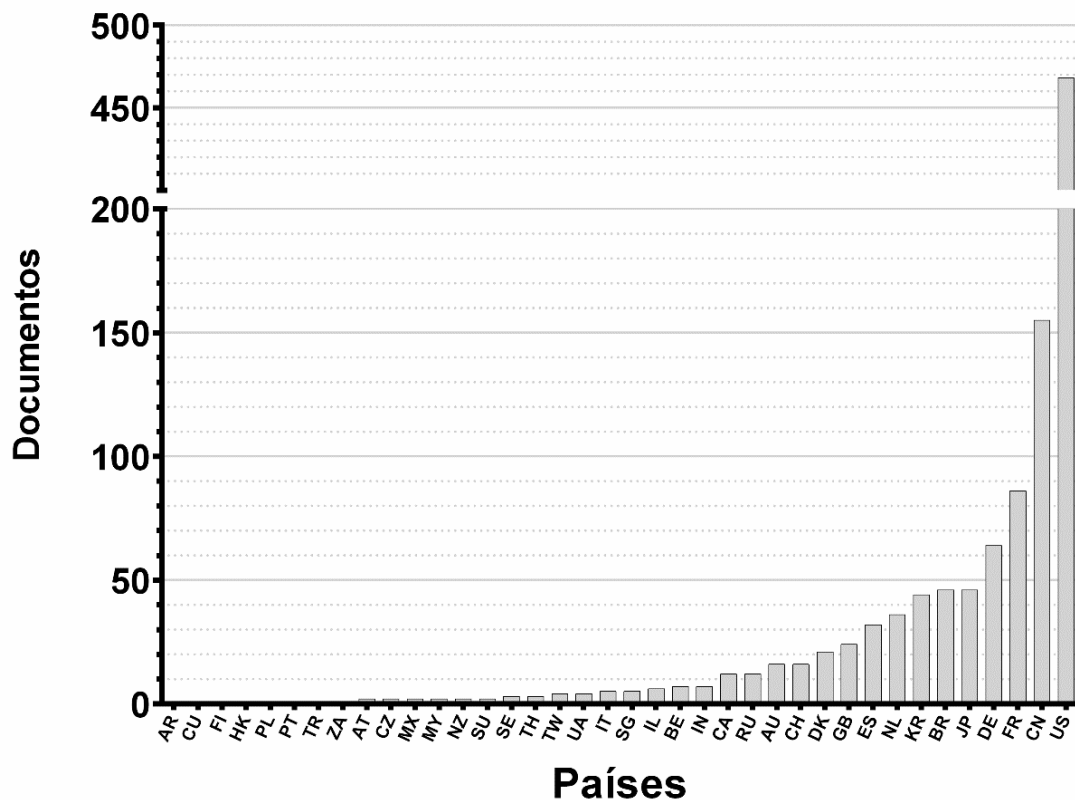


Fonte: Autor.

A instituição com mais documentos é a Merial, empresa com sede na França, subsidiária da alemã Boehringer Ingelheim, que detém 43 pedidos. Em seguida vem a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), uma universidade pública brasileira, que assina 25 documentos, e a Zoetis, uma empresa estadunidense subsidiária da Pfizer, com 23.

Em relação à distribuição de pedidos de patentes por países, mostrada na *Figura 9*, os três países com mais pedidos são os mesmos que concentram mais instituições. Os Estados Unidos da América têm o maior número de pedidos, 468, seguido da China com 155 e a França com 86. A partir deste ponto a classificação muda, com Alemanha em quarto, com 64 documentos, seguida por Brasil e Japão, com 46 pedidos cada.

**Figura 9 - Distribuição de pedidos de patentes por países.** A distribuição de pedidos de patentes por países segue a mesma tendência da distribuição das instituições, com os poucos países que concentram a maioria das instituições desenvolvedoras de tecnologia apresentando mais pedidos.



Fonte: Autor.

Os resultados mostram que, apesar de vários grupos ao redor do mundo estarem conduzindo pesquisas na área de vacinas e diagnósticos para doenças infecciosas caninas, existem alguns polos que concentram a maior parte do desenvolvimento tecnológico, destacando-se principalmente os EUA e a China. Além disso, apesar de boa parte das invenções serem desenvolvidas nos laboratórios das organizações comerciais, existem uma quantidade

considerável de instituições de ensino, especialmente públicas, envolvidas nesse tipo de trabalho, mostrando que o investimento governamental ainda é uma importante fonte de financiamento de pesquisas na área.

Estes resultados indicam que nosso grupo de pesquisa, que hoje investe cada vez mais no desenvolvimento de soluções no campo de vacinas e diagnóstico para leptospirose canina, está alinhado com o perfil de boa parte das instituições responsáveis pelo desenvolvimento de tecnologias na área de doenças infecciosas para cães. Com base nos dados coletados, observamos uma importante participação de instituições de ensino financiadas majoritariamente com recursos públicos.

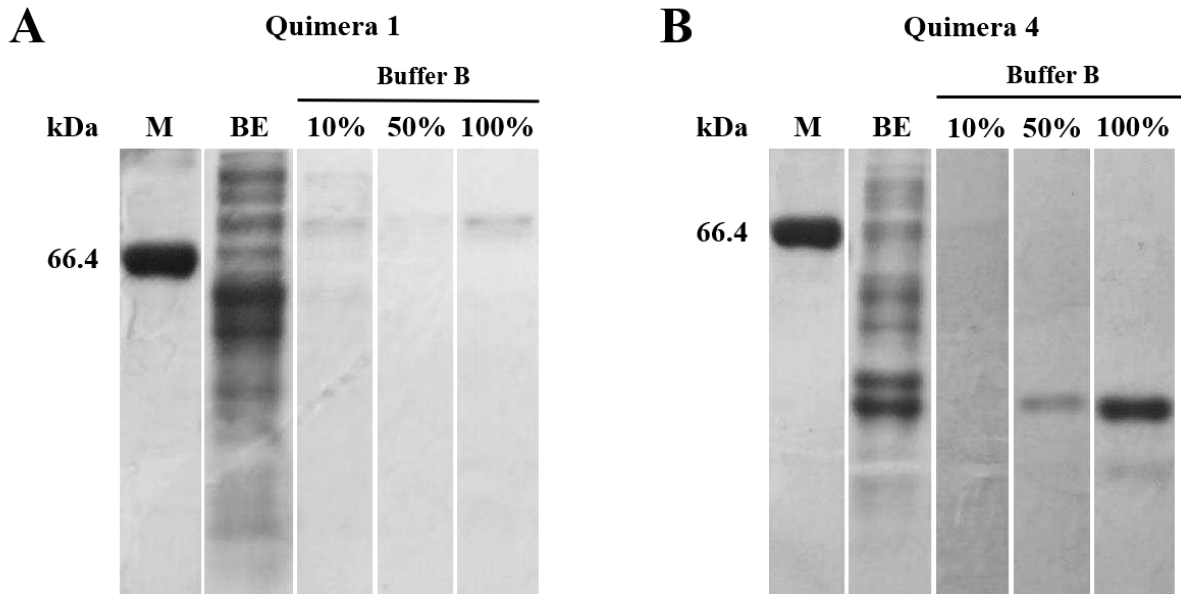
Entretanto, é importante notar que as empresas e organizações não-governamentais ainda representam a maior parcela dos produtores de novas tecnologias, o que indica que a busca de parcerias com este tipo de instituições pode beneficiar nossas pesquisas. Esse tipo de cooperação pode trazer, além de uma nova fonte de financiamento, uma oportunidade de realizar um intercâmbio de informações com parceiros mais experientes, acelerando o amadurecimento dos integrantes do grupo de pesquisa.

## **4.2. Desenvolvimento do teste de diagnóstico**

### **4.2.1. Expressão, purificação e estabilidade das quimeras**

Os vetores para a Quimera 1, produzido pela GenScript, e Quimera 4, produzido pela Biosystems, foram inseridos em *E. coli* BL21, e as proteínas foram produzidas em incubação por 16 h (120 rpm e 20 °C) induzida por IPTG. Após a etapas de lise, foi realizada purificação em FPLC, seguida por etapa de diálise para retirada do imidazol. Ambas as proteínas foram recuperadas e purificadas das frações solúveis, e como pode ser visto na *Figura 10*, apresentaram peso molecular consistente com o esperado, 73,2 kDa para a Quimera 1 e 29,5 kDa para a Quimera 4. A concentração das quimeras purificadas (frações mostradas nas canaletas 100 % do tampão B) foram estimadas em 536 µg/mL para a Quimera 1 e 637 µg/mL para a Quimera 4. O rendimento das induções foram 4,467 e 7,957 mg/L, para as Quimeras 1 e 4, respectivamente.

**Figura 10 - SDS-PAGE demonstrando a expressão e purificação das quimeras. (A)** SDS-PAGE colorido com coomassie brilliant blue da Quimera 1. Da esquerda para direita: Marcador de peso molecular (M), extrato bacteriano total induzido com IPTG (BE), degraus com 10, 50 e 100 % do tampão B; **(B)** SDS-PAGE colorido com coomassie brilliant blue da Quimera 4. Da esquerda para direita: Marcador de peso molecular (M), extrato bacteriano total induzido com IPTG (BE), degraus com 10, 50 e 100 % do tampão B.



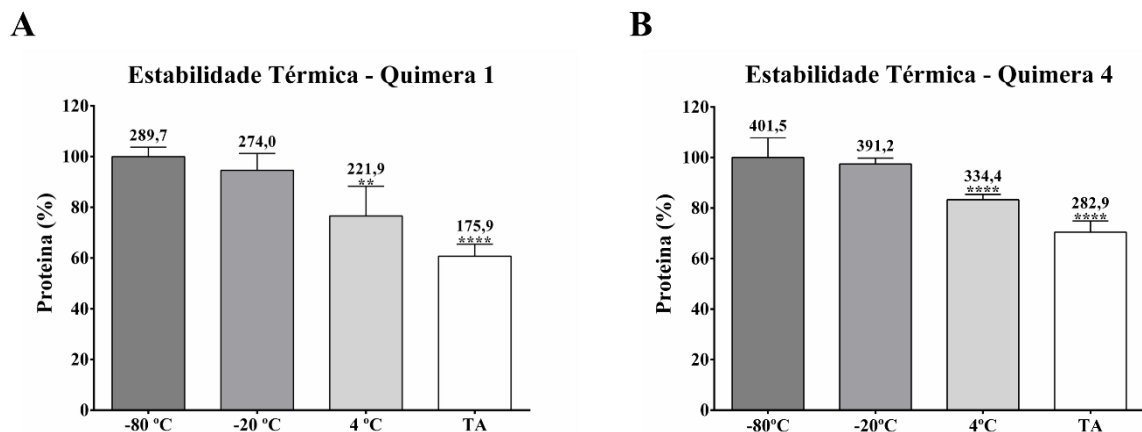
Fonte: Autor.

A estabilidade térmica das quimeras foi avaliada em quatro condições de temperatura de armazenamento,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e Temperatura Ambiente (TA). Após dois meses de armazenamento as amostras armazenadas à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentaram maior concentração de proteínas solúveis, por isso essa temperatura foi utilizada como referência na *Figura 11*. As amostras, de ambas as quimeras, armazenadas à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  não apresentaram perda significativa na concentração de proteínas solúveis em relação à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Já em temperaturas mais altas,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e TA, foi observado redução significativa na concentração das quimeras, de 24 % e 40 %, respectivamente, para a Quimera 1, e 17 % e 29%, respectivamente, para a Quimera 4, indicando menor estabilidade térmica nessas condições de armazenamento.

É importante notar que foi observada uma diferença significativa entre as concentrações de proteínas medidas pelo método de Bradford e pelo método de  $A_{280}$ , com redução da concentração de aproximadamente 50 % para a Quimera 1 e 40 % para a Quimera 4, ambas armazenadas na temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Essa diferença pode estar relacionada com a perda de proteínas entre as duas medidas, que foram realizadas com dois meses de diferença, mas também pode estar ligada ao fato de ambas as proteínas apresentarem poucos resíduos de arginina e histidina (menos de 1 % de cada um dos resíduos), que já foram descritos como apresentando uma melhor interação com o corante usado neste método colorimétrico (Compton e Jones, 1985). A baixa concentração desses resíduos pode estar influenciando a capacidade de

interação das proteínas e, conseqüentemente, interferindo na exatidão das medidas realizadas. Sendo assim, é possível que outras metodologias de determinação de proteínas sejam mais adequadas para as quimeras em estudo.

**Figura 11 - Estabilidade térmica das quimeras em diferentes temperaturas de armazenamento.** As amostras foram armazenadas durante dois meses em diferentes condições de temperatura, e em seguida a concentração e proteínas foi determinada pelo método de Bradford. Os dados foram normalizados considerando a maior concentração obtida, no armazenamento à -80 °C, como 100 %. O valor mostrado no topo de cada coluna corresponde à concentração encontrada, dada em µg/mL. Temperatura ambiente (TA). Os resultados representam a concentração relativa  $\pm$  desvio padrão calculado do ensaio realizado em triplicata.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



Fonte: Autor.

Os resultados do SDS-PAGE sugerem que as condições empregadas nas etapas de expressão e purificação das quimeras foram eficientes, permitindo a obtenção de proteínas com elevado nível de purificação, fator importante para sua aplicação com sucesso no ELISA. Além disso, os resultados no ensaio de estabilidade térmica indicam que a proteína pode ser armazenada por longos períodos em condições de baixa temperatura (-20 e -80 °C) sem apresentar perdas significativas em sua concentração por precipitação. Essa característica, além de ser importante para garantir a confiabilidade do material utilizado durante o estudo, pode indicar que a quimera tem potencial de ser aplicada em um produto biotecnológico, por apresentar um tempo de prateleira relevante.

## 4.2.2. Avaliação do potencial no sorodiagnóstico

### 4.2.2.1. Triagem inicial das condições de ensaio

Para avaliação do potencial para aplicação no diagnóstico de leptospirose, cada uma das quimeras produzidas foi avaliada em relação à sua capacidade de ser reconhecida por anticorpos dos tipos IgG e IgM através de ELISA indireto, onde cada quimera foi utilizada como antígeno. Com intuito de encontrar as condições ideais de trabalho para cada quimera, foi realizada uma triagem com diferentes combinações de quantidade de antígeno utilizado para a sensibilização

das placas e a diluição dos soros utilizados, como mostrado na *Tabela 3*. Inicialmente foi feita a detecção de anticorpos do tipo IgG.

Devido a sensibilidade do método de ELISA, os valores absolutos de absorbância podem variar devido a diversos fatores externos, como temperatura, agitação das placas, tempo de reação da enzima com o substrato, entre outros. Isso traz problemas quando se tenta comparar o resultado de ensaios realizados em diferentes períodos e condições. Para tentar mitigar este efeito, foi calculado o coeficiente de reatividade das amostras testadas, em cada condição experimental. O coeficiente de reatividade é a relação entre o valor de absorbância da amostra do indivíduo e a média dos valores dos controles negativos (De Souza *et al.*, 2020).

Com os dados de coeficiente de reatividade, foram construídas as curvas ROC (mostradas no *APÊNDICE B – GRÁFICOS TRIAGENS*), que permitiram a determinação da acurácia do diagnóstico em cada condição (*Tabela 5*). As combinações que apresentaram acurácia maior do que 95 % (destacadas na tabela) foram selecionadas para a sequência do estudo.

**Tabela 5 – Triagem para determinação das condições de testagem mais promissoras para diagnóstico de leptospirose.** Nesse ensaio foi feita a detecção de anticorpos do tipo IgG, e foram empregados 16 soros, 8 MAT-positivos e 8 MAT-negativos. A Quimera 1 foi testada nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/poço, com soros diluídos nas proporções de 1:200, 1:400 e 1:600. Para a quimera 4 foram utilizadas as concentrações de 25, 50 e 100 ng/poço, com soros diluídos nas proporções de 1:400, 1:60 e 1:800.

| <i>Quimera 1</i>   |              | <i>Quimera 4</i>   |              |
|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| Condição           | Acurácia (%) | Condição           | Acurácia (%) |
| <i>Q1G.200.200</i> | 89,06        | <i>Q4G.100.400</i> | 100,00       |
| <i>Q1G.200.400</i> | 89,06        | <i>Q4G.100.600</i> | 78,13        |
| <i>Q1G.200.600</i> | 85,94        | <i>Q4G.100.800</i> | 100,00       |
| <i>Q1G.100.200</i> | 98,44        | <i>Q4G.50.400</i>  | 93,75        |
| <i>Q1G.100.400</i> | 96,09        | <i>Q4G.50.600</i>  | 98,44        |
| <i>Q1G.100.600</i> | 93,75        | <i>Q4G.50.800</i>  | 100,00       |
| <i>Q1G.50.200</i>  | 96,88        | <i>Q4G.25.400</i>  | 93,76        |
| <i>Q1G.50.400</i>  | 100,00       | <i>Q4G.25.600</i>  | 57,03        |
| <i>Q1G.50.600</i>  | 87,50        | <i>Q4G.25.800</i>  | 89,06        |

Fonte: Autor.

#### 4.2.2.2. Padronização das condições de detecção de anticorpos IgG e IgM

A baixa quantidade de soros empregados durante a triagem pode levar à um resultado que não representa com fidelidade o real potencial de cada combinação de ser utilizada para o diagnóstico. Sendo assim, na segunda rodada de testes, as quatro condições que apresentaram resultados mais promissores para cada quimera foram confrontadas com um número maior de

soros, a fim de padronizar as condições de trabalho ideal para aplicação no diagnóstico. Mais uma vez, os dados de coeficiente de reatividade foram utilizados para a construção da curva ROC (*APÊNDICE C – GRÁFICOS PADRONIZAÇÕES*), que permitiu a obtenção dos parâmetros de acurácia, sensibilidade e especificidade para cada condição testada.

**Tabela 6 - Padronização das condições para detecção de anticorpos do tipo IgG.** As quatro condições que apresentaram maior potencial na triagem foram testadas com maior quantidade de soros para avaliarmos os parâmetros e Acurácia, Sensibilidade e Especificidade, permitindo a identificação da condição com maior potencial de ser empregada no diagnóstico. Para o ensaio foram utilizados 45 soros, sendo 26 MAT-positivos e 19 MAT-negativos.

| Condição                 | Acurácia (%) | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | Cut-Off      |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------|
| <i>Q1G.100.200</i>       | 85,73        | 80,77             | 78,95              | 1,601        |
| <i>Q1G.100.400</i>       | 82,29        | 84,62             | 68,42              | 1,148        |
| <b><i>Q1G.50.200</i></b> | <b>85,22</b> | <b>80,77</b>      | <b>78,95</b>       | <b>1,366</b> |
| <i>Q1G.50.400</i>        | 84,21        | 76,92             | 78,95              | 1,195        |
| <i>Q4G.100.400</i>       | 85,22        | 92,31             | 68,42              | 1,307        |
| <i>Q4G.100.800</i>       | 81,78        | 69,23             | 84,21              | 1,162        |
| <b><i>Q4G.50.600</i></b> | <b>91,70</b> | <b>88,46</b>      | <b>84,21</b>       | <b>1,508</b> |
| <i>Q4G.50.800</i>        | 80,97        | 69,23             | 84,21              | 1,373        |

Fonte: Autor.

Com pode ser visto na *Tabela 6*, para a Quimera 1, as condições *Q1G.100.200* e *Q1G.50.200* apresentaram os parâmetros de acurácia, sensibilidade e especificidade, iguais entre si, e superiores às outras combinações testadas. Para a escolha de qual delas teria mais potencial de ser empregada no diagnóstico, levamos em consideração que *Q1G.50.200* utiliza 50 ng de proteína por poço, metade da quantidade utilizada na outra condição, o que a torna um candidato mais promissor no contexto de aplicação comercial. Para a Quimera 4, a combinação *Q4G.50.600* apresentou o melhor parâmetro de acurácia, e o melhor balanço entre sensibilidade e especificidade, fazendo com que fosse escolhida como condição mais promissora para essa proteína.

Os resultados da triagem também foram utilizados para nortear a escolha das concentrações das quimeras que seriam utilizadas na padronização das condições para detecção de anticorpos do tipo IgM. Como os melhores resultados para o IgG foram encontrados em concentrações de 50 e 100 ng/poço, elas foram escolhidas para o ensaio de IgM.

**Tabela 7 - Padronização das condições para detecção de anticorpos do tipo IgM.** Partindo dos resultados obtidos na detecção de anticorpos do tipo IgG, seis condições foram testadas para cada quimera para a seleção da condição com maior potencial para a detecção de anticorpos do tipo IgM. Foram utilizados os parâmetros de Acurácia, Sensibilidade e Especificidade para seleção da condição com maior potencial. Para ambas as quimeras foram testadas as concentrações de 50 e 100 ng/poço, com soros diluídos nas proporções de 1:100, 1:200 e 1:400, e no ensaio foram utilizados 45 soros, sendo 26 MAT-positivos e 19 MAT-negativos.

| Condição           | Acurácia (%) | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | Cut-Off      |
|--------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------|
| <i>Q1M.100.100</i> | 79,96        | 73,08             | 84,21              | 1,281        |
| <i>Q1M.100.200</i> | 82,59        | 84,62             | 78,95              | 1,293        |
| <i>Q1M.100.400</i> | 81,17        | 84,62             | 73,68              | 1,249        |
| <i>Q1M.50.100</i>  | 72,87        | 73,08             | 68,42              | 1,190        |
| <i>Q1M.50.200</i>  | 82,19        | 73,08             | 84,21              | 1,369        |
| <i>Q1M.50.400</i>  | <b>83,00</b> | <b>76,92</b>      | <b>84,21</b>       | <b>1,296</b> |
| <i>Q4M.100.100</i> | 60,93        | 69,23             | 68,42              | 1,238        |
| <i>Q4M.100.200</i> | 76,72        | 88,46             | 57,89              | 0,870        |
| <i>Q4M.100.400</i> | 81,98        | 80,77             | 78,95              | 1,206        |
| <i>Q4M.50.100</i>  | 72,77        | 65,38             | 73,68              | 1,037        |
| <i>Q4M.50.200</i>  | 79,55        | 69,23             | 84,21              | 1,155        |
| <i>Q4M.50.400</i>  | <b>79,05</b> | <b>76,92</b>      | <b>84,21</b>       | <b>1,083</b> |

Fonte: Autor.

Da mesma forma que foi feito para a padronização da detecção de IgG, levamos em consideração os parâmetros de acurácia, sensibilidade e especificidade (*Tabela 7*), e a concentração utilizada das quimeras. Sendo assim, foram escolhidas as condições *Q1M.50.400*, para a Quimera 1, e *Q4M.50.400*, para a Quimera 4. Esta última, apesar de não oferecer o maior valor de acurácia entre as combinações testadas para a quimera, apresentou resultado próximo utilizando uma quantidade menor da proteína recombinante. Além disso, ela utiliza a mesma concentração de proteínas escolhida para o teste de IgG, o que, num contexto de produção para uso comercial, permitiria que a mesma placa fosse utilizada para detecção de ambos os tipos de anticorpos.

Os valores de *cut-off* mostrados na *Tabela 7* foram determinados com base nos valores máximos de sensibilidade e especificidade, definidos pela métrica estatística *maximum-likelihood*. Eles foram utilizados nas etapas subsequentes das análises, para determinar quais resultados são considerados positivos ou negativos.

#### 4.2.2.3. Avaliação da performance do ELISA

As condições escolhidas na etapa de padronização foram então testadas frente a todos os 85 soros que compõe nossa biblioteca, e avaliamos a performance do ensaio, usando como referência os resultados do MAT.

**Tabela 8 - Avaliação da performance do ELISA com as Quimeras 1 e 4, em comparação com os resultados do MAT.** Os parâmetros utilizados para avaliação da eficiência do diagnóstico são acurácia, sensibilidade, especificidade, capacidade de predição de valores positivos (PPV) e negativos (NPV), e índice kappa, que expressa a concordância entre os métodos.

| Quimera 1<br>50 ng/poço | IgG<br>1:200 |    | Total |
|-------------------------|--------------|----|-------|
|                         | MAT          |    |       |
| ELISA                   | +            | -  |       |
| +                       | 38           | 7  | 45    |
| -                       | 19           | 21 | 40    |
| Total                   | 57           | 28 | 85    |

| Parâmetros     | %                  |
|----------------|--------------------|
| Acurácia       | 69,41              |
| Sensibilidade  | 66,67              |
| Especificidade | 75,00              |
| PPV            | 84,45              |
| NPV            | 52,50              |
| Índice Kappa   | 0,38 ( $\pm$ 0,10) |

| Quimera 1<br>50 ng/poço | IgM<br>1:400 |    | Total |
|-------------------------|--------------|----|-------|
|                         | MAT          |    |       |
| ELISA                   | +            | -  |       |
| +                       | 31           | 9  | 40    |
| -                       | 26           | 19 | 45    |
| Total                   | 57           | 28 | 85    |

| Parâmetros     | %                  |
|----------------|--------------------|
| Acurácia       | 58,82              |
| Sensibilidade  | 54,39              |
| Especificidade | 67,86              |
| PPV            | 77,50              |
| NPV            | 42,22              |
| Índice Kappa   | 0,19 ( $\pm$ 0,10) |

| Quimera 4<br>50 ng/poço | IgG<br>1:600 |    | Total |
|-------------------------|--------------|----|-------|
|                         | MAT          |    |       |
| ELISA                   | +            | -  |       |
| +                       | 43           | 7  | 50    |
| -                       | 14           | 21 | 35    |
| Total                   | 57           | 28 | 85    |

| Parâmetros     | %                  |
|----------------|--------------------|
| Acurácia       | 75,29              |
| Sensibilidade  | 75,44              |
| Especificidade | 75,00              |
| PPV            | 86,00              |
| NPV            | 60,00              |
| Índice Kappa   | 0,47 ( $\pm$ 0,10) |

| Quimera 4<br>50 ng/poço | IgM<br>1:400 |    | Total |
|-------------------------|--------------|----|-------|
|                         | MAT          |    |       |
| ELISA                   | +            | -  |       |
| +                       | 31           | 10 | 41    |
| -                       | 26           | 18 | 44    |
| Total                   | 57           | 28 | 85    |

| Parâmetros     | %                  |
|----------------|--------------------|
| Acurácia       | 57,65              |
| Sensibilidade  | 54,39              |
| Especificidade | 64,29              |
| PPV            | 75,61              |
| NPV            | 40,91              |
| Índice Kappa   | 0,16 ( $\pm$ 0,10) |

Fonte: Autor.

De um modo geral, as condições utilizadas se mostraram menos eficientes do que nos ensaios de padronização. Entretanto, ambas as quimeras demonstraram alta capacidade de predição dos valores positivos, com os ensaios de detecção de IgG apresentando PPV de aproximadamente 85 %, e os de detecção de IgM de aproximadamente 75 %. Isso indica que,

para cada cinco soros positivos para IgG, os testes diagnosticariam quatro corretamente, e para cada quatro amostras positivas para IgM, três delas apresentariam o diagnóstico correto. Os testes parecem ser menos eficientes no diagnóstico de amostras negativas, pois os resultados de NPV ficaram próximos de 40 %, no teste de IgM, e entre 50 e 60 %, no ensaio de detecção de IgG.

Quando comparamos os resultados das duas quimeras, é possível notar que a Quimera 1 apresentou resultados ligeiramente superiores para a detecção dos anticorpos do tipo IgM. Enquanto isso, a Quimera 4 foi mais eficiente na detecção de anticorpos do tipo IgG, apresentando uma concordância moderada com os resultados do MAT.

Uma análise conjunta dos resultados obtidos nos ensaios com as duas quimeras resultou em um ligeiro aumento nos parâmetros de qualidade do diagnóstico por ELISA, como pode ser visto na *Tabela 9*. Isso indica que o reconhecimento obtido pelas quimeras pode ser complementar, e seu uso em conjunto pode levar à um produto mais eficaz.

**Tabela 9 - Análise conjunta dos resultados obtidos com as Quimeras 1 e 4.** Para essa análise, a classificação das amostras foi realizada utilizando os resultados dos testes com ambas as quimeras; foram consideradas positivas as amostras com resultado positivo no teste com pelo menos uma das quimeras, e foram consideradas negativas aquelas amostras que apresentaram resultados negativos nos testes com ambas as quimeras.

| Quim. 1-4<br>50 ng/poço |    |    |       | IgG |  | Parâmetros     | %             |
|-------------------------|----|----|-------|-----|--|----------------|---------------|
|                         |    |    |       | MAT |  | Acurácia       | 80,00         |
| ELISA                   | +  | -  | Total |     |  | Sensibilidade  | 85,96         |
| +                       | 49 | 9  | 58    |     |  | Especificidade | 67,86         |
| -                       | 8  | 19 | 27    |     |  | PPV            | 84,48         |
| Total                   | 57 | 28 | 85    |     |  | NPV            | 70,36         |
|                         |    |    |       |     |  | Índice Kappa   | 0,54 (± 0,10) |

| Quim. 1-4<br>50 ng/poço |    |    |       | IgM |  | Parâmetros     | %             |
|-------------------------|----|----|-------|-----|--|----------------|---------------|
|                         |    |    |       | MAT |  | Acurácia       | 64,71         |
| ELISA                   | +  | -  | Total |     |  | Sensibilidade  | 70,18         |
| +                       | 40 | 13 | 53    |     |  | Especificidade | 53,57         |
| -                       | 17 | 15 | 32    |     |  | PPV            | 75,47         |
| Total                   | 57 | 28 | 85    |     |  | NPV            | 46,88         |
|                         |    |    |       |     |  | Índice Kappa   | 0,23 (± 0,11) |

Fonte: Autor.

A análise das tabelas nos mostra que, em parte das amostras, os resultados de ELISA e MAT não concordaram, apresentando resultado positivo para um dos testes e negativo para outro. Apesar dessas observações indicarem, a princípio, uma baixa afinidade das quimeras aos

anticorpos anti-leptospira, e a possibilidade de estarem ocorrendo interações inespecíficas, é importante notar que existem outras explicações para os resultados observados.

Uma das hipóteses que podemos levantar está relacionada à incapacidade do ensaio de microaglutinação identificar anticorpos não-aglutinantes. O ELISA indireto não tem essa limitação por depender apenas do reconhecimento entre antígeno-anticorpo, e não do processo de aglutinação, para uma resposta positiva (Cariou *et al.*, 2020). Outro fator importante que pode explicar a não concordância entre os resultados de ELISA e MAT, é que as bactérias utilizadas nesse último podem não apresentar o mesmo perfil de antígenos daquelas responsáveis pela infecção, por serem cultivadas *in vitro*, podendo perder alguns dos fatores de virulência (Matsunaga *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2014). Sendo assim, o ELISA apresenta o potencial de reconhecer uma variedade maior de anticorpos, o que poderia explicar o número de amostras MAT negativas que apresentaram resultados positivos no ELISA. Além disso, o fato do ensaio de microaglutinação não conseguir diferenciar anticorpos do tipo IgG e IgM, enquanto o ELISA é específico para cada um dos tipos, poderia ser uma explicação para os resultados de algumas amostras que foram negativas no ELISA e positivas no MAT. Como as mesmas amostras de soro foram empregadas na avaliação da detecção de ambos os anticorpos, é natural que algumas delas tenham apresentado resultado positivo para apenas uma das variedades de anticorpos, tendo em vista que IgG e IgM não coexistem durante todo o curso da resposta imune, sendo o IgM predominante na etapa inicial e o IgG na final (Picardeau, *et al.*, 2014; Waleed *et al.*, 2016).

Com isso, existe a possibilidade de que a falta de concordância entre os métodos, para determinadas amostras, seja uma evidência de que o ELISA indireto, utilizando as quimeras empregadas nesse estudo, possa apresentar maior acurácia quando comparado ao MAT. Isso corrobora as observações feitas por Ye e colaboradores (2014) e Cariou e colaboradores (2020) que, ao desenvolverem testes de ELISA indireto para o diagnóstico de leptospirose em cães, também observaram evidências de que seus testes poderiam ser mais sensíveis do que o padrão atualmente utilizado.

#### **4.2.2.4. Avaliação da estabilidade dos antígenos**

No teste de estabilidade dos antígenos, as placas sensibilizadas com as quimeras foram armazenadas à 4 °C por três meses, antes de procedermos as etapas de ligação dos anticorpos e revelação dos resultados. Como pode ser visto na *Tabela 10*, a sensibilidade dos testes sofreu uma grande redução, em especial na determinação do IgG, enquanto a especificidade foi

aumentada na determinação de IgM. Esse fenômeno pode estar relacionado com a perda da afinidade dos anticorpos pelas proteínas recombinantes, que levaria à uma redução nos valores de absorvância e coeficiente de reatividade, e conseqüentemente à uma redução no número de resultados positivos e aumento de resultados negativos. Essa hipótese é corroborada com os resultados de estabilidade térmica das quimeras, que demonstraram uma redução significativa na sua concentração após período armazenado na temperatura de 4 °C (*Figura 11*).

**Tabela 10 - Avaliação da estabilidade dos antígenos.** Para avaliação da estabilidade dos antígenos, após a sensibilização com as Quimeras 1 e 4, as placas foram armazenadas à 4 °C durante três meses, e só então procedemos com as etapas subsequentes do ELISA. Foram empregadas as mesmas condições de concentração de proteínas e diluição dos soros selecionadas anteriormente na etapa de padronização.

| <b>Quimera 1</b>  |    | <b>IgG</b>   |       | <b>Parâmetros</b> |               | <b>%</b> |
|-------------------|----|--------------|-------|-------------------|---------------|----------|
| <b>50 ng/poço</b> |    | <b>1:200</b> |       |                   |               |          |
|                   |    | MAT          |       |                   |               |          |
| ELISA             | +  | -            | Total |                   |               |          |
| +                 | 12 | 4            | 16    | Acurácia          | 59,52         |          |
| -                 | 13 | 13           | 26    | Sensibilidade     | 48,00         |          |
| Total             | 25 | 17           | 42    | Especificidade    | 76,47         |          |
|                   |    |              |       | PPV               | 75,00         |          |
|                   |    |              |       | NPV               | 50,00         |          |
|                   |    |              |       | Índice Kappa      | 0,23 (± 0,14) |          |

| <b>Quimera 1</b>  |    | <b>IgM</b>   |       | <b>Parâmetros</b> |               | <b>%</b> |
|-------------------|----|--------------|-------|-------------------|---------------|----------|
| <b>50 ng/poço</b> |    | <b>1:400</b> |       |                   |               |          |
|                   |    | MAT          |       |                   |               |          |
| ELISA             | +  | -            | Total |                   |               |          |
| +                 | 11 | 2            | 13    | Acurácia          | 61,90         |          |
| -                 | 14 | 15           | 29    | Sensibilidade     | 44,00         |          |
| Total             | 25 | 17           | 42    | Especificidade    | 88,24         |          |
|                   |    |              |       | PPV               | 84,62         |          |
|                   |    |              |       | NPV               | 51,73         |          |
|                   |    |              |       | Índice Kappa      | 0,29 (± 0,12) |          |

| <b>Quimera 4</b>  |    | <b>IgG</b>   |       | <b>Parâmetros</b> |               | <b>%</b> |
|-------------------|----|--------------|-------|-------------------|---------------|----------|
| <b>50 ng/poço</b> |    | <b>1:600</b> |       |                   |               |          |
|                   |    | MAT          |       |                   |               |          |
| ELISA             | +  | -            | Total |                   |               |          |
| +                 | 13 | 4            | 17    | Acurácia          | 61,90         |          |
| -                 | 12 | 13           | 25    | Sensibilidade     | 52,00         |          |
| Total             | 25 | 17           | 42    | Especificidade    | 76,47         |          |
|                   |    |              |       | PPV               | 76,47         |          |
|                   |    |              |       | NPV               | 52,00         |          |
|                   |    |              |       | Índice Kappa      | 0,27 (± 0,14) |          |

| Quimera 4<br>50 ng/poço | IgM<br>1:400 |    | Total |
|-------------------------|--------------|----|-------|
|                         | MAT          |    |       |
| ELISA                   | +            | -  |       |
| +                       | 10           | 2  | 12    |
| -                       | 15           | 15 | 30    |
| Total                   | 25           | 17 | 42    |

Fonte: Autor.

| Parâmetros     | %                  |
|----------------|--------------------|
| Acurácia       | 59,52              |
| Sensibilidade  | 40,00              |
| Especificidade | 88,24              |
| PPV            | 83,34              |
| NPV            | 50,01              |
| Índice Kappa   | 0,25 ( $\pm$ 0,12) |

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho construímos um *patent landscape*, descrevendo o cenário de desenvolvimento de produtos biotecnológicos relacionados à saúde canina, em especial o campo de doenças infecciosas. Com os dados obtidos nesse *patent landscape* foi possível observar que a maior parcela dos desenvolvedores de novas tecnologias nessa área são instituições com finalidade comercial. Entretanto observamos também uma quantidade relevante de instituições de ensino, na grande maioria de financiamento majoritariamente público, participando do desenvolvimento biotecnológico. Realizamos também a produção heteróloga, em *E. coli*, e purificação de duas proteínas quiméricas construídas com base em regiões imunogênicas de proteínas da superfície celular de leptospiros. Demonstramos ainda o potencial dessas quimeras para aplicação no diagnóstico sorológico de leptospirose canina, as utilizando como antígenos em metodologia de ELISA indireto, que poderia ser empregado como ensaio complementar ao diagnóstico por MAT.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Assad; ZHANG, Limin; KHAN, Samee U. A literature review on the state-of-the-art in patent analysis. *World Patent Information*, v. 37, p. 3-13, 2014.
- ACHA, Pedro N.; SZYFRES, Boris. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Pan American Health Org, 2003.
- ALCAYAGA, Eduardo Lobo *et al.* Educação ambiental em saúde pública: mitigação da leptospirose humana e animal nos municípios que integram a bacia hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa, série Biologia*, v. 20, n. 2, p. 5, 2007.
- AMBILY, R. *et al.* Utility of recombinant LipL41 based IgM and IgG ELISA in diagnosis of canine leptospirosis in an endemic area—a study from Kerala, India. *Tropical biomedicine*, v. 36, n. 3, p. 654-663, 2019.
- ARAÚJO, V. E. M. *et al.* Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002 Frequency of anti-*Leptospira interrogans* agglutinins in bovine serum samples in Minas Gerais, Brazil, 1980 to 2002. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.
- AVIAT, F. *et al.* Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 33, n. 5, p. 375-387, 2010.
- AZEVEDO, Sérgio Santos de *et al.* The effects of the leptospiral infection on reproductive performance in sows. *Veterinarski arhiv*, v. 78, n. 1, p. 13-21, 2008.
- BARBOSA, Angela S. *et al.* Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infection and immunity*, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.
- BARRAGAN, Veronica *et al.* Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. *Applied and environmental microbiology*, v. 83, n. 19, p. e01190-17, 2017.
- BASHIRU, Garba; BAHAMAN, Abdul Rani. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. *The Indian journal of medical research*, v. 147, n. 1, p. 15, 2018.
- BATISTA, Emanuelle Karine Frota *et al.* Estudo retrospectivo de diagnósticos post-mortem de cães e gatos necropsiados no Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil de 2009 a 2014. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 53, n. 1, p. 88-96, 2016.

- BEHERA, S. K. *et al.* Evaluation of the diagnostic potential and DIVA capability of recombinant LigBCon1-5 protein of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in canine leptospirosis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 22, n. 2, p. 120, 2021.
- BENTUBO, Henri Donnarumma Levy *et al.* Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.
- BHARTI, Ajay R. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.
- BRASIL (1996). Lei da Propriedade Industrial - Lei Nº 9.279 de 14 de maio de 1996. In: Brasília.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Boletim Epidemiológico: volume 49. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- CAGLIERO, Julie; VILLANUEVA, Sharon YAM; MATSUI, Mariko. Leptospirosis pathophysiology: into the storm of cytokines. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, p. 204, 2018.
- CARIOU, Carine *et al.* Development of antibody ELISA specific of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa, Canicola, and Icterohaemorrhagiae to monitor vaccine immunogenicity. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 219, p. 109960, 2020.
- CERQUEIRA, G. M. and PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 760–768, 2009.
- COMPTON, Steve J.; JONES, Clive G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.
- COUTINHO, Mariana L. *et al.* A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 12, p. e1422, 2011.
- CULLEN, Paul A. *et al.* Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and immunity*, v. 73, n. 8, p. 4853-4863, 2005.
- DA ROCHA MEDEIROS, Fernanda; SPICHLER, Anne; ATHANAZIO, Daniel A. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta tropica*, v. 115, n. 1-2, p. 155-162, 2010.

- DE SOUZA, Anna Cláudia Alves *et al.* High Performance of ELISA test using recombinant rLiNTPDase2 from *Leishmania infantum*: a Phase II diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. *Acta Tropica*, p. 105535, 2020.
- DONG, Haiyan *et al.* Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC microbiology*, v. 8, n. 1, p. 223, 2008.
- DOUNGCHAWEE, Galayanee *et al.* Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 15, n. 3, p. 492-498, 2008.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*, 2nded, 1999, 272p.
- GRASSMANN, André Alex; SOUZA, Jéssica Dias; MCBRIDE, Alan John Alexander. A universal vaccine against leptospirosis: are we going in the right direction?. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 256, 2017.
- HARTSKEERL, Rudy A. Artículo Especial, International Leptospirosis Society: Objectives and achievements. *Revista cubana de medicina tropical*, v. 57, n. 1, p. 7-10, 2005.
- JOSEPH, Siju *et al.* Evaluation of real-time PCR, MAT, and recombinant LipL32-based ELISA for the diagnosis of canine leptospirosis in a disease-endemic South Indian state, Kerala. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, v. 42, n. 3, p. 191-197, 2018.
- KARCH, Christopher P.; BURKHARD, Peter. Vaccine technologies: from whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical pharmacology*, v. 120, p. 1-14, 2016.
- KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 10, p. 736, 2009.
- KOIZUMI, Nobuo; WATANABE, Haruo. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, 2004.
- KURILUNG, Alongkorn *et al.* Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Research in veterinary science*, v. 115, p. 146-154, 2017.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.
- LIMMATHUROTSAKUL, Direk *et al.* Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clinical infectious diseases*, v. 55, n. 3, p. 322-331, 2012.
- LIN, Yi-Pin *et al.* The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira*

enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. *PloS one*, v. 5, n. 6, p. e11301, 2010.

MARRACK, Philippa; MCKEE, Amy S.; MUNKS, Michael W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 4, p. 287, 2009.

MATSUNAGA, James *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular microbiology*, v. 49, n. 4, p. 929-946, 2003.

MAZE, M. J. *et al.* Diagnostic accuracy of leptospirosis whole-cell lateral flow assays: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 4, p. 437-444, 2019.

MERI, Taru *et al.* Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microbial pathogenesis*, v. 39, n. 4, p. 139-147, 2005.

MIRAGLIA, F.; MORAIS, Z. M. DE. Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. p. 117–121, 2013.

PENNA, B.; MARASSI, C. D.; LIBONATI, H. *et al.* Diagnostic accuracy of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* as antigen for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 50, p. 13-15, 2017.

PEREIRA, E. Patentes como Ferramenta da Gestao da Informacao e do Inteligencia Competitiva. TECOAR. Instituto de Tecnología do Paraná. Agencia Paravanense de Propiedad Industrial-APPI, 2004.

PERRIE, Yvonne *et al.* Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International journal of pharmaceutics*, v. 364, n. 2, p. 272-280, 2008.

PICARDEAU, Mathieu. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

PICARDEAU, Mathieu *et al.* Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2014.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews*, v. 15, p. 297-307, 2017.

PINTO, P. S.; LIBONATI, H. and LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Tropical Animal Health and Production*, v. 49, p. 231-238, 2017.

- PIRES, A.V. Bovinocultura de corte. Piracicaba: FEALQ, 2010. V.2. p.971-975. chap.51.
- PRAJAPATI, A. *et al.* A Review on Bovine Leptospirosis with Special Reference to Seroprevalence in India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 7, n. 4, p. 1813-1820, 2018.
- PTAK, C. P.; AKIF, M.; HSIEH, C. L. *et al.* Comparative screening of recombinant antigen thermostability for improved leptospirosis vaccine design. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 116, p. 260-270, 2018.
- REAGAN, Krystle L.; SYKES, Jane E. Diagnosis of canine leptospirosis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 49, n. 4, p. 719-731, 2019.
- RODRIGUES, Rogério O. *et al.* Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais e uma monovalente experimental. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 1, p. 10-16, 2011.
- SARKAR, J. *et al.* Leptospirosis: a re-emerging infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5, n. 6, p. 500–502, 2012.
- SCHREIER, S.; DOUNGCHAWEE, G.; CHADSUTHI, S. *et al.* Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests, *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 9, p. 263-280, 2013.
- SCHULLER, Simone *et al.* European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 56, n. 3, p. 159-179, 2015.
- SHANG, Ellen S. *et al.* The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infection and immunity*, v. 63, n. 8, p. 3174-3181, 1995.
- SHEMETOV, Anton A.; NABIEV, Igor; SUKHANOVA, Alyona. Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS nano*, v. 6, n. 6, p. 4585-4602, 2012.
- SILVA, E. Q. G. Recombinant antigens for the control of leptospirosis: design, production and evaluation of the potential in immunoprotection and serodiagnosis. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SIRIWARDANA, Kumudu *et al.* Probing the effects of cysteine residues on protein adsorption onto gold nanoparticles using wild-type and mutated GB3 proteins. *Langmuir*, v. 29, n. 35, p. 10990-10996, 2013.
- SMITH, James A. *et al.* Evidence of insufficient quality of reporting in patent landscapes in the life sciences. *Nature Biotechnology*, v. 35, n. 3, p. 210-214, 2017.
- SOTO, F. R. M. *et al.* Leptospirase suína. *Arq Inst Biol*, v. 74, p. 379-395, 2007.

- TEIXEIRA, Aline F. *et al.* Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. *Vaccine*, v. 37, n. 30, p. 3961-3973, 2019.
- TONIN, Alexandre Alberto *et al.* Leptospirose bovina: aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 4, p. 294-297, 2010.
- TRAPP, Sílvia Manduca *et al.* Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 47, n. 5, p. 395-402, 2010.
- VIJAYACHARI, P. *et al.* Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnosis procedure in leptospirosis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 114, p. 54, 2001.
- WALEED, AL-Orry *et al.* A review of laboratory diagnosis and treatment of leptospirosis. *Int J Pharm Pharm Sci*, v. 8, n. 12, p. 7-13, 2016.
- YAMAGATA, Toshiyuki *et al.* The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 166, n. 1, p. 16-23, 2009.
- YE, Cuilian *et al.* Recombinant antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays in dogs. *PLoS One*, v. 9, n. 12, p. e111367, 2014.
- ZACARIAS, Francielle Gibson da Silva *et al.* Isolation of leptospira Serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 744-748, 2008.

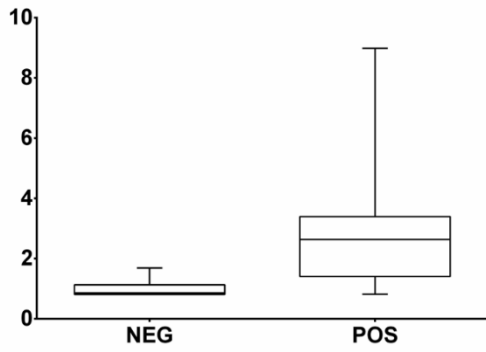
## APÊNDICE A – CÓDIGOS DOS PAÍSES

| <b>Código</b> | <b>Nome do País</b>       |
|---------------|---------------------------|
| AR            | Argentina                 |
| AT            | Áustria                   |
| AU            | Austrália                 |
| BE            | Bélgica                   |
| BR            | Brasil                    |
| CA            | Canadá                    |
| CH            | Suíça                     |
| CN            | China                     |
| CU            | Cuba                      |
| CZ            | República Tcheca          |
| DE            | Alemanha                  |
| DK            | Dinamarca                 |
| ES            | Espanha                   |
| FI            | Finlândia                 |
| FR            | França                    |
| GB            | Reino Unido               |
| HK            | Hong Kong                 |
| IL            | Israel                    |
| IN            | Índia                     |
| IT            | Itália                    |
| JP            | Japão                     |
| KR            | Coréia do Sul             |
| MX            | México                    |
| MY            | Malásia                   |
| NL            | Holanda                   |
| NZ            | Nova Zelândia             |
| PL            | Polônia                   |
| PT            | Portugal                  |
| RU            | Rússia                    |
| SE            | Suécia                    |
| SG            | Singapura                 |
| SU            | URSS                      |
| TH            | Tailândia                 |
| TR            | Turquia                   |
| TW            | Taiwan                    |
| UA            | Ucrânia                   |
| US            | Estados Unidos da América |
| ZA            | África do Sul             |

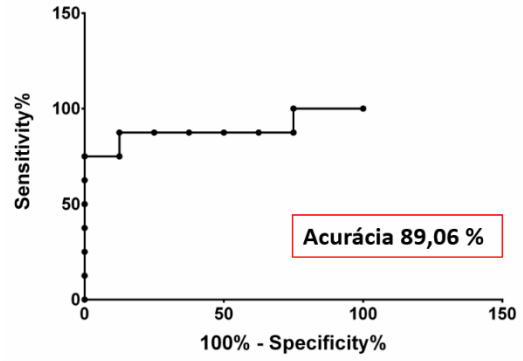
Fonte: Autor.

## APÊNDICE B – GRÁFICOS TRIAGENS

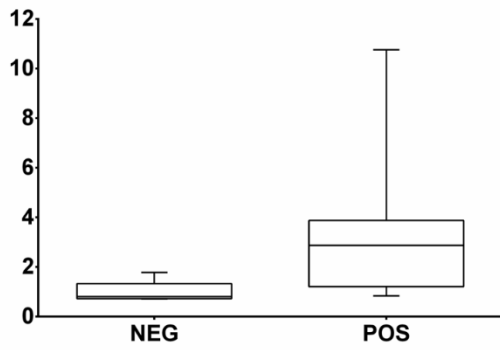
**Quimera 1 - 200ng/poço - 1:200**



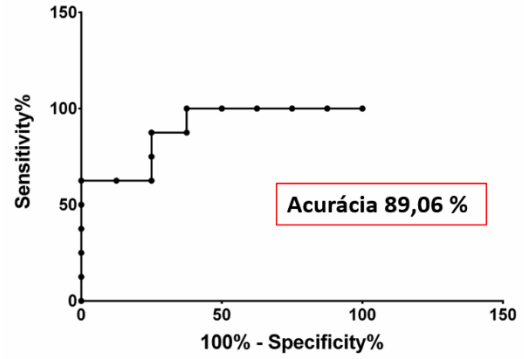
**ROC of Q1 200 1:200**



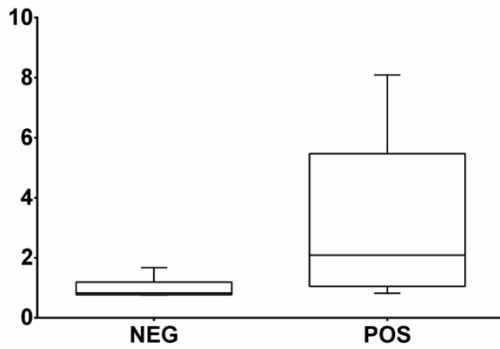
**Quimera 1 - 200ng/poço - 1:400**



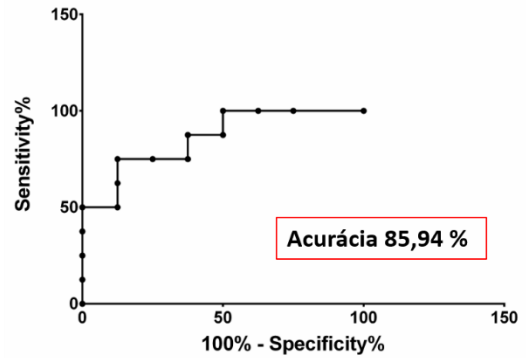
**ROC of Q1 200 1:400**



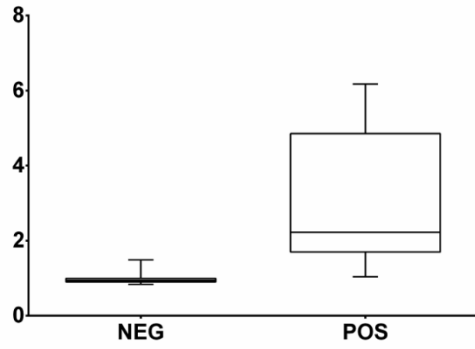
**Quimera 1 - 200ng/poço - 1:600**



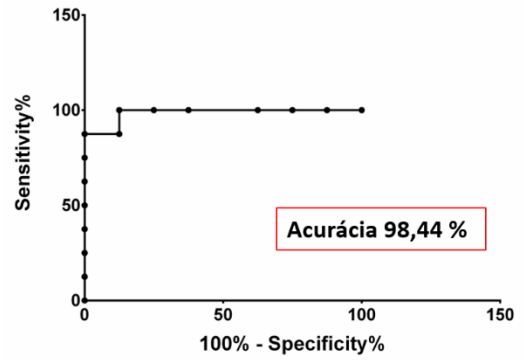
**ROC of Q1 200 1:600**



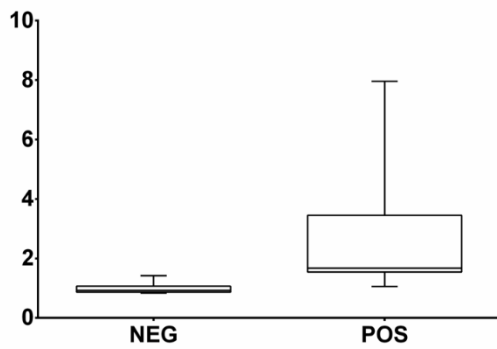
Quimera 1 - 100ng/poço - 1:200



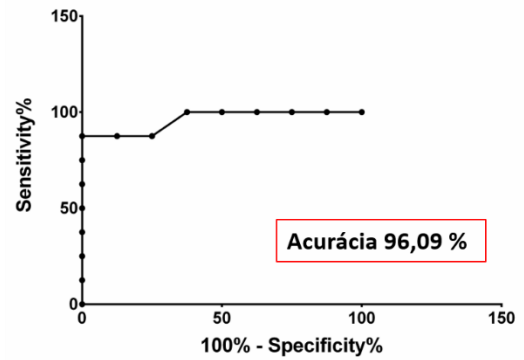
ROC of Q1 100 1:200



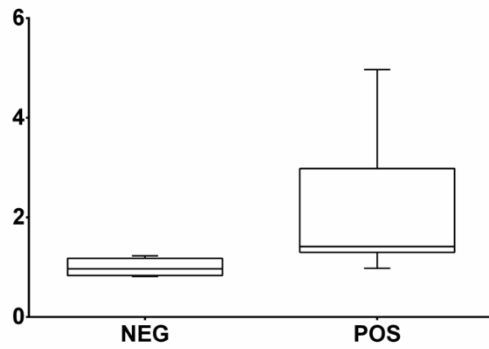
Quimera 1 - 100ng/poço - 1:400



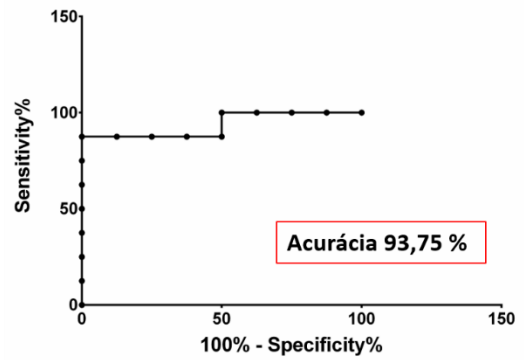
ROC of Q1 100 1:400

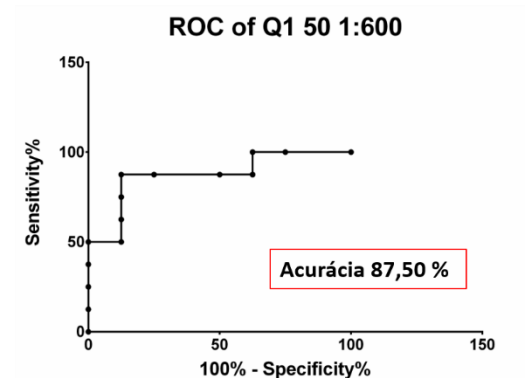
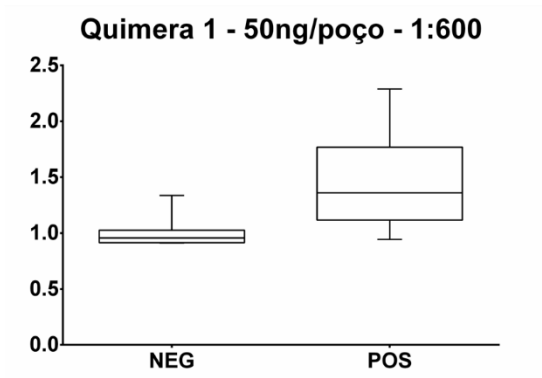
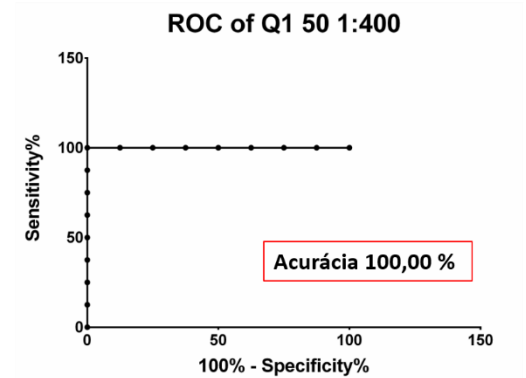
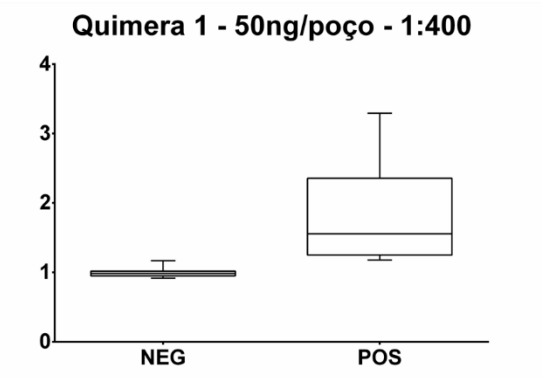
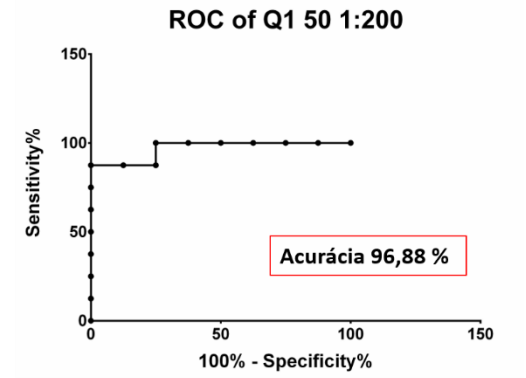
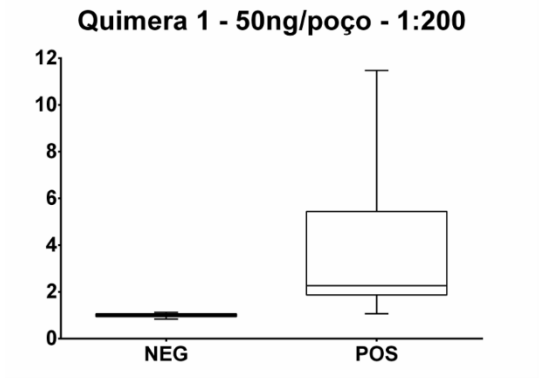


Quimera 1 - 100ng/poço - 1:600

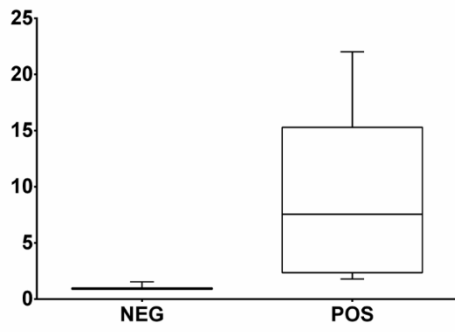


ROC of Q1 100 1:600

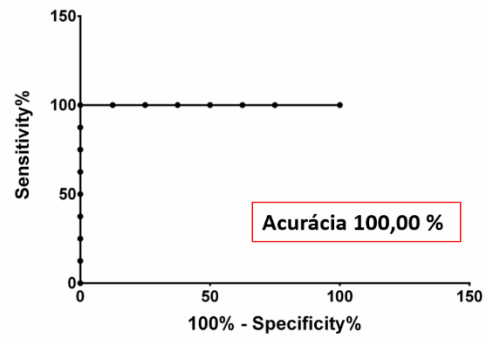




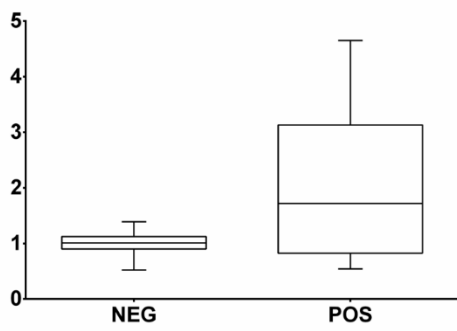
**Quimera 4 - 100ng/poço - 1:400**



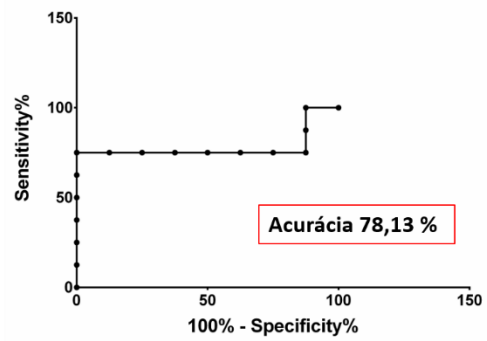
**ROC of Q4 100 1:400**



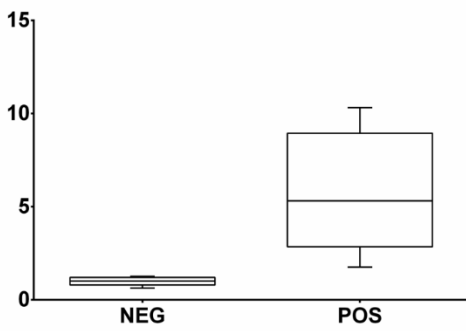
**Quimera 4 - 100ng/poço - 1:600**



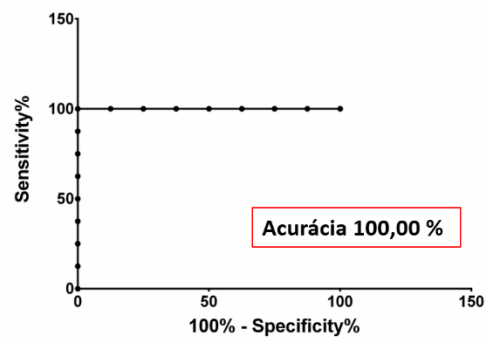
**ROC of Q4 100 1:600**

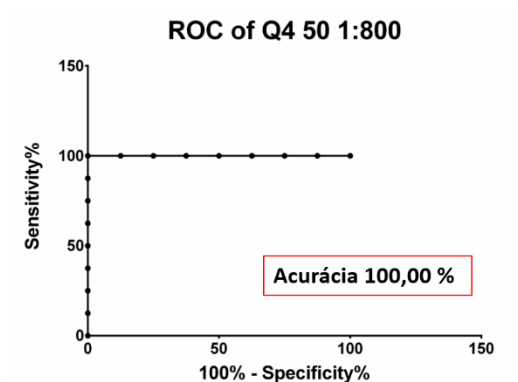
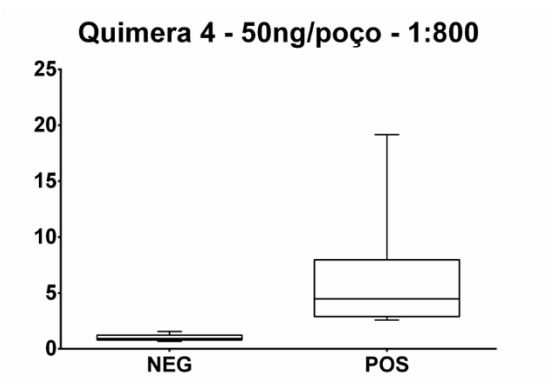
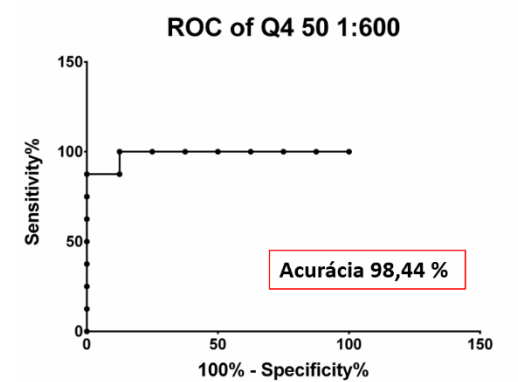
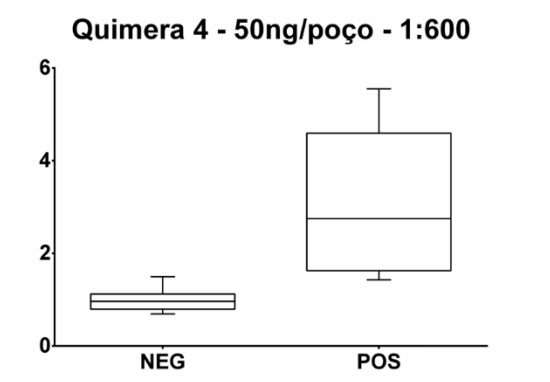
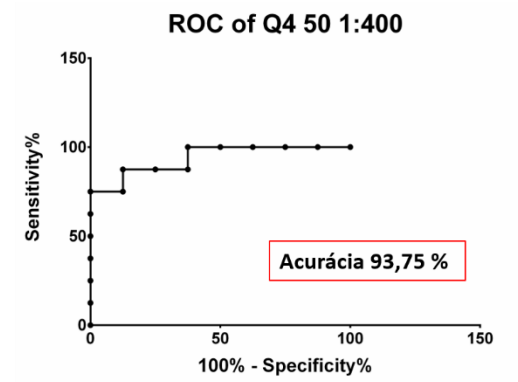
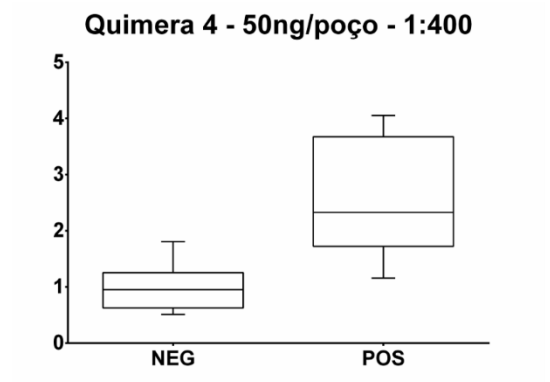


**Quimera 4 - 100ng/poço - 1:800**

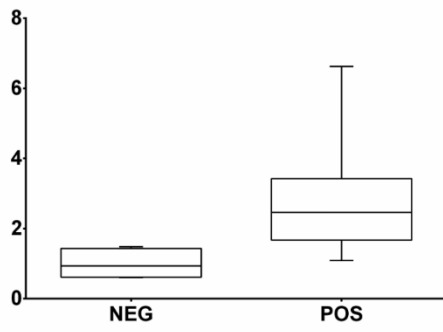


**ROC of Q4 100 1:800**

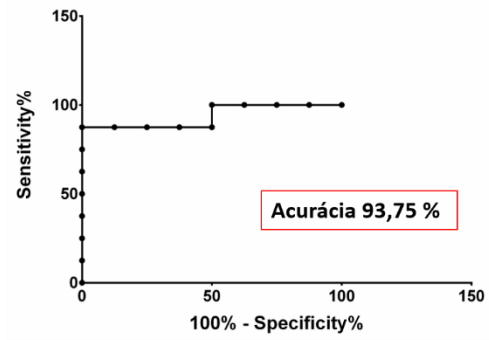




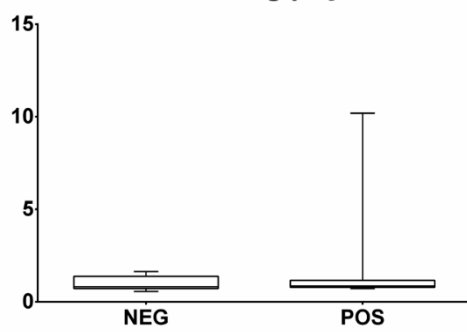
Quimera 4 - 25ng/poço - 1:400



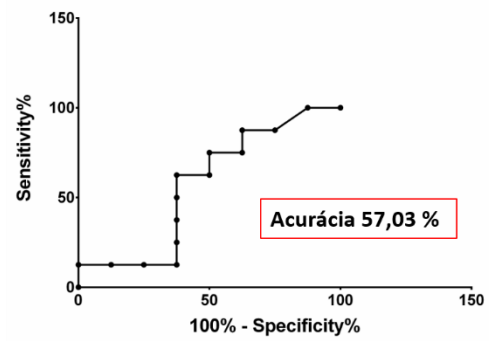
ROC of Q4 25 1:400



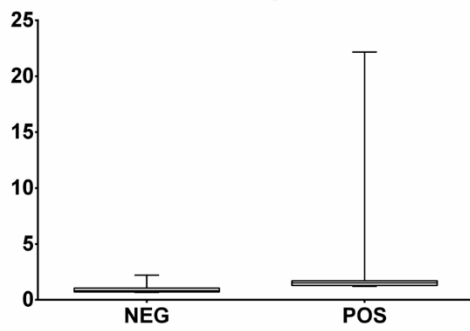
Quimera 4 - 25ng/poço - 1:600



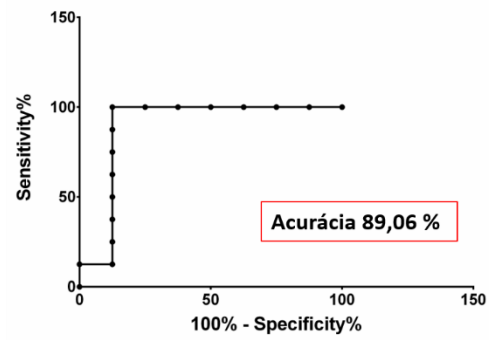
ROC of Q4 25 1:600



Quimera 4 - 25ng/poço - 1:800



ROC of Q4 25 1:800



## APÊNDICE C – GRÁFICOS PADRONIZAÇÕES

