



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

BRUNO VINICIOS SILVA DE ARAÚJO

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA O
DIAGNÓSTICO INDIRETO DA LEPTOSPIROSE: PREPARO DO ANTÍGENO
RECOMBINANTE**

MOSSORÓ

2019

BRUNO VINICIOS SILVA DE ARAÚJO

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA O
DIAGNÓSTICO INDIRETO DA LEPTOSPIROSE: PREPARO DO ANTÍGENO
RECOMBINANTE**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina veterinária.

Orientador: Sidnei Miyoshi Sakamoto, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2019

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA O
DIAGNÓSTICO INDIRETO DA LEPTOSPIROSE: PREPARO DO ANTÍGENO
RECOMBINANTE**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Defendida em: 13 / 08 / 2 019.

BANCA EXAMINADORA



Sidnei Miyoshi Sakamoto, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente



Juliana Fortes Vilarinho Braga, Prof. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador



Jéssica Costa de Oliveira, Prof. Esp. (FACENE)
Membro Examinador

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A
658 p Araújo, Bruno Vinícios Silva .
 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX
 PARA O DIAGNÓSTICO INDIRETO DA LEPTOSPIROSE:
 PREPARO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE / Bruno
 Vinícios Silva Araújo. - 2019.
 68 f. : il.

 Orientador: Sidnei Miyoshi Sakamoto.
 Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2019.

 1. Leptospira. 2. LipL32. 3. Diagnóstico. I.
Sakamoto, Sidnei Miyoshi , orient. II. Título.

Dedico a minha tia Vilma Rodrigues (In Memoriam), a mulher que foi um exemplo de garra e determinação, uma segunda mãe que me acolheu e me ensinou a seguir firme.

Aos meus pais, Magna e Waldir, por todo incentivo, demonstração de amor e confiança. À minha família paraense e potiguar, pelo carinho e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Após todos esses anos de novos desafios, inseguranças, mudança de curso, mas acima de tudo dedicação, estou chegando ao final dessa árdua etapa que representa a realização de um sonho, alcançá-lo foi devido a ajuda de inúmeras pessoas no decorrer desta caminhada.

Agradeço aos meus pais, Waldir e Magna, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem e sonharem ao meu lado. Agradeço por todo o carinho e confiança que depositaram em mim. Essa conquista é nossa, amo vocês.

Agradeço as minhas irmãs Carol, Brenda e Bárbara por toda palavra de incentivo, por me transmitirem tranquilidade e acalmarem meu coração nos momentos de desespero. Vocês foram extremamente importantes para a minha permanência nessa jornada.

Ao meu tio Neném, tia Vilma (*In Memoriam*) e minhas primas Evilane e Ediane, obrigado por terem me recebido com tanto amor e carinho, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo apoio emocional durante essa adaptação longe de casa. Acreditem quando eu digo que não teria conseguido sem vocês.

À minha tia Fátima e tia Babá pelo carinho e preocupação durante todos esses anos. Agradeço a minha família potiguar por terem me recebido de braços abertos, por serem tão calorosos e amáveis comigo.

Ao meu orientador, Professor Sakamoto por esses cinco anos de orientação, por todas as oportunidades, confiança, conselhos, paciência e convívio. Grato pela sua dedicação e participação ativa na minha formação profissional.

À minha querida amiga Rebeca, pela paciência em me ensinar e tirar minhas dúvidas durante nosso convívio no laboratório, por se fazer presente mesmo longe, por me incentivar e orientar a ser um profissional e pessoa melhor. Obrigado pela sua amizade, companheirismo e todos os momentos vividos.

Aos amigos Jéssica e André, pela amizade conquistada, ótimas conversas e risadas, por toda ajuda no laboratório, nas correções e discussões científicas.

À Karine, um dos presentes que a vida me concedeu. Obrigado pela sua amizade, pelo carinho e companheirismos durante todos esses anos, por sempre ouvir as minhas lamentações e, por sempre, sempre, me trazer alegria.

Agradeço aos meus amigos Diego, Lara, Tati, Cris, Ítalo e Susi pela amizade, pelas palavras de incentivo, por todo carinho e amor.

Aos meus queridos amigos Marina, Clara, Geovana, Livia, Samuel e Rodrigo. Obrigado por aturarem meus dramas, pelas risadas, carinho, incentivo e por acima de tudo respeitar as nossas diferenças. Amos vocês.

Ao Pablo Carvalho, por todo apoio, carinho e palavra de incentivo. Obrigado por ser essa pessoa que todos os dias me alegra com o sorriso mais sincero do mundo.

À Claudia e Leandro, obrigado por sempre se fazerem presentes na minha vida. Tenho um carinho e confiança enorme em vocês.

À Leleco e Bile (*In Memoriam*), meus primeiros companheiros de jornada. Obrigado por terem despertado essa paixão em mim, por terem amado e confiado em uma criança tão atrapalhada quanto eu era.

À Belinha, pelo amor puro, pelos abraços e lambidas mais gostosos do mundo, por sempre me lembrar que é isso que eu quero para minha vida. Te amo minha velhinha.

Ao Chibé, que me surpreendeu com seu carinho, companheirismo e jeitinho teimoso. À melhor calopsita. Te amo meu pequenino.

Aos amigos queridos e familiares, vocês são muito mais importantes do que pensam. Obrigado por estarem sempre por perto, pelo interesse, pelas palavras de incentivo, por todo carinho, por tornarem toda essa luta mais suportável e por me fazerem mais feliz.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido, que proporcionou a realização deste e de outros trabalhos. Por uma universidade pública, gratuita e de qualidade.

Ao Banco do Nordeste e outras agências de fomento que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo, coordenador do Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), por ceder as cepas padrão de *Leptospiras* patogênicas usadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Odir Dellagostin, da Universidade Federal de Pelotas, por ceder o plasmídeo e a proteína controle utilizada nesta pesquisa.

Agradeço a Banca Examinadora por suas enriquecedoras sugestões e por todas as discussões sobre o trabalho.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação

Simone de Beauvoir

RESUMO

A Leptospirose é considerada a antroponose mais amplamente difundida no mundo. De acordo com a classificação sorológica, a espécie *Leptospira interrogans* contempla os sorovares patogênicos mais envolvidos em infecções que acometem o homem e os animais e a LipL32 é a mais abundante proteína transmembrana, sendo altamente imunogênica. A utilização de lipoproteínas, como a LipL32, pode representar uma alternativa de menor custo, maior segurança e especificidade para o desenvolvimento de testes sorológicos de diagnóstico. Diante disso, objetivou-se contribuir para o desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido, de fácil interpretação e acessível em nível ambulatorial que possa diagnosticar em minutos a leptospirose humana e animal em qualquer fase da infecção. Foram submetidos à amplificação do gene da lipoproteína LipL32 o DNA genômico extraído de cepas padrão de 19 leptospirosas patogênicas (sorovar Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Guaricura, Hardjobovis, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Panamá, Pomona, Sejroe, Tarassovi, Wolfii). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação deste gene foram validados em trabalhos já publicados, de acordo com Seixas et al. (2007) e Amutha et al. (2007). Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), utilizando o brometo de etídeo (0,5mg/mL), como corante evidenciador do DNA. Os primers tinham, em suas extremidades 5', sítios de restrição para as enzimas EcoR I e Kpn I, para permitir a inserção no sentido correto no plasmídeo recombinante. O vetor recombinante utilizado neste estudo já havia sido previamente construído, pAE / lipL32 (SEIXAS, et al., 2007). As cepas utilizadas foram as linhagens de *E. coli* XL1-Blue, BL21(DE3) PLYs e *E. coli* BL21 Star™ (DE3). A *E. coli* XL1-Blue foi utilizada para a clonagem e a BL21(DE3) PLYs e *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes. Foi realizado o preparo de bactérias competentes por CaCl₂, transformação de bactérias *E. coli* XL1-Blue, cultivo das células transformadas, extração de plasmídeos, transformação das células de expressão, crescimento do inóculo e indução da expressão por isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, extração da proteína recombinante por lise celular por sonicator e a análise da proteína LipL32 por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Das 19 amostras submetidas a PCR direcionada ao gene da lipoproteína LipL32, todas apresentaram positividade, resultando na amplificação de uma região de 756 pb e 771 pb. O que era esperado, tendo em vista que a LipL32 é codificada por um gene conservado entre as espécies patogênicas de *Leptospiras*. Após a realização da PCR das alíquotas provenientes das unidades formadoras de colônias (UFCs) que apresentavam a coloração branca, foi detectada positividade para amplificação do gene LipL32. Evidenciando alta taxa de transformação na linhagem de *E. coli* XL1-Blue e sucesso na clonagem do gene LipL32 de *Leptospira* para expressão heteróloga do peptídeo correspondente. As amostras provenientes do protocolo de expressão utilizando a Cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3) PLYs foram sonicadas, e as alíquotas, utilizadas para verificar o tempo em que a proteína foi expressa em maior concentração pela bactéria, através de uma eletroforese em um SDS-PAGE. Houve sucesso na expressão da proteína LipL32 recombinante mas são necessários ajustes para melhorar o rendimento da extração. A cepa bacteriana *E. coli* BL21 Star™ (DE3), não apresentou taxa de transformação, e consequentemente expressão da proteína heteróloga.

Palavras-chave: *Leptospira*, LipL32, Diagnóstico.

ABSTRACT

Leptospirosis is seen as the most widespread anthroponosis in the world. According to the serological classification, the species *Leptospira interrogans* includes the pathogenic serovars mostly involved in infections that affect man and animals, being LipL32 the most abundant and highly immunogenic transmembrane protein. The use of lipoproteins, such as LipL32, may represent a lower cost, higher safety and specific alternative for the development of serological diagnostic tests. Thus, the objective was to contribute to the development of a rapid diagnostic point of care test, easily to read and interpret that can diagnose human and animal leptospirosis in minutes at any stage of infection. Genomic DNA extracted from standard strains of 19 pathogenic leptospires (serovar Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Castellonis, Copenhagen Panama, Pomona, Sejroe, Tarassovi, Wolfii). The oligonucleotides primers used for amplification of this gene have been validated in published studies, according to Seixas et al. (2007) and Amutha et al. (2007). PCR amplification products were submitted to 1% agarose gel electrophoresis in Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer, using ethidium bromide (0.5mg / mL) as DNA evidencing dye. The primers had, at their 5' ends, restriction sites for the EcoR I and Kpn I enzymes, to allow insertion in the right direction into the recombinant plasmid. The recombinant vector used in this study had been previously constructed, pAE / lipL32 (SEIXAS, et al., 2007). The strains used were E. coli XL1-Blue, BL21 (DE3) PLys and E. coli BL21 Star™ (DE3) strains. E. coli XL1-Blue was used for cloning and BL21 (DE3) PLys and E. coli BL21 Star™ (DE3) were used for expression of recombinant proteins. CaCl₂ competent bacteria preparation, E. coli XL1-Blue bacterial transformation, transformed cell culture, plasmid extraction, expression cell transformation, inoculum growth and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside expression induction were performed. Recombinant protein extraction by sonicator cell lysis and LipL32 protein analysis by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis. Of the 19 samples submitted to PCR directed to lipoprotein gene LipL32, all were positive, resulting in amplification of a region of 756 bp and 771 bp as expected given that LipL32 is encoded by a conserved gene among the pathogenic *Leptospira* species. After selection of white colony forming units (CFUs), the presence of LipL32 gene was detected by PCR amplification. Evidence of high transformation rate in E. coli XL1-Blue strain and successful cloning of *Leptospira* LipL32 gene for heterologous expression of the corresponding peptide. Samples from the expression protocol using the E. coli BL21 (DE3) PLys bacterial strain were sonicated and the aliquots used to verify the time the protein was expressed in the highest concentration by the bacterium by electrophoresis on an SDS-PAGE. LipL32 protein was successfully expressed however adjustments to improve protein extraction level are needed. The bacterial strain E. coli BL21 Star™ (DE3) showed no transformation rate and consequently no heterologous protein expression.

Keywords: *Leptospira*, LipL32, Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amplificação do gene LipL32 das cepas patogênicas de <i>Leptospira</i>	48
Figura 2. UFCs de <i>E. coli</i> XL1 - Blue transformadas por choque térmico em meio LB seletivo com 100 µg/mL de cloranfenicol e ampicilina.	488
Figura 3. Eletroforese em gel da agarose 1 % apresentando o resultado da amplificação do gene lipL32 dos clones extraídos da <i>E. coli</i> XL1 - Blue.	49
Figura 4. Transformação de células de expressão em meio seletivo com 100 µg/ml de cloranfenicol e ampicilina.	50
Figura 5. Eletroforese em gel da agarose 1 % apresentando o resultado da amplificação do gene lipL32 dos clones extraídos da <i>E. coli</i> BL21(DE3) PLys.	500
Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % com extrato das células após indução de expressão.	511

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sorogrupos e algumas sorovarietades de <i>Leptospira interrogans</i> lato sensu.....	23
Quadro 2. Genomospécies de <i>Leptospiras</i> associados aos sorogrupos, segundo a classificação genotípica	24
Quadro 3. <i>Leptospiras</i> patogênicas usadas neste estudo de acordo com a cepa, espécie, sorogrupo, sorovar e instituição de origem	39
Quadro 4. Primer, sequência e comprimento do fragmento direcionado ao gene LipL32.....	411
Quadro 5. Linhagens, genótipo, meio de cultura e antibiótico utilizado.....	422

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos confirmados de Leptospirose notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no ano de 2017.....	19
Tabela 2. Relação de pureza e quantificação do DNA genômico de cepas patogênicas de <i>Leptospiras</i>	477

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme-linked immunossorbent assay
H	Hora
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
L.	Leptospira
LB	Luria-bertani
LIG	Leptospiral immunoglobulin-like protein
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mA	Miliampere
MAT	Microscopic agglutination test
OM	Outer membrane
OMP	Outer membrane protein
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
SAM	Soroaglutinação microscópica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido
V	Volts

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
mM	Milimolar
ml	Mililitro
g	Aceleração da gravidade ou força centrífuga relativa (rcf)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Aspectos históricos.....	20
2.2 Etiologia e Classificação do agente.....	21
2.2.1 A <i>Leptospira</i>	21
2.2.2 Taxonomia.....	22
2.2.3 Classificação.....	22
2.3 Ciclo de transmissão.....	25
2.4 Aspectos epidemiológicos.....	26
2.5 Patogenia e sinais clínicos.....	28
2.6 Diagnóstico laboratorial da leptospirose	30
2.7 Prevenção	31
2.8 Membrana externa da <i>Leptospira</i>	34
2.9 Utilização da LipL32.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral:.....	38
3.2 Objetivos Específicos:.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Local de realização dos experimentos.....	39
4.2 Extração de DNA e amplificação do gene LipL32 de <i>Leptospiras</i> patogênicas.....	39
4.2.1 Amostra.....	39
4.2.2 Extração do DNA genômico da <i>Leptospira</i>	40
4.2.3 Amplificação do gene lipL32 por PCR.....	40
4.3 Clonagem e expressão do gene LipL32	41
4.3.1 Vetor e Cepa.....	41
4.3.2 Preparo de bactérias competentes por CaCl ₂	42
4.3.3 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> XL1-Blue	43
4.3.4 Cultivo das células transformadas	43
4.3.5 Extração de plasmídeos.....	43
4.3.6 Expressão da proteína recombinante.....	45
4.4 Extração da proteína recombinante por lise celular por sonificador.....	46
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
5 RESULTADOS.....	47

5.1 Extração do DNA genômico e Amplificação do gene lipL32 por PCR.....	47
5.2 Transformação de clones recombinantes	48
5.3 Expressão e purificação da rLipL32.....	49
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é considerada a antropozoonose mais amplamente difundida no mundo (DAMASCO et al., 2011). A doença é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* que apresentam, pela classificação sorológica, as espécies *L. interrogans* e *L. biflexa*, sendo a primeira detentora dos sorovares patogênicos mais envolvidos em surtos que acometem o homem, a exemplo do sorovar Icterohaemorrhagiae e a segunda a que reúne os sorovares saprófitos de vida livre (FREITAS et al., 2004).

Essa enfermidade é uma infecção que atinge comumente os mamíferos silvestres, animais domésticos e sinantrópicos, a exemplo do rato de esgoto *Rattus norvegicus* que é portador assintomático desse agente (FREITAS et al., 2004). *L. interrogans* se multiplica nos rins destes animais sem causar prejuízos a sua sobrevivência, sendo eliminadas na urina (DUTRA et al., 2015).

O homem pode contaminar-se através do contato direto com a urina de animais infectados ou de forma indireta pela exposição a água ou solos contaminados. A bactéria pode facilmente penetrar através das mucosas, ou ainda através da pele lesada ou íntegra, esta última necessitando de maior tempo de exposição (HÜTTNER; PEREIRA; TANAKA, 2002; MARTINS; PENNA; LILENBAUM, 2010).

Em humanos a leptospirose pode apresentar-se na forma leve como uma doença febril, facilmente confundida com um resfriado comum, ou como uma doença multissistêmica grave. Sua forma mais grave é denominada síndrome de Weil que se não diagnosticada e tratada corretamente a tempo, pode chegar a ser fatal em 40% dos casos (MOURA; ROCHA, 2013).

No Brasil é uma doença endêmica de notificação compulsória desde 1993. No âmbito nacional, em 2017 a região com maior notificação de casos foi a Região Sul (1.068), seguida da Sudeste (929) e Norte (524). As regiões Nordeste e Centro-Oeste apresentaram respectivamente 464 e 54 (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2019). Em 2017, foram registrados 3.039 casos; destes, 85% dependeram de confirmação laboratorial e 13% usaram o critério clínico epidemiológico (Tabela 1) (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2019).

Tabela 1. Casos confirmados de leptospirose notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil no ano de 2017.

Critério de confirmação	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste	Total
Branco	6	8	12	23	-	49
Clínico-Laboratorial	447	325	796	977	49	2594
Clínico-epidemiológico	71	131	121	68	5	396
Total	524	464	929	1068	54	3039

Fonte: SINAN (2019).

Períodos chuvosos facilitam a ocorrência de leptospirose, mas também de outras doenças tropicais, como dengue, malária, febre amarela, febre tifoide e febre maculosa. Nesses casos, o diagnóstico da leptospirose apenas por meio da observação de suas manifestações clínicas, revela-se ineficiente, já que as sintomatologias dessas doenças são comuns, fato que dificulta sua diferenciação (MOURA; ROCHA, 2013).

Por isso, exames laboratoriais são essenciais para o diagnóstico da leptospirose. O teste preconizado pela Organização Mundial de Saúde é a soroaglutinação microscópica (MAT) que exige laboratórios especializados que mantenham culturas de *Leptospiras* vivas com as quais o soro do paciente deve reagir. Além de complexo e com alto risco biológico, esse teste não permite ser aplicado na forma aguda (inicial), que é o momento mais determinante quanto ao curso da doença (WHO, 2003).

Diante das limitações desse teste, a utilização de lipoproteínas como a LipL32 pode representar uma alternativa de menor custo, maior segurança e especificidade para o desenvolvimento de testes sorológicos de diagnóstico. A LipL32 é a proteína mais abundante e conservada entre as espécies patogênicas de *Leptospiras* e que não possui ortólogos na espécie *L.biflexa* (HAAKE et al., 2000).

A LipL32 está localizada na superfície externa das leptospiras, e provavelmente está envolvida na interação da bactéria com o hospedeiro, o que a torna um possível alvo do sistema imune (FAINE, 1999).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Relatos de síndromes similares à causada pela leptospirose são descritas desde a antiguidade. Em 1883, os sintomas da leptospirose, embora ainda não tivesse esse nome, foram associados a trabalhadores do sistema de esgotos de Paris por Landouzy (INADA et al., 1916). O primeiro relato clínico descrevendo a leptospirose nos tempos modernos foi realizado somente em 1886, quando o médico alemão Adolf Weil descreveu a forma grave da doença em humanos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009), que ficou conhecida como síndrome ou doença de Weil.

A doença no cão foi descrita antes que em humanos, por Hofer (GSELL, 1984, apud RODRIGUES, 2008), que a denominou tifo canino. Mais tarde, em 1898, passou ser denominada como doença de Stuttgart (ENRIETTI, 2001). Contudo, a nomenclatura *Leptospira interrogans* surgiu quando Stimson (1907, apud ENRIETTI, 2001) demonstrou, através da impregnação por prata, aglomerados de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente cuja morte foi atribuída à febre amarela. Ao observar que as espiroquetas apresentavam terminais em gancho, Stimson as chamou de *Spirochaetas interrogans* devido a sua semelhança com um ponto de interrogação. A partir da primeira Grande Guerra o estudo da leptospirose teve grande desenvolvimento e diversos cientistas passaram a pesquisar sobre o agente etiológico da “icterícia infecciosa” (ENRIETTI, 2001).

A identificação do agente etiológico ocorreu somente em 1914, quando Inada e colaboradores obtiveram isolados de *Leptospira* spp. por meio de um estudo e infecção experimental, no qual inocularam em cobaias (*Cavia* spp.) o sangue de pacientes humanos ictericos e febris (INADA et al., 1916). Ao analisarem o tecido hepático dos animais infectados, perceberam a presença de espiroquetas, as quais foram denominadas *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (INADA et al., 1916). Foi ainda, pelo trabalho de 1916 do pesquisador japonês Noguchi, que o papel do rato na transmissão da doença para humanos foi elucidado (LEVETT, 2001).

Em 1918, Noguchi e colaboradores conseguiram classificar o agente em um novo gênero, o qual foi denominado de *Leptospira*. Este gênero incluía leptospiros patogênicas, todas denominadas *Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae*, e também leptospiros saprófitas,

devido a similaridades morfológicas. As leptospiros saprófitas foram agrupadas sob a denominação de *Spirochaeta biflexa* (NOGUCHI, 1918).

No Brasil, as infecções com *Leptospira interrogans* em humanos foram reconhecidas pela primeira vez por McDowell (1917, apud MONTEIRO, 2003), no Paraná. Por ser uma doença de alta incidência em regiões tropicais, causar prejuízos econômicos e ter importante caráter zoonótico, ao longo do tempo, as pesquisas a respeito da leptospirose no Brasil se intensificaram e atualmente diversos grupos de pesquisadores desenvolvem avançados estudos a respeito da leptospirose humana e animal (RODRIGUES, 2008).

2.2 ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO AGENTE

2.2.1 A leptospira

As Leptospiros são bactérias Gram-negativas filamentosas, móveis, aeróbias obrigatórias, classificadas em diferentes sorovares de acordo com seus determinantes antigênicos (FAINE, 1999). Membros do gênero *Leptospira* apresentam formato espiralado com diâmetro de aproximadamente 100 nm e comprimento de até 20 µm e possuem 2 flagelos axiais no espaço periplasmático, responsável por sua motilidade (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Possuem membrana dupla, onde a membrana citoplasmática fica associada à parede celular de peptídeoglicano, envoltas pela membrana externa (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, diferindo das demais espiroquetas pela presença de ganchos nas extremidades (HWO, 2003). Atualmente coexistem dois tipos de classificação de *Leptospira*, a sorológica e a genotípica. A classificação sorológica é a mais antiga e é feita em duas espécies de Leptospiros, a *Leptospira interrogans* e a *Leptospira biflexa*, que são separadas de acordo com suas características bioquímicas de cultivo. A *L. biflexa* cresce a 13°C e na presença de 8-azaguanina, e não forma células esféricas na presença de 1M de NaCl (LEVETT, 2001).

Leptospiros são cultivadas tanto em meio líquido como semissólido e sólido, obtendo energia de ácidos graxos de cadeia longa por beta-oxidação e necessitam a presença de vitaminas B2 e B12, bem como ferro e sais de amônia (FAINE, 1999). A temperatura e pH ótimos para o cultivo de *Leptospira* são aproximadamente 30°C e entre 7,2 e 7,4, respectivamente, com um tempo de geração de aproximadamente 12 horas (FAINE, 1999).

2.2.2 Taxonomia

As espiroquetas estão classificadas na Ordem Spirochaetales, a qual compreende três famílias: Brachyspiraceae, Spirochaetaceae e *Leptospiraceae*. *Leptospiraceae* por sua vez possui três gêneros, *Leptonema*, *Turneriella* e *Leptospira*, sendo este último o gênero que alberga as espiroquetas mais estudadas devido a sua importância clínica (HAAKE; LEVETT, 2015). A divisão do gênero *Leptospira* entre espécies se dá pela hibridização de DNA (BHARTI et al., 2003). Atualmente existem 10 espécies patogênicas *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. noguchii*, *L. mayottensis*, *L. santarosai*, *L. weilii*; cinco intermediárias – *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. licherasiae*, *L. wolffii*; e sete saprófitas – *L. biflexa*, *L. idonii*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. vanthiellii*, *L. wolbachii*, *L. yanagawae* e (HAAKE; LEVETT, 2015), totalizando 22 espécies.

Além disso, membros do gênero *Leptospira* se dividem também em sorovares com base em diferenças antigênicas nos carboidratos do antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS). Os sorovares que apresentam certo grau de identidade são agrupados em sorogrupos (LEVETT, 2001). Os sorogrupos não possuem status taxonômico oficial, mas possuem importância clínica e epidemiológica. A lista de sorovariedades é atualizada periodicamente e já conta com mais de 300 sorovariedades de *Leptospiras* patogênicas distribuídas em 25 sorogrupos (ADLER, 2014).

2.2.3 Classificação

Quanto à sistemática, coexistem dois tipos de classificação para as *Leptospiras*, a sorológica e a genotípica (FAINE, 1999). Devido à limitada diferenciação fenotípica dentro do gênero *Leptospira*, foram utilizados critérios antigênicos como base para sua identificação e classificação em sorovares. Para a área epidemiológica e clínica é fundamental que os laboratórios tenham a capacidade de classificar e identificar com precisão as cepas de *Leptospira* spp. que causam doença para que sejam tomadas decisões coerentes com relação à saúde pública (AHMED et al., 2006).

A classificação genotípica por ser mais atual, ainda está restrita a poucos laboratórios. Esta classificação divide as *Leptospiras* em 22 espécies genômicas de acordo com o perfil obtido na hibridização de DNA (HAAKE; LEVETT, 2015), já a divisão em sorovares

foi baseada na variabilidade do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana, sendo definidos por aglutinação após adsorção cruzada com antígeno homólogo (BOURHY et al., 2014; PICARDEAU, 2013).

2.2.3.1 Classificação sorológica

A epidemiologia da leptospirose foi construída a partir de abordagens sorológicas, que têm sido tradicionalmente utilizadas para identificar e classificar os isolados de *Leptospira*. Com base na sorologia, já foram classificados mais de 300 sorovares, sendo estes agrupados em 25 sorogrupos (ADLER, 2014). Esta variedade sorológica é consequência da vasta diversidade de epítomos expostos na superfície, em um mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), bem como da orientação e composição de seus açúcares (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Até 1989, o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que compreende todas as estirpes patogênicas; e *Leptospira biflexa*, compreendendo *Leptospiras* saprófitas isoladas do ambiente (FAINE; STALLMAN, 1982). Com base em critérios sorológicos, as *Leptospiras* são diferenciadas em sorovares, definidas como os representantes básicos do táxon. Os sorovares que possuem semelhanças antigênicas são agrupadas dentro de um mesmo sorogrupo (Quadro 1).

Quadro 1 Sorogrupos e alguns sorovares de *Leptospira interrogans* lato sensu

Sorogrupos	Sorovares
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hedomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weeransinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Rratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panamá	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin

Mini	Mini, Geórgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, aroberea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	lousiana, lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Fonte: adaptado de Levett (2001).

2.2.3.2 Classificação genotípica

Devido os testes sorológicos serem baseados na resposta imunológica do hospedeiro e lançarem um cenário artificial e não confiável da diversidade de sorovares (NALAM et al., 2010), métodos moleculares de classificação de espécies de *Leptospira* e seus sorovares têm sido utilizados como uma alternativa aos métodos sorológicos (LEVETT et al., 2006).

Para os microbiologistas a classificação molecular ainda é bem problemática por causa da clara incompatibilidade com o sistema de sorogrupos (LEVETT, 2001). Traçar uma correlação entre isolados classificados pela abordagem molecular e pela abordagem sorológica não é uma tarefa fácil, pois o táxon inferido pela abordagem molecular varia em relação ao sorovar inferido pela abordagem sorológica (VARNI et al., 2014). A relação entre essas duas classificações ainda é pobre e ambígua (VALVERDE et al., 2008).

Segundo a classificação genotípica, baseada em homologia de DNA, estão descritas 17 espécies de *Leptospira* (Quadro 2) que reúnem variedades patogênicas, saprófitas e aquelas que ainda causam dúvidas quanto a sua forma de manutenção no ambiente (LAFETA, 2010).

Quadro 2 Genomospécies de *Leptospiras* associados aos sorogrupos, segundo a classificação genotípica

Sorogrupos	Genomospécies
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>

Código	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippytyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. Kirschneri</i> , <i>L. weilli</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilli</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. inadai</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Lousiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panamá	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Hurstbridge	<i>Hurstbridge</i>
Semarang	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i>

Fonte: adaptado de Levett (2001).

2.3 CICLO DE TRANSMISSÃO

O ciclo de transmissão da Leptospirose requer a circulação enzoótica da *Leptospira* entre os animais reservatórios (GRASSMANN, 2011). Esses animais infectados podem manifestar a doença de forma aguda ou crônica, podendo carrear as *Leptospiras* durante longos períodos e de forma assintomática (BHARTI et al., 2003), eliminando-as contínua ou intermitentemente (LEVETT; HAAKE, 2009).

Apesar dos roedores serem os principais hospedeiros da leptospirose, uma ampla gama de animais domésticos e silvestres podem ser infectados e carrear o agente. Os sorovares de *Leptospira* demonstram moderada especificidade para o hospedeiro, a exemplo dos sorovares Ballum e Icterohaemorrhagiae em camundongos, sorovar Copenhageni em ratos e Hardjo em bovinos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Embora cada sorovar tenha predileção por determinado hospedeiro, eles não são hospedeiro exclusivos podendo infectar

outros animais, e do mesmo modo, um hospedeiro pode ser reservatório de diversos sorovares (ZARDO, 2017). Esta variedade de hospedeiros, somada à variabilidade antigênica das *Leptospiras* e sua resistência ao meio ambiente, é fundamental para a manutenção da circulação da doença (BHARTI et al., 2003; FAINE, 1999).

Os humanos são hospedeiros acidentais e terminais da *Leptospira*, sendo contaminados durante atividades ocupacionais, recreacionais ou domésticas, em que haja contato com urina de animais portadores, sendo infectados diretamente, por meio de lesões na derme e contato com mucosas dos olhos, boca ou nasofaringe; ou indiretamente, através da ingestão de água e alimentos contaminados ou contato com solo contaminado (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; GUERRA, 2009).

Segundo Zardo (2017), pode haver também transmissão da infecção através do sêmen contaminado, tanto através da monta natural quanto da inseminação artificial, e a via oral não é uma via comum de infecção. A *Leptospira* é capaz de sobreviver semanas em solo úmido ou na água, podendo formar biofilmes e agregados celulares, o que auxiliaria nesta sobrevivência fora do hospedeiro (TRUEBA et al., 2004).

Após o contato direto ou indireto com urina ou tecidos de um animal infectado, humanos e outros animais são infectados pela *Leptospira*, e quando expostos a estas condições, as *Leptospiras* penetram na corrente sanguínea pelas membranas mucosas ou conjuntivas, mesmo que intactas, ou pela pele com abrasões e cortes (LEVETT, HAAKE, 2009). Uma vez dentro do hospedeiro, as *Leptospiras* patogênicas provocam uma infecção sistêmica, manifestada de forma aguda e crônica, com variada sintomatologia e sinais clínicos (GRASSMANN, 2011).

2.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A prevalência de leptospirose é bastante variável em razão de sua ocorrência estar relacionada aos diversos fatores ambientais e climáticos. Além disso, existe ainda variação dos sorovares presentes em cada região, e das diferentes relações estabelecidas entre eles e a espécie hospedeira, apresentando diferentes níveis de infectividade, patogenicidade e virulência, de acordo com o grau de adaptação aquela espécie (MARINHO, 2008).

O processo de ocupação descontrolada dos centros urbanos, aliado a más condições de saneamento básico, sobretudo em países em desenvolvimento, fez com que a leptospirose humana fosse considerada, na última década, como uma zoonose emergente (DELIBERALLI,

2014). Além disso, a doença tornou-se um grande problema em áreas rurais e em países tropicais, os quais contam com altos índices pluviométricos aliados a uma grande diversidade de sorovares presentes (BHARTI et al., 2003; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Estudos realizados no Brasil identificaram sorovares predominantes no país de acordo com a espécie animal acometida. Assim como o estudo realizado por Paz et al. (2015) que identificaram o sorovar Canicola como o mais comum em cães, enquanto que em humanos os sorovares mais comumente isolados pertencem aos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhagen (DIAS et al., 2007; MIRAGLIA et al., 2013).

Nos cães, a infecção leptospírica ocorre em cenários semelhantes aos do homem (GREENE, et al., 2006). Para os cães urbanos, assim como para o homem, a grande fonte de infecção é o contato direto com ratos ou indireto com sua urina contaminada. Nas áreas rurais ou de mata, as fontes de infecção estão relacionadas a roedores e outros animais silvestres (GREENE, et al., 2006).

Os ratos são os hospedeiros do sorovar Icterohaemorrhagiae, mas os cães são frequentemente hospedeiros acidentais deste agente (BROD, 2005). Ante isso, segundo Feigin et al. (1973) os cães apresentam um potencial significativo na transmissão da leptospirose em meios urbanos, devido a íntima relação do homem com esses animais de companhia.

Oliveira et al. (2010) em seu trabalho com fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, conseguiu identificar em sua maioria a presença do sorovar Hardjo (Hardjoprajitno). Além das espécies já citadas existem diversas outras que também são acometidas por *Leptospiras* no Brasil, provocando grandes perdas econômicas, como relatado por Miraglia et al. (2015) em seus estudos com suínos nos estados de São Paulo e Minas Gerais, identificando o sorovar Pamona como o mais incidente.

No Brasil, nas regiões de maior incidência da doença (sul e sudeste), predominantemente na região sul, os indivíduos expostos aos riscos de contaminação por estes agentes infecciosos são identificados com maior clareza em áreas rurais onde trabalhadores, principalmente agricultores do sexo masculino, estão em contato direto com ambientes alagados e/ou utilizam coleções hídricas para banhar-se. Já em áreas urbanas esses fatores de riscos não são tão facilmente identificados, sendo mais aparentes na presença de enchentes ou desastres ambientais relacionados (BRASIL, 2008).

Segundo informações do Portal da Saúde, existem características ambientais que fazem com que a leptospirose se torne epidêmica no Brasil, tais como intensas chuvas que levam a enchentes em regiões cuja população cresceu de forma desordenada, formando aglomerados de intensa pobreza e escassez de condições sanitárias adequadas. Diante dessa

realidade, profissões como as de garis, catadores de lixo, médicos veterinários, pescadores, dentre outras, estão sob intenso risco de contaminação (BRASIL, 2019).

Assim, a grande diversificação climática do país e as condições sanitárias desfavoráveis são as razões pelas quais o controle e erradicação da leptospirose no Brasil sejam dificultados (CASELANI et al., 2012).

A Resolução GM / MS N° 1.271 de 2014, consolidada pelo SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, estabelece a obrigatoriedade de que a leptospirose humana seja notificada no Brasil (BRASIL, 2014). Notificar sempre que houver casos da doença é de fundamental importância, principalmente por se tratar de uma enfermidade com alta porcentagem de letalidade, cerca de 40% em suas formas mais graves (MOURA; ROCHA, 2013).

2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Segundo Ko et al. (2009), na fase inicial da doença, após a entrada das *Leptospiras* no hospedeiro, essas bactérias multiplicam-se rapidamente no sangue (leptospiremia) e migram pelos tecidos até atingirem órgãos-alvo, como rins, pulmões e fígado. Apesar de não serem microrganismos intracelulares, são capazes de atravessar e residir transientemente no interior de células, como demonstrado *in vitro*, o que parece ser importante para evasão do sistema imune e rápida colonização de órgãos do hospedeiro (BAROCCHI et al., 2002; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Proteínas de membrana externa com afinidade por componentes da matriz extracelular do hospedeiro também são importantes na invasão e na disseminação da bactéria no organismo (CULLEN et al., 2005; HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

Nascimento et al. (2004), com o auxílio de estudos genômicos funcionais com base na sequência do genoma de *L. interrogans* Copenhageni conseguiu prever mais de 200 proteínas de membrana externa, como proteínas provavelmente relacionadas à patogênese da leptospirose.

Os fatores de virulência já identificados em *Leptospira* spp. são o Loa22 (RISTOW et al., 2007), HemO (MURRAY et al., 2009), LPS (MURRAY et al., 2010), FlaA (LAMBERT et al., 2012) e FliY (LIAO et al., 2009), indicando a participação dos mesmos na patogênese da *Leptospira* spp. *Leptospiras* patogênicas são capazes de evadir dos mecanismos imunes de defesa do hospedeiro, principalmente no que se refere às estratégias de migração para sítios

imunoprivilegiados, como rins e olhos, e evasão do sistema complemento (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011).

A primeira proteína de *Leptospira* a ser identificada como essencial para a virulência foi Loa22, proteína de membrana externa contendo um domínio C-terminal OmpA, que supostamente faz a ligação entre a membrana externa e a camada de peptidoglicano (NALLY et al., 2007). Ristow et al. (2007) utilizaram um mutante *loa22* em *hamsters* e em porquinhos da índia e o mesmo mostrou-se totalmente avirulento, sugerindo um papel dessa proteína na virulência da leptospirose.

Outro mecanismo fundamental para a patogênese da doença é a motilidade da bactéria (DELIBERALLI, 2014). A capacidade de deslocamento em meios altamente viscosos e a localização interna do flagelo periplasmático, que além de permitir a proteção contra variações extremas de condições externas, como pH e osmolaridade, também previne a imobilização da bactéria via anticorpos anti-flagelares, sendo então características evolutivamente vantajosas para a espiroqueta (CHARON; GOLDSTEIN, 2002; GOLDSTEIN; CHARON, 1988). Estudos de mutagênese mostraram que as proteínas FlaA e FliY que compõem o flagelo são essenciais para a virulência das Leptospiras, e FlaB, essencial para motilidade (LAMBERT et al., 2012; LIAO et al., 2009; PICARDEAU; BRENOT; SAINT GIRONS, 2001).

Trabalhos como os de Liao et al. (2009) e Lambert et al. (2012) anularam a motilidade da *Leptospira* por inativação dos genes envolvidos na biossíntese ou na estrutura flagelar e observaram que a inativação de *fliY*, o qual codifica uma proteína flagelar motora, resultou na atenuação da virulência em porquinhos da índia. Além disso, a mutação de *flaA2*, mas não *flaA1*, levou a virulência atenuada em *hamsters*, possivelmente porque os mutantes *flaA1* mantiveram alguma mobilidade de translação.

O ferro é essencial para a viabilidade da maioria das bactérias e a capacidade de adquirir ferro *in vivo* é um fator de virulência importante. Leptospiras patogênicas possuem a enzima heme oxigenase, também conhecida como HemO, que facilita a aquisição de ferro presente no heme, principal fonte de ferro nas células do hospedeiro mamífero (MURRAY et al., 2008, 2009).

Em humanos a leptospirose apresenta um amplo espectro de sintomas, ou até a ausência dos mesmos, desde febre alta e sintomatologia similar à gripe até suas formas mais graves, a síndrome de Weil e a Síndrome Hemorrágica Pulmonar Severa (SPHS) (DUPONT et al., 1997). A síndrome de Weil, caracterizada pela tríade icterícia, insuficiência renal e hemorragia, pode apresentar taxa de mortalidade de até 15% (LEVETT, 2001). Já a SPHS,

possui taxa de mortalidade de mais de 50% e pode causar insuficiência respiratória, arritmias e estado mental alterado (MCBRIDE et al., 2005; RICALDI; VINETZ, 2006).

A severidade da leptospirose humana pode variar de acordo com a idade, estado de saúde e imunocompetência do paciente e com o sorovar de *Leptospira*. As primeiras manifestações são dor de cabeça e febre, indistinguível daquelas causadas por qualquer outra infecção. Mialgias, mal-estar e sufusão conjuntival também são comuns. Muitos desses sintomas fazem com que a leptospirose seja confundida com outras doenças infecciosas, dificultando estudos epidemiológicos e tratamento, caracterizando a doença como negligenciada (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; MCBRIDE et al., 2005; RICALDI; VINETZ, 2006).

No cão, embora a maioria dos sorovares possa causar leptospiremia e vasculite, o envolvimento dos órgãos está relacionado ao sorovar infectante (GEISEN et al., 2007). A leptospirose canina típica apresenta como sinais clássicos febre, icterícia, vômitos, diarreia, coagulação intravascular disseminada, uremia causada por falha renal, hemorragias e por fim, a morte (BOLIN, 1996).

Em bovinos e suínos, a maioria das infecções causadas por *Leptospiras* são assintomáticas, e sinais reprodutivos são a principal evidência de infecção. Esses sinais de leptospirose incluem problemas reprodutivos, como aborto, natimortos, mumificação fetal, prole fraca e agalática (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Na fase aguda as principais manifestações clínicas nos bovinos são febre, anemia hemolítica com hemoglobinúria, icterícia e petéquias nas mucosas, alterações no leite como queda na produção e leite avermelhado com presença de coágulos (RADOSTITS et al., 2000). Na forma crônica ocorrem infertilidade, aborto, natimortos e a queda na produção de leite, além de gerar perdas econômicas relacionadas a custos com assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais (TONIN et al., 2010).

As formas mais graves ocorrem com mais frequência em bezerros e cursa com febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão e angústia pulmonar, insuficiência renal e hepática, e ocasionalmente meningite e morte (FAINE, 1999). Já em equinos a principal manifestação da doença é uveíte recorrente, que também é observada em humanos. Animais que se recuperam da leptospirose podem se tornar portadores assintomáticos de *Leptospiras* por longos períodos e eliminá-las no ambiente (LEVETT, 2001).

2.6 PREVENÇÃO

No contexto brasileiro, a transmissão da leptospirose se dá principalmente em cenários propícios à disseminação de roedores. O controle da leptospirose consiste basicamente em interromper a transmissão através da identificação da fonte e melhoramento das condições de higiene da população, bem como a vacinação das espécies acometidas pela doença (CUNHA, 2014).

A implementação de uma série de medidas de controle, como o controle da população de roedores, a manutenção de um ambiente desfavorável à sobrevivência das *Leptospiras*, isolamento e tratamento dos animais infectados, além de se evitar o contato com água de enchente, se faz necessário para que não ocorra a disseminação da doença (RODRIGUES, 2008).

Como alternativa para o controle da doença, tem-se as bacterinas, vacinas atualmente disponíveis contra leptospirose. Porém, estas vacinas são sorovares- específicas, sendo necessários estudos epidemiológicos contínuos para que se tenha conhecimento dos sorovares prevalentes numa determinada região e assim incluí-los da preparação da vacina. Além disso, esse tipo de vacina não é indicado para humanos em razão da sua elevada reatogenicidade, justificando o estudo para o desenvolvimento de novas vacinas visando o controle desta zoonose (DELLAGOSTIN et al., 2011; FAINE, 1999).

Atualmente busca-se estratégias que possibilitem o desenvolvimento de uma resposta imune duradoura e que induza proteção cruzada entre vários sorovares através de novos adjuvantes, vias de apresentação de antígenos ou fusão/coadministração de antígenos (CUNHA, 2014).

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE

Métodos diretos (identificam o agente etiológico) e indiretos (detectam anticorpos) são empregados para o diagnóstico da leptospirose (FAINE, 1999). O diagnóstico indireto é realizado através de provas sorológicas como a soroaglutinação microscópica (SAM). Este é o teste atualmente preconizado pela Organização Mundial de Saúde, padrão ouro no diagnóstico da leptospirose humana (WHO, 2010) e animal (OIE, 2012). Apesar de eficaz não permite ser aplicado na forma aguda (inicial), que é o momento mais determinante quanto ao curso da doença (WHO, 2010).

A SAM, quando empregada para o diagnóstico da leptospirose deve seguir a recomendação oficial de apresentar pelo menos um representante por sorogrupo da coleção de

antígenos utilizada para o teste. Além dos cuidados com a coleção de antígenos deve-se ainda observar outros parâmetros para a eficácia do teste, tais como: a temperatura e tempo de incubação adotados, idade e densidade dos cultivos, bem como a diluição final dos soros (SARMENTO et al., 2012).

O teste padrão-ouro (SAM), é bastante complexo e por isso exige mão de obra especializada (Leptospiras vivas são utilizadas como antígenos) e laboratórios equipados o que torna alto o custo para sua implantação. Uma desvantagem do teste é sua baixa sensibilidade que possibilita a ocorrência de reações cruzadas entre diferentes sorovares. O teste também não permite diferenciar entre infecções atuais, recentes ou passadas (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2012). Diante das limitações do teste padrão-ouro, atualmente é crescente a busca por novos métodos diagnósticos (SOUZA, 2014).

Com isso, diferentes Ensaios de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) vêm sendo desenvolvidos com o intuito de adotar um teste que seja mais rápido e que permita diferenciar entre uma infecção aguda ou crônica, principal vantagem dessa técnica (FLANNERY et al., 2001; HAMOND et al., 2012). ELISAs já foram desenvolvidos tanto para o diagnóstico humano como animal. No entanto, ainda é um desafio o desenvolvimento de um Kit ELISA adequado para identificação de todos os sorovares, assim dependendo do antígeno pesquisado o teste pode não ser suficiente para diagnosticar a leptospirose, sendo necessário a adoção de técnicas complementares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (PICARDEAU, 2013).

Estudos como o de Higino et al. (2012) utilizaram a SAM para investigar a prevalência de leptospirose em caprinos leiteiros de propriedades do Município de Monteiro, microrregião do Cariri Ocidental, Estado da Paraíba. Embora a espécie seja considerada menos susceptível a infecção, a situação tem se agravado principalmente em propriedades que apresentam outras espécies animais em conjunto (LEON-VIZCAINO; HERMOSO DE MENDOZA; GARRIDO, 1987). Higino et al. (2012) utilizaram como antígenos uma coleção de 24 sorovares para avaliar os 975 caprinos de propriedades do semiárido paraibano, obtendo na ordem de prevalência os sorovares Autumnalis, Sentot e Whitcomb.

Castro et al. (2011) analisou em seu estudo a prevalência de *Leptospira spp.* em cães domésticos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. O estudo utilizou a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), padrão ouro para animais e humanos e que foi aplicado em pessoas do mesmo município no ano de 2008. Com isso o trabalho teve como comparar os sorovares isolados e determinar se se tratava do mesmo sorovar ou de sorovares diferentes. Os cães reagiram principalmente aos sorovares Autumnalis (34,2%) e Tarassovi

(23,7%), sendo este também detectado em humanos no mesmo ano. O resultado desse estudo demonstra a importância epidemiológica de técnicas sorológicas de diagnóstico, tais como a SAM, pois através dela os autores puderam constatar que ambos foram infectados pela mesma fonte ou que o cão foi o provável transmissor para o homem.

Estudos como os de McBride et al. (2007) e Oliveira et al. (2008), adotaram técnicas sorológicas similares (ELISA e SAM), além do estudo de ambos ter sido voltado para o diagnóstico da leptospirose em humanos. O primeiro estudo foi realizado na cidade de Salvador, e avaliou a eficácia de quatro testes sorológicos: SAM, ELISA Dip-S-Tick (PanBio), LeptoTek Dri-Dot (Biome'rieux) e EIE-IgM-Leptospirose (Bio-Manguinhos). Todos os ensaios com exceção do Dri-Dot que detecta anticorpos específicos da doença, detectam IgM. Esse estudo relatou que o teste ELISA PanBio foi o que apresentou a maior sensibilidade de detecção. Podendo ainda constatar que apesar dos três testes serem mais sensíveis que o SAM durante a fase inicial da doença, os mesmos ainda apresentam limitações apesar da elevada especificidade apresentada. McBride et al. (2007) alertou ainda para a necessidade do desenvolvimento de kit-diagnósticos mais eficazes para essa enfermidade.

Já o segundo estudo (OLIVEIRA et al., 2008), avaliou o uso de duas proteínas recombinantes a MPL17 e MPL21. Essas proteínas estão presentes na superfície de *Leptospiras* e têm sido comumente estudadas como possíveis alvos para o diagnóstico da infecção. Diante dessa possibilidade, Oliveira e colaboradores (2008) estudaram sua utilização em ensaios sorológicos (ELISA e SAM), conseguindo demonstrar que se trata de proteínas altamente imunogênicas que quando utilizadas em conjunto, podem ser úteis para diagnosticar a leptospirose.

Outro estudo analisou o comportamento da doença no homem, através da aplicação da técnica de ELISA. Este trabalho relatou um dos principais problemas para o diagnóstico da doença: a realização de diagnósticos diferenciais para distinguir a leptospirose de outras doenças que ocorrem na mesma sazonalidade, tais como a dengue (BEZERRA et al., 2015).

Técnicas moleculares são utilizadas no diagnóstico de muitas doenças por serem altamente sensíveis e específicas, a exemplo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real que utilizam equipamentos automatizados que garantem uma maior segurança e confiabilidade aos resultados. Estas técnicas têm sido desenvolvidas visando diagnosticar precocemente a leptospirose (BOURHY et al., 2011). Apesar de sensível a técnica de PCR apresenta limitações, já que há dificuldade de identificação da doença em sua fase inicial e a sensibilidade da PCR diminui nas fases tardias da mesma. Talvez, por isso, as técnicas sorológicas ainda são mais comumente utilizadas (BLANCO; ROMERO, 2014).

No homem, a leptospirose pode ser facilmente confundida com outras enfermidades que ocorrem à mesma sazonalidade e com características clínicas semelhantes, caso não sejam realizados diagnósticos laboratoriais específicos. Diante disso, Bezerra et al. (2015) estudaram pacientes com suspeita clínica de dengue em um período de grande incidência da doença no estado do Ceará, objetivando aplicar um diagnóstico diferencial para leptospirose, descartando ou confirmando sua ocorrência. Seus estudos envolveram técnicas sorológicas e moleculares, sendo a RT-PCR (do inglês, *Reverse transcription polymerase chain reaction*) a técnica molecular adotada que ajudou a identificar, em meio a 86 casos suspeitos de dengue, 5 indivíduos positivos para leptospirose. O estudo demonstra que em situações epidêmicas e devido às similaridades clínicas dessas doenças, um diagnóstico errôneo pode estar sendo aplicado.

Dificuldades no diagnóstico da leptospirose tem impulsionado a busca por métodos diagnósticos mais eficazes, como propôs o estudo de Balassiano et al. (2012). Seu trabalho testou a reação em cadeia da polimerase de imunocaptura (IC- PCR) utilizando anticorpos monoclonais e policlonais. Seus resultados demonstraram na IC-PCR com anticorpos policlonais capacidade de reconhecer diferentes sorovares, embora tenha ocorrido algumas reações cruzadas no teste. O inverso ocorreu utilizando anticorpos monoclonais, onde apesar de não ter sido observado reações cruzadas a sensibilidade apresentada foi baixa. Contudo, de acordo com os autores o teste revelou ser específico para *Leptospira* e, portanto, um teste promissor.

Além da procura por novos métodos diagnósticos, estudos recentes estão a todo instante verificando a eficácia das técnicas já utilizadas bem como uma forma de potencializá-las utilizando-as em combinação com outras técnicas almejando um resultado mais preciso e seguro.

Atualmente, são poucos os laboratórios disponíveis no país para o diagnóstico da leptospirose (PORTAL DA SAÚDE). Este fato causa demora na obtenção do resultado e aumento no custo associado ao condicionamento, refrigeração e transporte das amostras clínicas.

2.8 MEMBRANA EXTERNA DA LEPTOSPIRA

A estrutura de dupla membrana agrega características de bactérias Gram- negativas, porém com a camada de peptidoglicano ancorada à membrana interna (MI), típico de bactérias

Gram-positivas (VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008). A membrana externa (OM) apresenta LPS e diversas lipoproteínas, as quais têm sido consideradas potenciais alvos vacinais (DELLAGOSTIN et al., 2011; HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Os lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa são o principal antígeno das *Leptospiras*. Ele é imunologicamente semelhante ao LPS de organismos Gram-negativos, porém com menor atividade endotóxica (LEVETT, 2001).

Os LPS de bactérias Gram-negativas são altamente imunogênicos, tanto que inicialmente pensava-se que ele era o único antígeno importante nas *Leptospiras* e que provocava uma resposta protetora exclusivamente humoral (FAINE, 1999). Atualmente se sabe que também existem várias proteínas expostas na superfície da membrana que interagem com o sistema imune (CULLEN et al., 2005; CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004), e que embora o LPS continue sendo a estrutura mais imunogênica, não é a única.

Recentemente, foram identificadas várias proteínas da membrana externa (*outer membrane protein*) das *Leptospiras* que são altamente imunogênicas. As OMPs de *Leptospiras* foram divididas em três classes (CULLEN et al., 2003). Através de técnicas de proteômica, Malmström et al. (2009) determinaram o número de cópias de proteínas por célula, demonstrando que as lipoproteínas são as proteínas mais abundantes na célula leptospiral. A maior classe de OMPs é composta pelas lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL36, LipL48 e LipL41 (HAUK et al., 2005).

A LipL32 é uma proteína de 32kDa e é muito abundante em *Leptospiras* patogênicas, representando 75% do proteoma da membrana externa (CULLEN et al., 2002), não existindo em saprófitas (CULLEN et al., 2005; CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; MATSUNAGA et al., 2005). Além de ser a proteína mais reconhecida pelo soro de pacientes infectados com leptospirose (HAAKE et al., 2000), ela possui atividade de hemolisina (HAUK et al., 2005).

A segunda e terceira classes de proteínas são compostas por apenas um representante cada uma. A OmpL1 (segunda classe) é uma proteína transmembrana com função de porina e a P31LipL45 (terceira classe) é uma proteína periférica da membrana que usa o canal de secreção das lipoproteínas para se lançar nas membranas interna e externa da bactéria (CULLEN et al., 2003).

Recentemente, uma quarta classe de proteínas de membrana foi descrita. Ela é constituída pelas Ligs (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*) e possui três proteínas identificadas até agora: Lig A (PALANIAPPAN et al., 2002), Lig B e Lig C (MATSUNAGA et al., 2003).

O sistema imune dos pacientes infectados com leptospirose responde a essas proteínas de forma muito efetiva e, por isso, elas têm sido consideradas para uso no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, tanto para detecção de anticorpos (FLANNERY et al., 2001; OKUDA et al., 2005) como para detecção de antígenos (TAYLOR et al., 1997).

2.9 UTILIZAÇÃO DA LIPL32

A LipL32 é uma proteína altamente imunogênica, mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos anti-LipL32 (GUERREIRO et al., 2001). Experimentos de Hoke et al. (2008) e Hauk et al. (2008) demonstraram que a LipL32 se liga a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como laminina, colágeno I, IV e V, e fibronectina do plasma, sendo importante para a adesão bacteriana na matriz extracelular do hospedeiro.

Atualmente, há diversas pesquisas no sentido de desenvolver novos testes diagnósticos que sanem as falhas das metodologias já empregadas. Nesse contexto, têm-se desenvolvido reações em cadeia da polimerase para detectar e quantificar a carga de *Leptospiras* no sangue (qPCR), soro ou tecidos, ELISA, teste de aglutinação de microesferas de látex e testes imunocromatográficos (AHMED et al., 2006; BOURHY et al., 2011; CANAL et al., 2013; DENEKE et al., 2014; MCBRIDE et al., 2007; PALANIAPPAN et al., 2004; STODDARD et al., 2009; YE et al., 2014).

Para eliminar as adversidades do cultivo de baterias de sorovares de *Leptospiras*, a maioria desses testes emprega antígenos recombinantes de *Leptospira* patogênicas, principalmente a proteína LipL32 (MCBRIDE et al., 2007). Ensaio imunoenzimático para detectar anticorpos anti-*Leptospiras* em amostras biológicas estão disponíveis comercialmente ou em desenvolvimento (VASCONCELLOS, 2007). A proteína da membrana externa LipL32, específica de leptospirose patogênicas (HAAKE et al., 2000), foi utilizada como antígeno em ELISA para o diagnóstico sorológico de leptospirose em caninos (DEY et al., 2004) e em bovinos (BOMFIM; KO; KOURY, 2005), mostrando-se mais sensíveis e específicos do que a SAM.

Múltiplos estudos foram realizados utilizando a LipL32 como candidata vacinal e foi demonstrado que a proteína promove proteção contra *L. interrogans* sorovares Canicola (BRANGER et al., 2005) e Copenhageni (GRASSMANN et al., 2012; SEIXAS et al., 2007b),

mas não contra *L. interrogans* sorovares Pomona (CAO et al., 2011) e Manilae (LUCAS et al., 2011) em hamsters.

Branger et al. (2005) observaram que uma vacina de DNA codificando LipL32 conferiu imunidade protetora contra *L. interrogans* sorovar Canicola em chinchila. Humphryes et al. (2014) realizaram experimentos com hamsters e verificaram que o grupo imunizado com LipL32 recombinante não apresentou aumento significativo na taxa de sobrevivência dos animais após desafio com *L. interrogans* sorovar Canicola, mas verificaram diminuição significativa na quantidade de Leptospiras presentes nos rins e na taxa de lesões nesse órgão, indicando que apesar da proteína recombinante não ter conferido completa proteção após desafio, ela foi capaz de reduzir a severidade da infecção nos animais.

Estudos de Grassmann et al. (2012) demonstraram que a LipL32 conferiu imunidade protetora contra *L. interrogans* sorovar Copenhageni em hamsters quando a proteína foi coadministrada com a subunidade B da enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Contribuir para o desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido, de fácil interpretação e acessível em nível ambulatorial que possa diagnosticar em minutos a leptospirose humana e animal em qualquer fase da infecção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Padronizar a produção *in vitro* de antígeno recombinante de *Leptospira* (LipL32) para uso futuro na técnica de aglutinação em látex.

Para tal, pretende-se neste trabalho fazer a clonagem, expressão e purificação da LipL32 recombinante produzida em sistema *E. coli* BL21(DE3).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Laboratório Interdisciplinar do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE LIPL32 DE LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS

4.2.1 Amostra

A coleção de culturas bacterianas de *Leptospiras* patogênicas (Quadro 3) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo.

Quadro 3 *Leptospiras* patogênicas usadas neste estudo de acordo com a cepa, espécie, sorogrupo, sorovar e instituição de origem

Cepa	Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Instituição de Origem
Pomona	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Instituto Pasteur
Sponselee	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Instituto Pasteur
Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Instituto Pasteur
Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Instituto Pasteur
Ballico	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Instituto Pasteur
Akiyami A	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Instituto Pasteur
Verdun	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Instituto Pasteur
M84	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	Instituto Pasteur
Djasiman	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Instituto Pasteur
Van Tienen	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Instituto Pasteur
Castellon 3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Instituto Pasteur
CZ 214K	<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	Instituto Pasteur

Jez Bratislava	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	FIOCRUZ
M20	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	FIOCRUZ
Perepelitsin	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Instituto Pasteur
3705	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	Instituto Pasteur
3522C	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	Instituto Pasteur
BOV G	<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	FIOCRUZ
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Instituto Pasteur

Fonte: Elaboração do autor, 2019.

4.2.2 Extração do DNA genômico da *Leptospira*

A extração do DNA da *Leptospira* foi realizada seguindo o protocolo de lise com isotiocianato de guanidina proposto por Ruibal (2009).

Foi pipetado 400 µL da amostra em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) mais 900 µL de GT (60g de isotiocianato de guanidina + 5 mL de TRIS-HCl 1M pH 7,5 + 10 mL de EDTA 0,25 M pH 8,0 + 100 mL de fenol + ddH₂O q.s.p. 100 mL) em um microtubo de 1500 µL. O material foi Vortezado por 15 segundos com intervalo de 10 minutos, e um novo vórtex ao final. Em seguida foi acrescentado 200 µL de clorofórmio com conseguinte vórtex de 15 segundos. Após 10 minutos incubando em temperatura ambiente (37°C), foi centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e adicionado igual volume de propanol com o intuito de insolubilizar o DNA. Após a insolubilização o material foi congelado por 2 horas a -20°C com posterior centrifugação a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado com cuidado e o pellet resultante foi ressuspensionado em 500 µL de etanol 70% e homogeneizado manualmente. Posteriormente, o eppendorf foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 30 µL de TE com vórtex e spin rápido ao final. O DNA genômico foi submetido a um banho seco a 56° C por 15 minutos e foi acondicionado em freezer -20°C.

4.2.3 Amplificação do gene *lipL32* por PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação deste gene foram validados em trabalhos já publicados, de acordo com Seixas et al. (2007) e Amutha et al. (2007) (Quadro 4).

Quadro 4 Primer, sequência e comprimento do fragmento direcionado ao gene *LipL32*

Primer	Sequência 5' - 3'	Amplicon	Referência
L.copen LipL32-For	GGGGTACCGGCGGCGGTGGTCTGCCAAGCCT	771 pb	(SEIXAS et al., 2007a)
L.copen LipL32-Ver	GGAATTCTTACTTAGTCGCGTCAGAAGC		(SEIXAS et al., 2007a)
L.autum LipL32-For	CGCGCTGCAGTTACTTAGTCGCGTCAGAAG	756 pb	(AMUTHA et al., 2007)
L.autum LipL32-Ver	CGCGGTTCGACGCTTTCGGTGGTCTCTGCCAAGC		(AMUTHA et al., 2007)

Fonte: Elaboração do autor, 2019.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas num volume de 25µL, contendo 12,5 µL de pré-mix 2x My Taq Red Mix (Bioline) (1.5 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP e estabilizadores), 1,25 µL de cada *primer* (10µM), 9 µL de água DEPC e 1 µL de DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador T100 thermal cycler utilizando programa com desnaturação inicial de 5 min (95 °C), 35 ciclos de desnaturação (95 °C), anelamento (50 °C) e extensão (72 °C), todos por um período de 30 s, e extensão final de 7 min (72 °C) utilizando o primer L.copen LipL32, e um programa com desnaturação inicial de 3 min (94 °C), 30 ciclos de desnaturação (94 °C) por 30 s, anelamento (62 °C) por 45 s e extensão (72 °C) por 30 s, e extensão final de 10 min (72 °C) utilizando o primer L.autum LipL32 . Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), por 45 minutos a 100 volts, utilizando o brometo de etídeo (0,5mg/mL), como corante evidenciador do DNA. Os *primers* tinham, em suas extremidades 5', sítios de restrição para as enzimas EcoR I e Kpn I, para permitir a inserção no sentido correto no plasmídeo recombinante. Após a amplificação dos fragmentos, eles foram armazenados no freezer -20°C para posterior construção de vetores recombinantes.

4.3 CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE LIPL32

4.3.1 Vetor e Cepa

4.3.1.1 Vetor de expressão bacteriano

O vetor recombinante utilizado neste estudo já havia sido previamente construído, pAE / lipL32 (SEIXAS et al., 2007a) e cedido pelo laboratório de Vacinologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (CDTec/UFPel).

4.3.1.2 Cepas de *E.coli* utilizadas

As cepas utilizadas foram as linhagens de *E. coli* XL1-Blue, BL21(DE3) PLYs e *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Quadro 5). A *E. coli* XL1-Blue foi utilizada para a clonagem e a BL21(DE3) PLYs e *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes.

Quadro 5 Linhagens, genótipo, meio de cultura e antibiótico utilizado

Linhagem	Genótipo	Meio de Cultura	Antibiótico
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'[proAB⁺ lac^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>	Luria-Bertani (LB)	Cloranfenicol 100 µg/ml
<i>E. coli</i> BL21 Star™ (DE3)	<i>F⁻amp^r hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcmrne131 (DH3)</i>	LB	Cloranfenicol 100 µg/ml
<i>E. coli</i> BL21(DE3) PLYs	<i>B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) gal λ(DE3) [pLYsS Cam^r]</i>	LB	Cloranfenicol 100 µg/ml

Fonte: Elaboração do autor, 2019.

4.3.2 Preparo de bactérias competentes por CaCl₂

As bactérias foram semeadas em placa LB-ágar, incubadas por 16 horas a 37 °C. Duas colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo LB e este mantido por 16 horas a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi transferido para 100 mL de caldo LB e a suspensão incubada por 2-3 horas a 37°C sob agitação a 250 rpm. Ao atingir densidade ótica (OD 600nm) igual a 0,4 lido em espectrofotômetro, o cultivo foi transferido para dois tubos do tipo falcon de 50 mL e em seguida para gelo por 30 minutos para estacionar a divisão celular. Os tubos tipo falcon

contendo as células bacterianas foram centrifugados a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi suspenso em 25 ml de CaCl₂ 100 mM estéril gelado, incubado em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente centrifugado nas condições anteriores. Os precipitados foram ressuspendidos em 6 mL de CaCl₂ 100 mM gelado contendo 15 % de glicerol. As bactérias competentes foram distribuídas em alíquotas de 250 µL em microtubos de 1,5 mL, os quais foram imediatamente congelados e estocados a -80°C. Foi utilizada a linhagem de *E. coli* XL1-Blue quimiocompetente para a transfecção do plasmídeo contendo o inserto do gene LipL 32.

4.3.3 Transformação de bactérias *E. coli* XL1-Blue

Foram retirados do freezer -80°C as cepas competentes e o vetor, incubando em gelo por 30 minutos. Aproximadamente, 50ng do vetor previamente quantificado por espectrofotometria (Nanodrop®) foi adicionado a 100 µL de bactérias competentes e a mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 60 segundos e imediatamente incubadas em banho de gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 900 µL de meio LB e incubada a 37 °C por 1h – 1h:30 minutos a 200 rpm. Após essa recuperação 200 µL do inóculo foi semeado em placas de meio LB contendo 100 µg/ml de cloranfenicol. As placas serão incubadas a 37 °C *overnight*.

4.3.4 Cultivo das células transformadas

Para o cultivo das células transformadas o 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside (X-Gal) 2% (solubilizado com DMSO) foi utilizado como indicador de transformantes com o inserto, 15 µl do produto a 50mg/ml foram espalhados sobre o meio LB Agar seletivo (100 µg/ml de cloranfenicol e 100 µg/ml de ampicilina) antes da inoculação dos transformantes. As placas com as células transformadas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para a seleção dos clones positivos contendo o inserto, todas as unidades formadoras de colônias (UFCs) que apresentaram a coloração branca foram novamente plaqueadas e testadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação deste gene foram validados em trabalhos já publicados (Quadro 4).

4.3.5 Extração de plasmídeos

Após a seleção dos clones que continham o plasmídeo escolhido através da PCR e visualização em gel de agarose a 1%, os mesmos foram cultivados em LB caldo seletivo por 14 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm. Após o final do cultivo utilizou-se o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” da Promega, a fim de isolar e purificar o DNA plasmidial, segundo as recomendações do fabricante.

Foi realizada a colheita de 10 mL da cultura bacteriana por centrifugação durante 5 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi despejado e o tubo invertido para remover o excesso. Adicionou-se 250 µL de Solução de Ressuspensão Celular e o sedimento foi completamente ressuspensionado por meio de vórtex. O produto foi transferido para microtubos de 1500 µL. Logo após foi adicionado 250 µL de solução de lise celular e homogeneizado manualmente. Foi incubado até se observar a limpeza parcial do lisado (aproximadamente 1 a 5 minutos). Consequente foi adicionado 10 µL de Solução de Protease Alcalina e misturado invertendo o tubo quatro vezes. A solução foi incubada por cinco minutos a temperatura ambiente. A protease alcalina inativa as endonucleases e outras proteínas liberadas durante a lise das células bacterianas que pode afetar adversamente a qualidade do DNA isolado. Posterior a lise das células, foi adicionado 350 µL de Solução de Neutralização e misturado imediatamente invertendo o tubo quatro vezes. O lisado bacteriano foi centrifugado à velocidade máxima (cerca de 14.000 × g) numa microcentrífuga durante 10 minutos a temperatura ambiente.

O lisado limpo (aproximadamente 850 µL) foi transferido para a coluna de centrifugação e centrifugado à velocidade máxima por 1 minuto em temperatura ambiente. Foi descartado o filtrado e adicionado 750 µL de solução de lavagem de coluna, previamente diluída com etanol a 95%, à coluna de centrifugação. Novamente o material foi centrifugado a velocidade máxima durante um minuto à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e repetiu-se o procedimento de lavagem usando 250 µL de solução de lavagem de coluna. Consequente foi realizado a centrifugação à velocidade máxima durante dois minutos à temperatura ambiente. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 1500 µL estéril. O DNA do plasmídeo foi diluído adicionando 100 µL de água livre de nuclease à coluna de centrifugação. O conjunto (microtubo e coluna de centrifugação) foi centrifugado a velocidade máxima por 1 minuto em temperatura ambiente. A coluna foi descartada e o DNA plasmidial armazenado no freezer – 20°C.

4.3.6 Expressão da proteína recombinante

4.3.6.1 Preparo de Células de expressão competentes por CaCl_2

As linhagens BL21(DE3) PLys e *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foram preparadas conforme descrito no item 4.3.2.

4.3.6.2 Transformação das Células de expressão

As cepas competentes das linhagens BL21(DE3) PLys e *E. coli* BL21 Star™ (DE3) e o plasmídeo foram retiradas do freezer -80°C e submetidas a banho de gelo por 30 minutos. Aproximadamente, 50ng do vetor foi adicionado a 100 μL de bactérias competentes e a mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 60 segundos e imediatamente incubadas em banho de gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 900 μL de meio LB e incubada a 37°C por 1h – 1h:30 minutos a 200 rpm. Após essa recuperação 200 μL do inóculo foi semeado em placas de meio LB contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

4.3.6.3 Crescimento do inóculo e indução da expressão por isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

Para expressão de proteínas recombinantes, cepas bacterianas, BL21(DE3) PLys e *E. coli* BL21 Star™ (DE3), transformadas com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em cinco mL de meio de cultura LB com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), mantidos sob agitação em torno de 250 rpm à temperatura de 37°C por 16 horas. Posterior a essa etapa, a cultura foi diluída na proporção 1:20 em meio LB com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), e mantida nas mesmas condições de crescimento citadas acima por aproximadamente três horas, até a cultura atingir uma densidade óptica de 0,6 com comprimento de onda (600 nm).

Quando a absorbância desejada foi atingida, as culturas foram separadas em frações para gerar controles, não induzido e induzidos. Após o fracionamento da cultura, a expressão de proteínas recombinantes foi induzida por 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A ativação das bactérias contendo os plasmídeos recombinantes foi feita por 16 horas a 37°C , com coletas de 1 mL de cada amostra nos tempos de 0 a 5 e 16 horas. Cada alíquota proveniente das coletas foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o pellet foi utilizado

para verificar o tempo em que a proteína é expressa em maior concentração pela bactéria, através de uma eletroforese em um SDS-PAGE.

4.4 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR LISE CELULAR POR SONICADOR

A cultura bacteriana foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet de bactérias formado foi ressuspensionado em solução de tris-HCl 20 mM, pH 7,5 e submetido à lise celular por sonicator por cinco vezes em banho de gelo, 30 segundos cada vez. Essa suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado.

O primeiro sobrenadante foi novamente centrifugado, nas mesmas condições da primeira, para uma maior limpeza da amostra (denominado sp1), o pellet foi novamente ressuspensionado, sonicado uma vez por 30 segundos em gelo e centrifugado nas mesmas condições. O segundo sobrenadante foi denominado sp2.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A análise da proteína LipL32 foi realizada por eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis) com gel de separação a 12% e o de empilhamento a 5%.

Foram analisadas as amostras de cultura bacteriana com e sem ativação por IPTG nos diferentes tempos, com lise por sonicação. As amostras foram aplicadas diretamente no gel e foram preparadas por mistura com o tampão de amostra 6x concentrado, o qual contém SDS e β -mercaptoetanol, aquecidas por 10 minutos a 95°C.

A corrida foi feita em tampão de eletroforese tris/glicina/SDS, sob corrente de 25 mA em temperatura ambiente, até que o corante azul de bromofenol chegasse ao final do gel.

A coloração das proteínas separadas no gel foi realizada tratando-o com uma solução de Coomassie, o qual contém Coomassie blue R250, metanol, água destilada e ácido acético, durante 30 minutos e em seguida foi descorado em uma solução descorante feita com metanol, água destilada e ácido acético, até visualização das bandas de proteína. Após a coloração do gel, este foi fotografado e analisado no programa Image J versão 1.36b (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

5 RESULTADOS

5.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÃO DO GENE LIPL32 POR PCR

Através da quantificação por espectrofotometria (Nanodrop®) do material extraído por meio do protocolo de lise com isotiocianato de guanidina, foi observado eficiência na extração do DNA genômico das *Leptospiras* patogênicas (Tabela 2).

Tabela 2 Relação de pureza e quantificação do DNA genômico de cepas patogênicas de Leptospiras

Sorovar	Pureza	Concentração (ng/μl)
Pomona	2,69	1796,8
Hardjobovis	2,64	1754,2
Grippityphosa	1,13	1464
Canicola	1,74	2081
Australis	2,43	1431,1
Autumnalis	2,50	2264,5
Icterohaemorrhagiae	2.48	1632,9
Sejroe	2.65	2231,5
Djasiman	2,74	2053,2
Bataviae	2,54	1606,8
Castellonis	1,30	1675,8
Panama	2,71	1806,4
Bratislava	2,74	2197,5
Copenhageni	2,21	2219
Tarassovi	2,59	1530,1
Wolffi	2,52	1528
Cynopteri	2,53	1583
Guaricura	2,50	1490,1
Hebdomadis	1,80	1974,9

Fonte: Elaboração do autor, 2019.

Das 19 amostras submetidas a PCR direcionada ao gene da lipoproteína LipL32, todas geraram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 771 e 756 pb (Figura 1 – A e B).

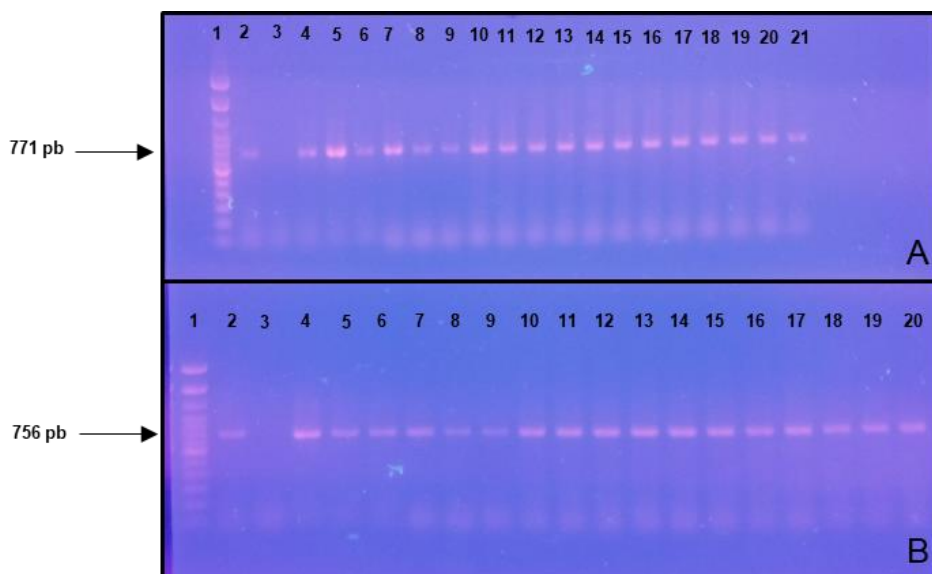


Figura 1. Amplificação do gene *LipL32* das cepas patogênicas de *Leptospiras*. A- Eletroforese em gel da agarose 1 % apresentando o resultado da amplificação do gene *lipL32* utilizando o primer *L.copen LipL32*. B- Eletroforese em gel da agarose 1 % apresentando o resultado da amplificação do gene *lipL32* utilizando o primer *L.autum LipL32*. 1) Marcador de peso molecular 100 pb; 2) controle positivo da reação de PCR; 3) controle negativo da reação de PCR (água); 4 – 21) amplificação do gene *lipL32* com aproximadamente 771 pb (A) e 756 pb (B).

5.2 TRANSFORMAÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

Várias colônias transformantes cresceram no cultivo em meio sólido seletivo contendo 100 µg/mL de cloranfenicol e ampicilina (Figura 2). Algumas destas foram aleatoriamente selecionadas e submetidas ao método de triagem miniprep.



Figura 2. UFCs de *E. coli* XL1 - Blue transformadas por choque térmico em meio LB seletivo com 100 µg/ml de cloranfenicol e ampicilina.

Após a realização da PCR das alíquotas provenientes das unidades formadoras de colônias (UFCs) que apresentavam a coloração branca, foi detectada positividade para amplificação do gene LipL32 (Figura 3). Evidenciando alta taxa de transformação na linhagem de *E. coli* XL1-Blue e sucesso na clonagem do gene LipL32 de *Leptospiras* para expressão heteróloga do peptídeo correspondente.

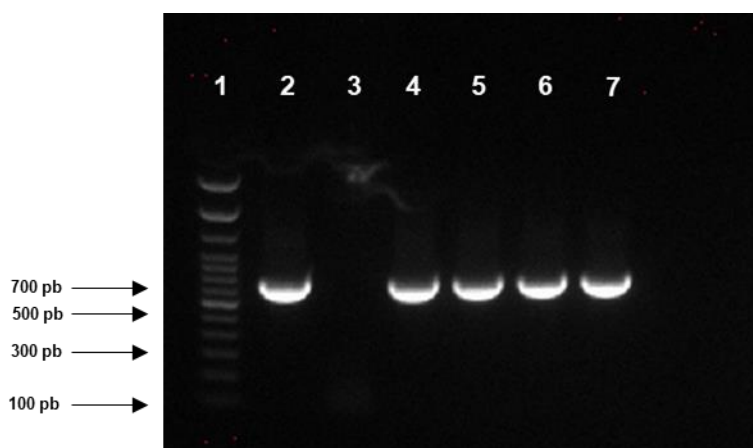


Figura 3. Eletroforese em gel da agarose 1 % apresentando o resultado da amplificação do gene *lipL32* dos clones extraídos da *E. coli* XL1 - Blue. 1) Marcador de peso molecular 100 pb; 2) controle positivo da reação de PCR; 3) controle negativo da reação de PCR (água); 4 – 7) amplificação do gene *lipL32* com aproximadamente 756 pb.

5.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA RL IPL32

O clone proveniente do miniprep foi utilizado para transformar por choque térmico células *E. coli* BL21(DE3) PLys e *E. coli* BL21 Star™ (DE3), que foram cultivadas em placas de meio LB contendo 100 µg/mL de cloranfenicol e ampicilina. Várias colônias transformantes cresceram no cultivo em meio sólido utilizando a cepa *E. coli* BL21(DE3) PLys, entretanto, não foi observado colônias transformantes utilizando a cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Figura 4 – A e B).

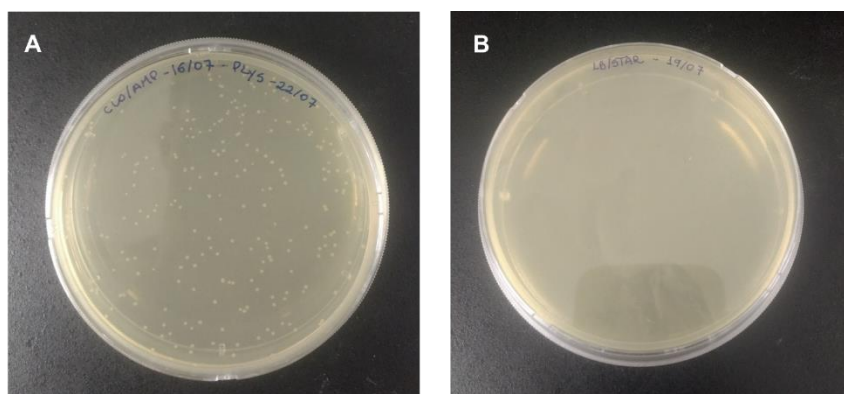


Figura 4. Transformação de células de expressão em meio seletivo com 100 µg/mL de cloranfenicol e ampicilina. A) células *E. coli* BL21(DE3) PLys; B) células *E. coli* BL21 Star™(DE3).

As colônias transformantes de *E. coli* BL21(DE3) PLys que cresceram no cultivo em meio sólido seletivo foram aleatoriamente selecionadas, submetidas ao método de triagem miniprep e o produto utilizado na PCR direcionada ao gene LipL32. Das alíquotas provenientes das unidades formadoras de colônias foi detectada positividade para amplificação do gene LipL32, evidenciando a transformação da célula com o clone de interesse (Figura 5).

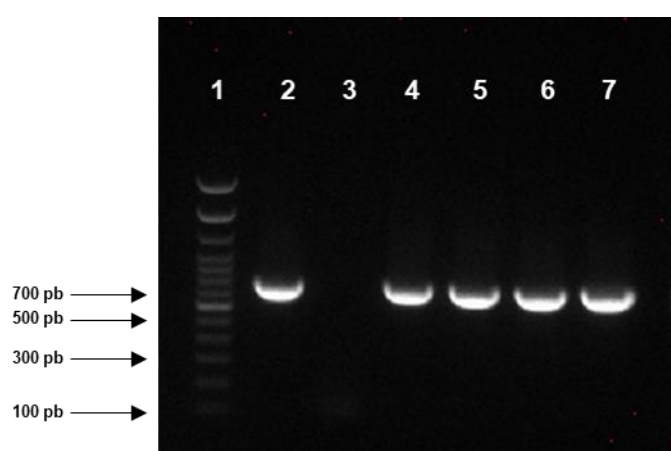


Figura 5. Eletroforese em gel da agarose 1 % apresentando o resultado da amplificação do gene *lipL32* dos clones extraídos da *E. coli* BL21(DE3) PLys. 1) Marcador de peso molecular 100 pb; 2) controle positivo da reação de PCR; 3) controle negativo da reação de PCR (água); 4 – 7) amplificação do gene *lipL32* com aproximadamente 756 pb.

As amostras provenientes do protocolo de expressão utilizando a cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3) PLys foram sonicadas, e as alíquotas, utilizadas para verificar o tempo em que a proteína foi expressa em maior concentração pela bactéria, através de uma eletroforese em um SDS-PAGE, todavia, encontrou-se dificuldade na visualização da proteína LipL32 em SDS-PAGE, sugerindo que a proteína heteróloga LipL32 não foi extraída em níveis satisfatórios utilizando os protocolos de lise (Figura 5 – A e B).

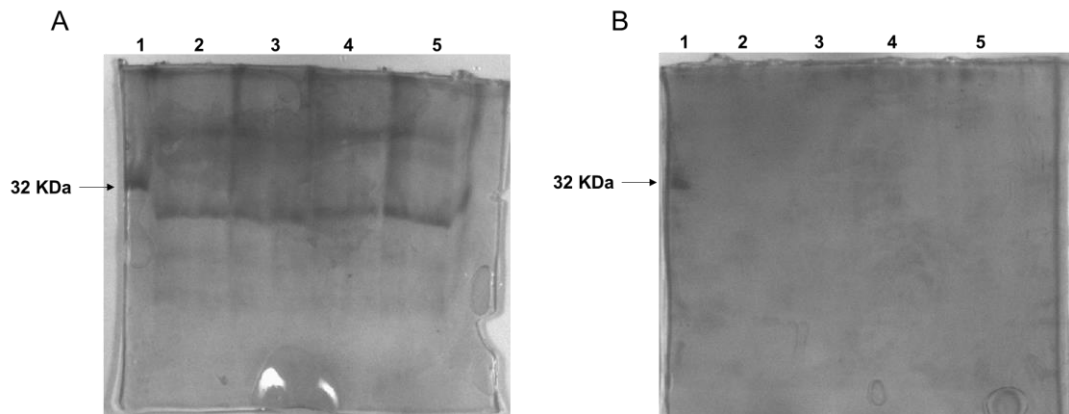


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % com extrato das células após indução de expressão. A) fração solúvel *E. coli* BL21(DE3) PLys B) fração insolúvel *E. coli* BL21(DE3) PLys. 1) controle positivo (LipL32 previamente caracterizada); 2 - 4) indução da expressão com 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 5° e 16° hora; 3 - 5) controle não induzido da 5° e 16° hora.

6 DISCUSSÃO

A leptospirose é uma antropozoonose de ampla distribuição mundial (KO, GOARANT, PICARDEAU, 2009), sendo um importante problema de saúde pública devido à alta incidência e elevada taxa de letalidade (FAINE, 1999). As perdas sociais e econômicas causadas por essa zoonose, e a dificuldade no diagnóstico da mesma, tem impulsionado a busca por métodos diagnósticos mais eficazes (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Proteínas imunogênicas conservadas, principalmente de membrana externa de *Leptospira*, são alvos promissores para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (CULLEN et al., 2002; DELLAGOSTIN et al., 2011)

A LipL32 é a mais abundante proteína transmembrana, sendo altamente imunogênica (CULLEN et al., 2005). Mais de 95% dos pacientes com Leptospirose produzem anticorpos anti-LipL32 (GUERREIRO et al., 2001), altamente conservada e expressa durante a infecção e imunodominante na resposta humoral contra esta doença em humanos (HOKE et al., 2008), representando uma alternativa de menor custo, maior segurança e especificidade para o desenvolvimento de testes sorológicos de diagnóstico.

A amplificação de um fragmento de 771 e 756 pb em todas as amostras submetidas a PCR direcionada ao gene da lipoproteína LipL32 já era esperada, tendo em vista que a LipL32 é codificada por um gene conservado entre as espécies patogênicas de *Leptospiras*, e ausente nas não patogênicas (HOKE et al., 2008).

A clonagem e expressão de proteínas heterólogas em microrganismos diversos possibilita a substituição de purificações trabalhosas e de baixo rendimento pela obtenção de elevadas quantidades de proteínas de interesse biotecnológico a um custo muito mais baixo (HOCKNEY, 1994). Vantagens como ter as características genéticas bem conhecidas e as proteínas expressas reterem sua atividade completa, fazem do microrganismo *E. coli* um sistema de expressão importante para a produção de proteínas recombinantes (MAKRIDES, 1996).

Das linhagens celulares testadas, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* BL21(DE3) PLys e *E. coli* BL21 Star™ (DE3), apenas a *E. coli* BL21 Star™ (DE3) não foi transformada com sucesso. A falha na transformação da cepa *E. coli* BL21 Star™ em meio Luria Bertani pode ter se dado devido a concentração dos componentes desse meio. Estudos como o de Hanahan (1983) que utilizou diferentes meios de cultura ricos para a transformação da *E. coli*, não evidenciou diferença ao comparar os meios, entretanto, as concentrações dos componentes alteraram as

taxas de crescimento e transformação. Neste estudo Hanahan observou que a presença de 10 a 20 mM de Mg^{2+} em todos os meios de cultura utilizados estimulou consideravelmente no crescimento da taxa de transformação, aumentando de 15 a 20 vezes. E a utilização de Ca^{2+} , Rb^{+} e DMSO auxiliaram nessa melhora.

Segundo Hannig e Makrides (1998), uma expressão de proteína heteróloga em *E. coli* deve atingir de 10 a 30% das proteínas totais expressadas pelas células para ser considerada satisfatória. Estudos como o de Lafeta (2010) encontraram dificuldade na visualização da proteína LipL32 em SDS-PAGE, assim como encontrado no nosso estudo. Ao comparar o lisado total de *E. coli* não induzida com o lisado total de *E. coli* induzida evidenciou que a LipL32 não foi expressa em níveis satisfatórios. Outros autores (GRASSMANN, 2008; DELIBERALLI, 2014; DEY et al., 2004 e LUO et al., 2009) obtiveram sucesso na expressão heteróloga da LipL32 utilizando a *E. coli*, no entanto em nenhum dos trabalhos citados há caracterização dos níveis de expressão.

Deliberalli (2014), Grassmann (2008) e Lafeta (2010) observaram que a proteína rLipL32 foi expressa na forma insolúvel, necessitando de um agente desnaturante para a solubilização dos corpos de inclusão do interior da célula. Segundo Georgiou e Segatori (2005) é difícil expressar proteínas insolúveis para o meio e obtê-las na forma solúvel e ativa, pois, frequentemente, a super expressão conduz à produção destes corpúsculos, que são agregados insolúveis de proteínas. No entanto, o protocolo de solubilização adotado por Gamberini et al. (2005), que utiliza uréia para solubilizar lipoproteínas de *Leptospiras*, é eficiente, comprovado no trabalho de Deliberalli (2014).

A estratégia mais comumente adotada para este tipo de problema é o uso de solução com 6 M ou 8 M de ureia, que desnatura completamente a proteína, interrompendo as interações moleculares que proporcionam a estrutura tridimensional (GRASSMANN, 2008). Entretanto, durante a diálise, a ureia é praticamente toda retirada, porém isso necessita um longo período de tempo para que a proteína possa retornar à conformação estrutural inicial. Assim, mesmo com a retirada da ureia, nas condições extracelulares a proteína pode estar alterada a tal ponto, que não consegue retornar à conformação original (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A baixa expressão da LipL32 obtida neste trabalho (Figura 6) e a dificuldade na visualização da mesma em gel SDS-PAGE pode ser devido a uma incompetência da célula escolhida, o protocolo de extração e coloração utilizado, ou ainda, uma combinação destes fatores. Com base nestes resultados recomenda-se que novos sistemas de expressão, extração e coloração devam ser testados com a finalidade de se obter uma maior expressão e visualização da proteína heteróloga para futuras aplicações. A detecção de peptídeos de baixo peso molecular

observados em SDS-PAGE pode ser devido à copurificação de componentes do meio de cultura ou à presença de proteases nas amostras extraídas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias de clonagem adotadas para a obtenção do plasmídeo pAE / lipL32 foram eficazes, entretanto, a cepa *E. coli* BL21(DE3) PLys nas condições utilizadas, não expressou em níveis satisfatórios a proteína recombinante LipL32.

Técnicas que proporcionem um diagnóstico específico da leptospirose de maneira rápida, acessível e de fácil interpretação é um anseio tanto da saúde humana quanto da saúde animal. Ante isso, a utilização do antígeno recombinante de *Leptospira* (LipL32) para uso futuro na técnica de aglutinação em látex se apresenta como uma alternativa para suprir esses anseios, tendo em vista que quanto antes a doença for diagnosticada, melhores são as chances de o paciente receber o tratamento correto sem as complicações clínicas que levam a morte ou que exijam internações e gastos com medicações que podem agravar o problema.

A expressão da proteína deste trabalho será comprovada posteriormente através do Western blotting, para depois ser purificada por meio de cromatografia de afinidade. Após a purificação da proteína recombinante, a mesma será ligada covalentemente a pérolas de poliestireno para posterior padronização da Técnica de aglutinação em Látex (LAT) para o diagnóstico indireto da Leptospirose. Adicionalmente, pretende-se sensibilizar pérolas de poliestireno com anticorpos anti-LipL32 para aplicação da LAT no diagnóstico direto da leptospirose.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. *Leptospira* and Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 387. p. 293. 2014.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 27 jan. 2010.
- AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, p. 28, 23 nov. 2006.
- AMUTHA, R. et al. Cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL32 of *Leptospira interrogans* serovar Sejroe. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 5, p. 513–519, jul. 2007.
- BALASSIANO, I. T.; VITAL-BRAZIL, J. M.; PEREIRA, M. M. Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: a new tool for early diagnosis and epidemiologic surveillance. 2012.
- BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926–6932, dez. 2002.
- BEZERRA, L. F. DE M. et al. Serological evidence of leptospirosis in patients with a clinical suspicion of dengue in the State of Ceará, Brazil. **Biomédica**, v. 35, n. 4, p. 557–62, 1 dez. 2015.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, dez. 2003.
- BLANCO, R. M.; ROMERO, E. C. Evaluation of nested polymerase chain reaction for the early detection of *Leptospira* spp. DNA in serum samples from patients with leptospirosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 343–346, abr. 2014.
- BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 166–171, ago. 1996.
- BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 89–94, 10 ago. 2005.
- BOURHY, P. et al. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2154–2160, jun. 2011.
- BOURHY, P. et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 12, p. 4061–4067, 1 dez. 2014.

BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4062–4069, jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Investigação de surto de leptospirose em Várzea Grande - CE, 2008. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.8, n.20, 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Leptospirose: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose>>.

BRASIL. Resolution GM/MS # 1,271 of 06 June 2014. Defines the National List of Compulsory Notification of illnesses, aggravations and health events in the health services of both public and private sectors, throughout the national territory, in accordance with Annex, and takes other arrangements. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2014. Jun 9.

BROD, C. S. et al. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 294–300, ago. 2005.

CANAL, E. et al. Detection of human leptospirosis as a cause of acute fever by capture ELISA using a *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (M20) derived antigen. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 438, 20 set. 2013.

CAO, Y. et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7379–7386, 6 out. 2011.

CASELANI, K. et al. Estudo soroepidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 3, p. 582–587, 2012.

CASTRO, J. R. DE et al. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 217–222, abr. 2011.

CHARON, N. W.; GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 47–73, 2002.

CULLEN, P. A. et al. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2311–2318, maio 2002.

CULLEN, P. A. et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2414–2421, maio 2003.

CULLEN, P. A. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4853–4863, ago. 2005.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 291–318, jun. 2004.

CUNHA, C. E. P. DA. Caracterização fenotípica e sequenciamento do genoma de *Leptospira kirschneri* isolada de caso clínico humano. 24 out. 2014.

DAMASCO, P. V. et al. Atypical lymphocytosis in leptospirosis: a cohort of hospitalized cases between 1996 and 2009 in State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 611–615, out. 2011.

DELIBERALLI, I. Desenvolvimento de vacina recombinante contra a leptospirose: produção e avaliação do potencial imunoprotetor de quatro lipoproteínas. 18 fev. 2014.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–1224, nov. 2011.

DENEKE, Y. et al. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 4, p. 141–146, ago. 2014.

DEY, S. et al. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 1–2, p. 99–106, 5 out. 2004.

DIAS, J. P. et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 499–504, out. 2007.

DUPONT, H. et al. Leptospirosis: Prognostic Factors Associated with Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 720–724, 1 set. 1997.

DUTRA, F. R. L. S. et al. A INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE DA PRECIPITAÇÃO NO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LEPTOSPIROSE EM MINAS GERAIS, NO PERÍODO DE 1998 - 2012. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 11, p. 106–126, 27 jul. 2015.

ENRIETTI, M. A. Contribuição ao Conhecimento da Incidência de Leptospiras em Murídeos, Caninos e Suínos no Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. jubilee, p. 311–342, dez. 2001.

FAINE, S. (ED.). **Leptospira and leptospirosis**. 2nd ed ed. Melbourne: MediSci, 1999.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended Descriptions of the Genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 461–463, 1982.

FEIGIN, R. D. et al. Human leptospirosis from immunized dogs. **Annals of Internal Medicine**, v. 79, n. 6, p. 777–785, dez. 1973.

FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. 2001.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 408–419, maio 2011.

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

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS microbiology letters**, v. 244, n. 2, p. 305–313, 15 mar. 2005.

GEISEN, V. et al. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **The Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 324–328, jun. 2007.

GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 538–545, out. 2005.

GOLDSTEIN, S. F.; CHARON, N. W. Motility of the spirochete *Leptospira*. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 9, n. 2, p. 101–110, 1988.

GRASSMANN, A. A. **Vacina Recombinante contra Leptospirose: construção, expressão e caracterização de rLTBLipL32**. Monografia. Universidade Federal de Pelotas. 2008.

GRASSMANN, A. A. Proteção contra leptospirose induzida por LipL32 coadministrada ou fusionada à LTB. 28 fev. 2011.

GRASSMANN, A. A. et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 19, n. 5, p. 740–745, maio 2012.

GREENE, C. E.; SCHULTZ, R. D. *Immunoprophylaxis*. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Elsevier, v., 2006. p. 1069- 1119

GSELL, O. The history of leptospirosis: 100 years. **Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v. 257, n. 4, p. 473–478, set. 1984.

GUERRA, M. A. Leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 4, p. 472–478, 430, 15 fev. 2009.

GUERREIRO, H. et al. *Leptospiral* proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4958–4968, ago. 2001.

HAAKE, D. A. et al. The *Leptospiral* major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–2285, abr. 2000.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805–814, ago. 2010.

HAMOND, C. et al. PCR detection of *Leptospiral* carriers among seronegative horses. **Veterinary Record**, v. 171, n. 4, p. 105–106, 28 jul. 2012.

HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 5 jun. 1983.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 54–60, fev. 1998.

HAUK, P. et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 4, p. 1341–1347, 12 ago. 2005.

HAUK, P. et al. In LipL32, the major *Leptospiral* lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2642–2650, jun. 2008.

HIGINO, S. S. S. et al. Prevalência de leptospirose em caprinos leiteiros do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 199–203, mar. 2012.

HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 11, p. 456–463, nov. 1994.

HOKE, D. E. et al. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2063–2069, maio 2008.

HUMPHRYES, P. C. et al. Vaccination with *Leptospiral* outer membrane lipoprotein LipL32 reduces kidney invasion of *Leptospira interrogans* serovar canicola in hamsters. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 21, n. 4, p. 546–551, abr. 2014.

HÜTTNER, M. D.; PEREIRA, H. C. P.; TANAKA, R. M. Pneumonia por leptospirose. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 4, p. 229–232, jul. 2002.

INADA, R. et al. THE ETIOLOGY, MODE OF INFECTION, AND SPECIFIC THERAPY OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHÆTOSIS ICTEROHÆMORRHAGICA). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 23, n. 3, p. 377–402, 1 mar. 1916.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, out. 2009.

LAFETA, B. N. **Produção e caracterização da proteína recombinante LipL32 de *Leptospira* spp.** Tese de Doutorado. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SMOC-9HCPXE>>. Acesso em: 26 jul. 2019.

LAMBERT, A. et al. FlaA Proteins in *Leptospira interrogans* Are Essential for Motility and Virulence but Are Not Required for Formation of the Flagellum Sheath. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2019–2025, jun. 2012.

LEON-VIZCAINO, L.; HERMOSO DE MENDOZA, M.; GARRIDO, F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 149–153, 1987.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, abr. 2001.

LEVETT, P. N. et al. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 671–673, 2006.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. *Leptospira* Species (Leptospirosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). Mandell, Douglas, and Bennett's **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 7th ed. Orlando, FL: Saunders Elsevier; 2009.

LIAO, S. et al. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 253, 9 dez. 2009.

LIMMATHUROTSAKUL, D. 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: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 3, p. 322–331, ago. 2012.

LUCAS, D. S. D. et al. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3413–3418, 18 abr. 2011.

LUO, D. et al. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 243–255, 10 dez. 2009.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–538, set. 1996.

MALMSTRÖM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762–765, 6 ago. 2009.

MARINHO, M. LEPTOSPIROSE: FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, FISIOPATOLÓGICOS E IMUNOPATOGÊNICOS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428–434, 2008.

MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. **Veterinary Record**, v. 167, n. 16, p. 629–630, 16 out. 2010.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929–945, ago. 2003.

MATSUNAGA, J. et al. Osmolarity, a Key Environmental Signal Controlling Expression of *Leptospiral* Proteins LigA and LigB and the Extracellular Release of LigA. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 70–78, jan. 2005.

- MCDOWEL, A. Do icterus epidemicus. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 7, n., p. 335-345, 1917.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, out. 2005.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Evaluation of Four Whole-Cell *Leptospira*-Based Serological Tests for Diagnosis of Urban Leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1245–1248, 1 set. 2007.
- MIRAGLIA, F. et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 195–199, nov. 2013.
- MIRAGLIA, F. et al. Characterization of *Leptospira interrogans* serovar Pomona isolated from swine in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 10, p. 1054–1061, 29 out. 2015.
- MONTEIRO, G. R. G. **Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra leptospirose**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 27 jun. 2003.
- MOREY, R. E. et al. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3510–3516, out. 2006.
- MOURA, A. S.; ROCHA, R. L. Epidemias e endemias B: dengue, leishmaniose tegumentar e visceral, leptospirose, influenza e febre maculosa. 2013.
- MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 791–797, jun. 2008.
- MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 311–314, fev. 2009.
- MURRAY, G. L. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 701–709, nov. 2010.
- NALAM, K. et al. Genetic Affinities within a Large Global Collection of Pathogenic *Leptospira*: Implications for Strain Identification and Molecular Epidemiology. **PLOS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12637, 27 ago. 2010.
- NALLY, J. E. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 766–773, fev. 2007.
- NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164–2172, 1 abr. 2004.
- NOGUCHI, H. The Survival of *Leptospira* (spirochæta) Icterohæmorrhagiæ in Nature; Observations Concerning Microchemical Reactions and Intermediary Hosts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 27, n. 5, p. 609–625, 1 maio 1918.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6^a ed. World Organisation for Animal Health, Paris, 2012.

OKUDA, M. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Canine *Leptospira* Antibodies Using Recombinant OmpL1 Protein. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 67, p. 249–54, 1 abr. 2005.

OLIVEIRA, F. C. S. et al. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398–402, maio 2010.

OLIVEIRA, T. R. et al. Evaluation of *Leptospiral* Recombinant Antigens MPL17 and MPL21 for Serological Diagnosis of Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1715–1722, 1 nov. 2008.

PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924–5930, nov. 2002.

PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Expression of *Leptospiral* immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. Pt 10, p. 975–984, out. 2004.

PAZ, G. S. DA et al. Seroprevalence for brucellosis and leptospirosis in dogs from Belém and Castanhal, State of Pará, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 265–270, set. 2015.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, jan. 2013.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT GIRONS, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 189–199, abr. 2001.

RADOSTITS, OTTO M.; GAY, CLIVE C.; BLOOD, DOUGLAS C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RICALDI, J. N.; VINETZ, J. M. Leptospirosis in the Tropics and in Travelers. **Current infectious disease reports**, v. 8, n. 1, p. 51–58, jan. 2006.

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for *Leptospiral* virulence. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 7, p. e97, jul. 2007.

RODRIGUES, A. M. A. **Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 25 jun. 2008.

RUIBAL, M. D. P. V. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308.[Dissertação]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, Ed., 2001.

SARMENTO, A. M. C. et al. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601–606, jul. 2012.

SEIXAS, F. K. et al. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 472–479, abr. 2007a.

SEIXAS, F. K. et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 88–95, 21 dez. 2007b.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN, **Ministério da Saúde**. Leptospirose – Notificações Registradas: banco de dados. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leptobr.def>>.

SOUZA, M. F. S.; SOUZA, M. A.; SOARES, P. M.; LIMA, A. M. C.; CARDOSO, R.; GOULART, L. R. Seleção de peptídeos específicos de *Leptospira interrogans* sorovar hardjo. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal**, v. 6, 2014. Número especial.

STODDARD, R. A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247–255, jul. 2009.

TAYLOR, M. J. et al. Magnetic immuno capture PCR assay (MIPA): Detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 135–145, 1 maio 1997.

TONIN, A. A. et al. LEPTOSPIROSE BOVINA: AUMENTO NA DETECÇÃO SOROLÓGICA DA *Leptospira interrogans* SOROVAR butembo NO REBANHO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 294–297, 20 dez. 2010.

TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35–40, mar. 2004.

VALVERDE, M. DE LOS A. et al. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 529–533, set. 2008.

VARNI, V. et al. Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 22, p. 216–222, mar. 2014.

VASCONCELLOS, F. A. ELISA de captura de antígeno para o diagnóstico de leptospirose. 27 abr. 2007.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 557–569, nov. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human Leptospirosis**: guidance for diagnosis, surveillance and control. [Geneva]: WHO, p.109, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of the first meeting of leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva: p.1-34, 2010.

YE, C. et al. Serodiagnosis of Equine Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Four Recombinant Protein Markers. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 4, p. 478–483, 1 abr. 2014.

ZARDO, R. **Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, *Leptospira* spp. e Neospora caninum em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS**. Disponível em:
<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=4851040>. Acesso em: 26 jul. 2019.

APÊNDICE A – SOLUÇÕES UTILIZADAS

- **Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X**

Reagente	Quantidade
Tris Base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	100 mL
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 1 L

- **Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X**

Foram diluídos 20 mL da solução TAE 50x em 980 mL de H₂O Milli-Q. Homogeneizou-se a solução.

- **EDTA 0,5 M pH 8,0 (Disodium ethylenediaminetetra acetate 2H₂O)**

- PM = 372, 24.
- Pesar 18,62 g de EDTA e adicionar 80 mL de H₂O deionizada; colocar para homogeneizar no agitador magnético.
- Ajustar o pH com pérolas de NaOH, que deve ser adicionado aos poucos até chegar no pH 8,0.
- Completar o volume com H₂O deionizada para 100 mL.

- **Gel de agarose a 1%**

- Pesar 1 g de agarose.
- Adicionar 100 mL de TAE 1x em um recipiente.
- Colocar a mistura de agarose e TAE 1x no micro-ondas por 1 minuto, ou até obter uma solução cristalina. Deixar esfriar até pelo menos 60°C antes de aplicar na placa de eletroforese.

- **Meio LB (Luria-Bertani)**

Reagente	Volume final
	1 L
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g

- Adicionar 90% do volume final de água destilada e dissolver os reagentes com agitação.
- Ajustar o pH para 7,0 com 5 N de NaOH, completar o volume final e autoclavar por 20 minutos a 127 °C.

- **Meio LB + agar (para placa de Petri)**

Reagente	Volume final
	1 L
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g

- Adicionar 90% do volume final de água destilada e dissolver os reagentes com agitação.
- Ajustar o pH para 7,0 com 5 N de NaOH, completar o volume final e autoclavar por 20 minutos a 127 °C.

- **Solução de CaCl₂ para bactérias competentes contendo 15% de glicerol**

Reagente	Volume final
	100 mL
1 M CaCl ₂	5 mL
1 M Tris-HCl pH 8,0 estéril	1,0 mL
Glicerol autoclavado	15 mL
H ₂ O Milli-Q	79 mL

- **CaCl₂ 1 M**

- PM = 111.
- Dissolver 5,5 g CaCl₂ em 50 mL de H₂O Milli-Q

- **Tris-HCl 1 M, pH 7,5**

- PM = 121,1.
- Pesar 6,05 g de Tris e dissolver em 40 mL de água Milli-Q.
- Ajustar o pH com HCl e depois completar o volume para 50 mL.

- **Tampão Tris-HCl para eletroforese SDS-PAGE**

Resolução: 1,5 M, pH 8,8

- Pesar 18,17 g de Tris base e dissolver em 80 mL de água destilada. Acertar o pH para 8,8 com HCl 2,5 N. Completar o volume para 100 mL com água destilada.

Empilhamento: 1 M, pH 6,8

- Pesar 12,12 g de Tris base e dissolver em 80 mL de água destilada. Acertar o pH para 6,8 com HCl 2,5 N. Completar o volume para 100 mL com água destilada.

- **Tampão de corrida para eletroforese de proteínas**

Reagente	[1x] 1 L
Tris Base	3 g
Glicina (ácido amino acético)	14,4 g
SDS 10 %	10 mL

- **SDS 10% (p/v)**

Componente	Quantidade
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	10 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 100 mL

- **Tampão de amostra para proteína [6x]**

Reagente	[6x]	Concentração final [1x]
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	3 mL	50 mM
SDS 10%	0,6 mL	1%
Glicerol	6 mL	10%
Bromophenol blue	0,01 mg	0,001 mg/mL
DTT	0,93 g	25 mM
b-mercaptoetanol	0,6 mL	1%

- **Solução de coomassie blue**

Reagente	Quantidade
Coomassie blue R250	0,25 g
Metanol	45 mL
Água destilada	45 mL
Ácido acético	10 mL

- **Solução descorante para gel de proteína**

Reagente	Quantidade
Metanol	45 mL
Água destilada	45 mL
Ácido acético	10 mL

- **SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis) com gel de separação a 12% e o de empilhamento a 5%.**

Reagente	Resolução 12%	Empilhamento 5%
H ₂ O	4,9 mL	4,1 mL
Acrilamida 30%	6 mL	1 mL
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	3,8 mL	0,75 mL
SDS 10%	0,15 mL	0,06 mL
Persulfato de amônia 10%	0,15 mL	0,06 mL
TEMED	0,006 mL	0,006 mL

- **Acrilamida 30%**

Reagente	Quantidade
Acrilamida	29 g
N,N' metilenebisacrilamida	1 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 100 mL

- **Persulfato de amônia 10%**

Reagente	Quantidade
Persulfato de amônia	1 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 10 mL