

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Faculdade de Ciências Biológicas



**Monografia de Conclusão de Curso**

**Avaliação do potencial de um anticorpo monoclonal produzido contra a proteína LigB de leptospiras patogênicas, para Imunodiagnóstico de leptospirose.**

**Leonardo Garcia Monte**

**Pelotas, 27 de abril de 2007.**

**Leonardo Garcia Monte**

**Avaliação do potencial de um anticorpo monoclonal produzido contra a proteína LigB de leptospiras patogênicas, para Imunodiagnóstico de leptospirose.**

Monografia apresentada ao Instituto de Biologia, Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Graduado em Ciências Biológicas. (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: José Antonio Guimarães Aleixo

Pelotas, 27 de abril de 2007.

À minha família: Fernando Jorge da Silva Monte,  
Eneleda Garcia Monte e Fernanda Garcia Monte.

À minha namorada Isabel Fagundes Cabral, por todo o amor e força.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas por todo subsídio e oportunidade de aprendizado.

Ao meu orientador professor José Antônio Guimarães Aleixo pelos ensinamentos e disciplina, confiando em minha capacidade nos momentos em que eu mais precisava.

Aos colegas do centro de biotecnologia e de laboratório Mariana, Clarice, Everton, Flávia, Ângela, Cláudia e Núbia.

A um grande amigo de faculdade, Vinícius Farias Campos que me ajudou a crescer como pessoa e profissional dividindo comigo as vitórias e derrotas nessa etapa da vida.

A minha namorada, Isabel Fagundes Cabral pelo amor, compreensão, carinho e dedicação desde o ingresso até conclusão do curso.

E em especial a minha família que acima de tudo acreditou em meu potencial e capacidade como ser humano de conseguir aquilo que se deseja.

Muito obrigado!

## Índice

Índice -----	v
Lista de Figuras -----	vii
Sumário -----	viii
Summary -----	ix
1. Introdução -----	1
1.1 A leptospirose -----	1
1.2 A Leptospira -----	3
1.3 Membrana externa das leptospiras -----	5
1.4 Anticorpos monoclonais -----	8
1.5 O Diagnóstico -----	9
2. Objetivos -----	11
2.1 Geral -----	11
2.2 Específico -----	11
3. Materiais e Métodos -----	12
3.1 Produção de anticorpos monoclonais -----	12
3.1.1 Imunização -----	12
3.1.2 Pré-fusão -----	12
3.1.3 Fusão celular -----	13
3.1.4 Seleção dos hibridomas -----	13
3.1.5 Cultivo dos Hibridomas -----	14
3.1.6 Produção de Ascite -----	14
3.2 ELISA Indireto com a Leptospira nativa e a LigB -----	14
3.3 Western Blot -----	15
3.4 Imunofluorescência indireta com leptospiras vivas fixadas -----	15
4. Resultados -----	17
4.1 Elisa indireto com a Leptospira nativa e a LigB -----	17
4.2 Imunofluorescência indireta com leptospiras vivas fixadas -----	17
4.3 Western Blot -----	18

5. Discussão	19
6. Conclusões	21
7. Referências Bibliográficas	22

## Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Rattus norvegicus</i> , espécie de roedor sinantrópico encontrada nos esgotos urbanos .....	2
Figura 2 - Exemplo de habitações na periferia das grandes cidades brasileiras, sujeitas ao alagamento e evidenciando péssimas condições de saneamento básico.	3
Figura 3 - Microfotografia da <i>L. interrogans</i> .....	4
Figura 4 - Modelo da arquitetura da membrana de leptospiros .....	6
Figura 5 – Fragmentos das proteínas Lig para o uso em experimentos de imunoproteção e diagnóstico .....	8
Figura 6 – Reações do Mab anti-LigB com a <i>L. interrogans</i> L1 130 Cepa fiocruz.....	17
Figura 7 – Controle negativo (Mab anti-Salmonella).....	17
Figura 8 – Reação do Mab anti-LigB com a proteína.....	18

## Sumário

Monte, Leonardo Garcia. Graduado. Universidade Federal de Pelotas, 27 de março de 2007. **Avaliação do potencial de um anticorpo monoclonal produzido contra a proteína LigB de leptospiros patogênicas, para Imunodiagnóstico de leptospirose.** Orientador: José Antonio Guimarães Aleixo.

A leptospirose é uma doença infecto-contagiosa causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*. Ela possui um quadro clínico que muitas vezes é confundido com outras doenças, como malária, brucelose e gripe comum. Além dessa semelhança a heterogeneidade antigênica e a resposta imune do hospedeiro contribuem para seu difícil diagnóstico. O teste de soroaglutinação microscópica é considerado internacionalmente, referência para diagnóstico da leptospirose. Para a realização do mesmo é necessária uma bateria de sorovares de *Leptospira* e as amostras avaliadas devem apresentar soroconversão (aumento de anticorpos séricos) tornando-o o ensaio trabalhoso. Recentemente, proteínas de membrana externa de leptospiros patogênicas vêm sendo descritas como moléculas indutoras da resposta imune no indivíduo hospedeiro, exercendo possível papel de adesina. A LigB alvo de nosso estudo é uma dessas proteínas, pertence a superfamília das Ligs (*Leptospiral immunoglobulin-like*) e demonstra grande potencial para a elaboração de testes de diagnóstico. Um anticorpo monoclonal anti-LigB foi produzido e caracterizado por ELISA indireto, Imunofluorescência e Western Blot. No ELISA indireto e na Imunofluorescência o anticorpo foi testado com cinco espécies de Leptospiros, todas induzidas com cloreto de sódio, *L. interrogans* L 1-130 cepa fiocruz, *L. borgpetersenii*, *L. kirschineri*, *L. noguchii* e *L. weilii* e com LigB. No Western Blot foi utilizada a Cepa Fiocruz e a LigB. Os resultados obtidos tiveram as seguintes reações: o ELISA indireto demonstrou baixas reações com a proteína e com a *Leptospira* nativa, o Western Blotting reconheceu somente a LigB e a imunofluorescência detectou a *L. interrogans* L1 130 Cepa Fiocruz entre todas as cinco espécies testadas.

**Palavras-chave:** Leptospirose, anticorpo monoclonal e LigB



## Summary

Monte, Leonardo Garcia. Graduado. Universidade Federal de Pelotas, 27 de março de 2007. **Evaluation of the potential of an antibody monoclonal produced against the protein LigB of leptospiras pathogenic, for leptospirosis Immunodiagnosis.** Orientador: José Antonio Guimarães Aleixo.

The leptospirosis is an infect-contagious disease caused by spirochetes belonging to the genus *Leptospira*. She possesses a clinical picture that a lot of times are confused with other diseases, as malaria, brucelose and common influenza. Besides that similarity the heterogeneity antigenic and the immune answer of the host contribute to his difficult diagnosis. The microscopic agglutination test is considered internationally, reference for diagnosis of the leptospirosis. For the accomplishment of the same it is necessary a battery of sorovares of *Leptospira* and the appraised samples should present increase of antibodies turning it the difficult rehearsal. Recently, membrane proteins express of leptospiras pathogenics come been described as inductor molecules of the immune answer in the individual host, exercising possible adhesive paper. The LigB, target of our study is one of those proteins, belong family of Ligs (*Leptospiral immunoglobulin-like*) and it demonstrates potential great for the elaboration of diagnosis tests. One antibody monoclonal anti-LigB was produced and characterized by indirect ELISA, immunofluorescence and Western Blot. In indirect ELISA and in immunofluorescence the antibody was tested with five species of *Leptospiras*, all induced with chloride of sodium, *L. interrogans* L 1-130 strain Fiocruz, *L. borgpetersenii*, *L. kirschineri*, *L. noguchii* and *L. weilii* and with LigB. In the Western Blot it was used the strain Fiocruz and LigB. The obtained results had the following reactions: indirect ELISA demonstrated reactions low with the protein and with native *Leptospira*, the Western Blotting only recognized LigB and the immunofluorescence detected *L. interrogans* L1 130 strain Fiocruz among all the five tested species.

**Keywords:** Leptospirosis, monoclonal antibody e LigB.

# 1. Introdução

## 1.1 A leptospirose

A leptospirose é uma doença zoonótica de importância global, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, o qual atualmente compreende 17 espécies em mais de 260 sorovares (Bharti et al 2003; Morey et al, 2006). Ela é uma enfermidade infecto-contagiosa de distribuição mundial, sendo os reservatórios desta bactéria, os animais domésticos e silvestres que albergam o agente em seus rins e fluídos corporais (WHO, 1999, WHO, 2003).

O homem é um hospedeiro acidental que se infecta através do contato com água, urina e tecidos de animais contaminados (Faine et al, 1999, Vinetz 2001). Nos grandes centros urbanos do Brasil, a proximidade dos animais contaminados com fontes de água como córregos, canais e valetas, além de viver em aterros sanitários e próximos das residências, oferece um alto risco de contaminação aos seres humanos (Brasil, 1995).

O rato de esgoto ou também chamado de ratazana do esgoto, espécie *Rattus norvegicus* (Fig.1), é o principal carreador das leptospiras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, a *Leptospira* responsável pelo maior número de casos de leptospirose humana no Brasil e na América Latina (Ko et al., 1999). O habitat estabelecido por esse animal próximo à civilização, facilita o seu acesso aos alimentos, ao abrigo e à água, vivendo em sinantropia e causando danos à saúde pública e à sanidade animal (Brasil 1993).

Nos períodos de intensa precipitação pluviométrica, com conseqüentes enchentes (Fig. 2), ocorre um aumento do risco de infecção em humanos e animais, devido a maior exposição das mucosas e da pele com à água contaminada, já que esta realiza o transporte e a disseminação do organismo patogênico (WHO, 2003).

As áreas do planeta mais afetadas pela doença são as regiões de clima tropical e subtropical, que proporcionam temperaturas mais elevadas e ideais para o desenvolvimento e manutenção da bactéria no meio-ambiente (Vinetz 2001, Bharti et al 2003). Como o que ocorre com outras bactérias patogênicas, cujo ciclo de vida envolve vias indiretas de transmissão, a temperatura é provavelmente um sinal do

ambiente para as leptospiros mudarem de vida livre para um estágio invasivo (Lo et al., 2006).



Figura 1 - *Rattus norvegicus*, espécie de roedor sinantrópico encontrada nos esgotos urbanos

Fonte: [www.protectioninsumos.com.br/.../ratazana.jpg](http://www.protectioninsumos.com.br/.../ratazana.jpg)

No Brasil a população de baixa renda está continuamente exposta aos fatores de risco, uma vez que geralmente vive em locais propícios à doença (Ko et al., 1999). O Sul do Brasil é a segunda região mais afetada pela leptospirose, sendo o Rio Grande do Sul o terceiro estado no ranking nacional com o maior número de casos confirmados, perdendo apenas para Rio de Janeiro em 1º e Pernambuco em 2º, em pesquisa realizada entre os anos de 1980 e 2005 ([www.saude.gov](http://www.saude.gov)). Além disso, a cidade de Pelotas possui um número de casos superior à média do Estado do Rio Grande do Sul, ou seja, acima de 10-50 casos por 100 mil habitantes (Barcellos et al, 2003).

A sintomatologia da leptospirose é variável com distintos graus de severidade, iniciando com febre, vômitos, dores de cabeça e musculares (WHO, 2003). A persistência de leptospiros nos rins pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais a extensas lesões, caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal (Faine et al., 1999).

A infecção pode conduzir a hemorragia pulmonar, falha renal e hepática, porém algumas vezes, conduz a falhas em múltiplos órgãos e até mesmo a morte (Levett, 2001; McBride et al 2005). Saneamento básico e medidas preventivas de controle não são realizados de forma eficiente, além disso, o quadro clínico pode ser confundido com outras enfermidades como Influenza, Dengue, entre outras, dificultando a confirmação da doença (Ko et al, 1999).



**Figura 2** - Exemplo de habitações na periferia das grandes cidades brasileiras, sujeitas ao alagamento e evidenciando péssimas condições de saneamento básico

Fonte: [www.tvcultura.com.br](http://www.tvcultura.com.br)

O período de incubação da bactéria no indivíduo hospedeiro é variável, tendo em média 14 dias. A leptospirose é considerada uma doença bifásica quanto à evolução e desenvolvimento no paciente. A primeira fase é chamada septicêmica ou aguda que é caracterizada pela presença das espiroquetas na circulação sanguínea e nos tecidos e a segunda fase é chamada de imune onde é estabelecida uma resposta imunológica mediada pela produção de anticorpos circulantes específicos contra o antígeno (Levett 2001).

As taxas de morbidade e mortalidade aumentam pela falta de medidas preventivas como a vacinação de animais e humanos, políticas de informação e orientação à população, tratamento médico adequado e principalmente técnicas eficazes para identificação e confirmação da enfermidade, especialmente na fase inicial da doença (Bolin et al 1999, Levett 2001, Vinetz 2001).

Mundialmente, a leptospirose atinge de forma mais intensa, áreas que possuem precárias condições de saneamento básico, sendo os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento os mais afetados. Considerada uma doença zoonótica emergente e a que está difundida pelo mundo, a leptospirose possui grande importância social e econômica (Levett 1999, WHO, 1999, Meites et al 2004).

## **1.2 A *Leptospira***

A *Leptospira* é uma bactéria espiralada, aeróbica, helicoidal (Figura 3) altamente patogênica (Okuda, et al., 2004), que não resiste à dissecação e que

necessita de calor e umidade para seu crescimento (Faine et al 1999). A colonização causada pela bactéria ocorre principalmente no sistema urinário do hospedeiro, e quando eliminada junto à urina da continuidade ao ciclo infeccioso.

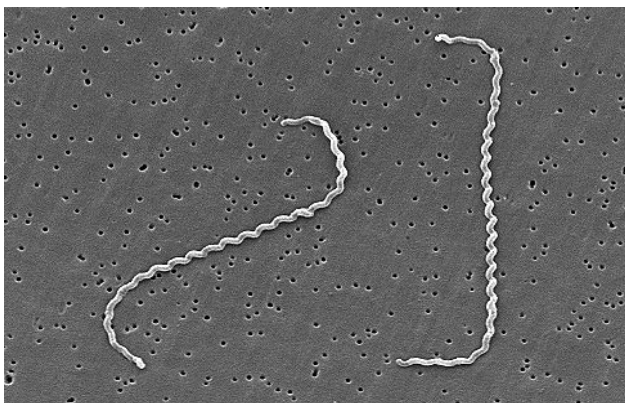


Figura 3 - Microfotografia da *L. interrogans*

Fonte: [www.pathmicro.med.sc.edu/leptospira.jpg](http://www.pathmicro.med.sc.edu/leptospira.jpg)

Tradicionalmente a classificação taxonômica da *Leptospira* é realizada através de testes sorológicos, sendo a unidade básica o sorovar (Dikken and Kmety 1978, Terpstra 1992). Porém, mais recentemente as leptospiras passaram a ser classificadas também através de métodos genéticos, e a partir dessa nova classificação foi possível identificar espécies genômicas diferentes, mudando a convenção baseada somente na sorologia, e que classificava as leptospiras em patogênicas (*L. interrogans*) e não patogênicas (*L. biflexa*), distribuindo os sorovares em grupos sorológicos, denominados de sorogrupos (Yasuda et al, 1987, Faine et al 1999).

Atualmente, o gênero *Leptospira* consiste de um grupo heterogêneo de espécies, no qual encontram-se exemplares patogênicos, intermediários e saprófitas, todos pertencentes à ordem Spirochaetales (Levett et al., 2006). As espécies descritas até o momento incluem 4 genomoespécies que não foram nomeadas e 13 que foram nomeadas, homenageando pesquisadores que contribuíram para o avanço no estudo da leptospirose.

As 8 espécies classificadas como patogênicas são: - *Leptospira alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschineri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. broomii*. As duas espécies que são consideradas intermediárias são: - *L. fainei* e *L. inadai*, e as 3 classificadas como saprófitas são: - *L. meyeri*, *L. wolbachii* e *L. biflexa* (Yasuda et al 1987, Ramadass et al 1992, Perolat et al 1998, Brenner et al 1999, Levett et al 2006). No Brasil, das 8 espécies patogênicas existentes, somente 5

foram isoladas no seu território, as espécies *L. interrogans*, *L. kirschineri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* e *L. noguchii* (Faine et al 1999). *L. interrogans* é considerada a espécie mais disseminada no ecossistema brasileiro, onde os sorovares Copenhageni e Canicola representam mais de 90% dos casos de leptospirose no país (Ko et al 1999, Pereira et al 2000). Por outro lado, as espécies *L. borgpetersenii* e *L. santarosai* estão relacionadas com a enfermidade em animais de produção, silvestres e em roedores sinantrópicos (Faine et al 1999, Vasconcellos et al 2001). Interessantemente, a espécie *L. noguchii* foi isolada apenas no estado do Rio Grande do Sul, sendo evidenciada causando a enfermidade em humanos e animais (Silva et al 2007).

A diversidade antigênica e a genética leptospiral refletem a ampla gama de espécies mamíferas que foi encontrada, como hospedeiros de manutenção do agente (Babudieri 1958). A habilidade das leptospiros patogênicas de penetrar, disseminar e permanecer nos tecidos do hospedeiro mamífero parece residir na capacidade desse organismo em aderir nas proteínas da matriz celular e no fibrinogênio das células eucarióticas, descrita como propriedade importante das leptospiros virulentas, embora ainda pouco se saiba sobre a patogênese da enfermidade (Tsuchimoto et al., 1984; Ballard et al., 1986; Thomas and Higbie 1990, Choy et al 2007).

### **1.3 Membrana externa das leptospiros**

A Identificação de fatores de virulência das leptospiros, como proteínas que induzam uma resposta imune no hospedeiro durante o processo infeccioso, são importantes ferramentas usadas no desenvolvimento de métodos para o diagnóstico da leptospirose (Haake et al 2000, Guerreiro et al 2001, Matsunaga et al 2003).

Com a necessidade da implementação de técnicas modernas de diagnóstico e de medidas preventivas mais eficazes para o controle desta importante enfermidade, como o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico, países como China e Brasil investiram no seqüenciamento do genoma da *Leptospira*. Duas cepas pertencentes à espécie *L. interrogans* e ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, cepas Lai 56601 (Ren et al 2003) e Fiocruz L1-130 (Nascimento et al 2004), consideradas

como agentes endêmicos e responsáveis por muitos dos casos graves de leptospirose humana em seus países, tiveram os seus genomas seqüenciados.

Mais recentemente, o genoma de duas cepas do sorovar Hardjo pertencentes à espécie *L. borgpetersenii*, importante causa da leptospirose humana e animal no mundo, também tiveram o seu genoma seqüenciado e comparado com os outros genomas disponíveis, por um consórcio entre os EUA e a Austrália (Bulach et al 2006). O seqüenciamento do genoma da cepa Fiocruz L1-130 foi realizado em uma colaboração que envolveu a Fundação Oswaldo Cruz (RJ e BA), Instituto Butantan e a Universidade Federal de Pelotas, entre outras instituições nacionais e internacionais.

A OM das leptospiras contém muitas lipoproteínas já caracterizadas como importantes alvos para o desenvolvimento de vacinas, como LipL32/HAP-1 (Haake et al 2000; Branger et al 2001), LipL21 (Cullen et al 2003), LipL41 (Shang et al 1996) e a porina OmpL1 (Haake et al 1993, Shang et al 1995). Além destes, o seqüenciamento do genoma de *L. interrogans* Fiocruz L1-130, revelou genes que codificam para outros tipos de proteínas de membrana externa (OMPs), incluindo as OMPs TonB-dependentes que são envolvidas na aquisição de nutrientes e genes envolvidos em três sistemas de efluxo, que consistem de um fator de membrana externa (OMF), proteína de fusão de membrana (MFP) e um transportador da membrana interna (CzcA) que é importante na detoxificação de metais pesados (figura 4)(Nascimento et al 2004, Gamberini et al 2005).

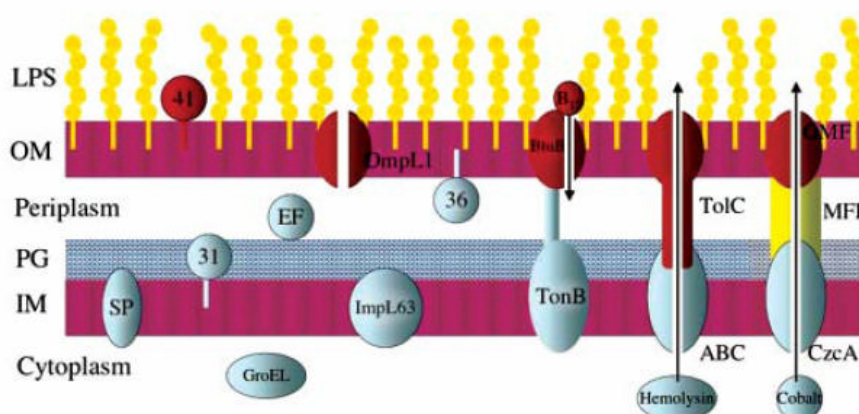


Figura 4 - Modelo da arquitetura da membrana de leptospiras

Fonte: Nascimento et al 2004

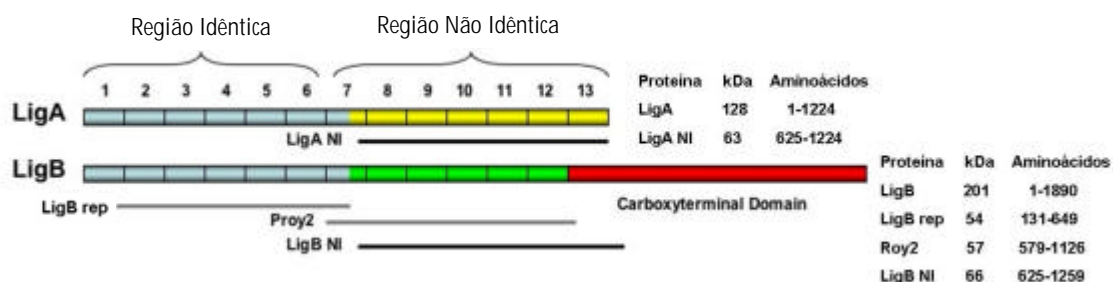
Anteriormente ao seqüenciamento do genoma da cepa Fiocruz L1-130 e das demais, alguns fatores de virulência desta cepa já haviam sido descritos. A resposta imune humoral de humanos em decorrência da infecção por leptospiros revelou proteínas que são expressas durante a infecção (Guerreiro et al 2001). Mediante a construção de bibliotecas de expressão com genes de Fiocruz L1-130 e *Leptospira kirschneri* Grippytyphosa RM52, utilizando-se soros de pacientes humanos em fase convalescente da enfermidade, foram identificados três novos genes que codificavam para as já descritas “*Bacterial immunoglobulin-like proteins* (Big)”. Estes antígenos presentes em outros patógenos, caracterizam-se pela presença de domínios repetitivos de aminoácidos que conferem o nome a família protéica (Matsunaga et al 2003).

Os genes de *Leptospira*, que contém tais domínios, foram denominados de “*Leptospiral immunoglobulin-like* (Lig)” e codificam para as proteínas LigA, LigB e LigC, encontradas somente em leptospiros patogênicos. Estudos de microscopia imunoelétrica confirmaram que as proteínas Lig estão localizadas na superfície da leptospiros (Matsunaga et al 2003).

As três proteínas Lig possuem domínios encontrados nas proteínas Intimina de *E. coli* enterotoxigênica (Frankel et al 1996; Luo et al 2000), Invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg et al 1987; Hamburger et al 1999) e BipA de *Bordetella* sp. (Stockbauer et al 2001). Sobre a conservação dos genes *lig* nas leptospiros, Cerqueira (2006) ao seqüenciar os genes *lig* de cepas virulentas isoladas de humanos e animais, pertencentes a 4 espécies patogênicas (*L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilli* e *L. borgpetersenii*), e comparando com as seqüências disponíveis em bancos de dados para as demais espécies, evidenciou a presença do gene *ligB* em todas as cepas das espécies analisadas, porém o gene *ligA* foi encontrado apenas nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e o gene *ligC* somente em *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. weilli* e em alguns sorovares da espécie *L. noguchii*.

A LigB, alvo de nosso estudo, é uma proteína de membrana externa de leptospiros patogênicos, com aproximadamente 54 KDa que possui domínios repetitivos nos genes de LigA e LigB, localizando-se na região idêntica de cada uma das proteínas (Figura 5). Essas proteínas induzem a uma resposta imunológica do hospedeiro, podendo ser candidatas ao uso em testes diagnósticos e em uma vacina contra a leptospirose (Matsunaga et al 2003, Koizume et al 2003, Palaniappan et al 2006).





**Figura 5** – Fragmentos das proteínas Lig para o uso em experimentos de imunoproteção e diagnóstico

Fonte: Silva É. F., tese de doutorado em Biotecnologia

## 1.4 Anticorpos monoclonais

Em 1975 Kohler & Milstein (Nobel de Medicina em 1984) desenvolveram a técnica dos anticorpos monoclonais (Mabs). Esses anticorpos são altamente específicos e reconhecem um único sítio de ligação do antígeno (epítipo). Diferentemente do que acontece com os anticorpos policlonais que podem reconhecer vários determinantes antigênicos, tornando-os menos específicos.

A técnica de MAb hoje representa um excelente exemplo de biotecnologia, com vantagens de padronização, sensibilidade e confiabilidade em testes de imunodiagnóstico. A habilidade de produzir anticorpos monoclonais contra qualquer patógeno infeccioso ou seu produto é reconhecida como uma das mais significantes realizações da biotecnologia (Berry et al 2005).

A uniformidade dos MAb é uma característica decisiva no desenvolvimento de pesquisas e trabalhos que melhorem a sensibilidade e especificidade dos ensaios (Berry et al 2005). Esses anticorpos fornecem as bases para um largo número de imunoenaios altamente reprodutíveis e específicos para diagnóstico de doenças (Payne et al., 1988; Andreotti et al., 2003).

A produção de anticorpos monoclonais ainda é uma técnica cara e trabalhosa, mas que oferece muitas vantagens, entre elas o fácil manuseio com animais de pequeno porte (camundongos), a possibilidade de estocagem dos hibridomas por um longo período, sem alteração das características estruturais da molécula e a utilização de pequenas doses de antígeno.

## 1.5 O Diagnóstico

O diagnóstico de certeza da leptospirose é baseado nos diagnósticos clínico, epidemiológico e laboratorial (WHO, 2003). A confirmação de um caso de leptospirose culmina com o isolamento do agente através de cultivo em meios de cultura específicos, porém esta técnica não é realizada como rotina em todos os laboratórios, além de ser uma técnica que pode durar mais de 2 meses para a confirmação, o que torna inviável na maioria dos casos (WHO, 2003; Faine et al 1999).

Em relação aos testes sorológicos disponíveis, o teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é considerado como teste padrão de referência para o diagnóstico da leptospirose no Brasil e no mundo (WHO, 2003). Ele é um complexo ensaio que utiliza cepas vivas de *Leptospira* para a triagem dos soros de humanos e animais suspeitos de leptospirose. Estes ensaios são realizados por técnicos especializados e em laboratórios de referência, mas possuem baixa sensibilidade, em especial na fase inicial da doença (McBride et 2005).

A baixa sensibilidade destes testes é devido ao fato de que o sistema imune do indivíduo infectado leva alguns dias para produzir níveis detectáveis de anticorpos contra o agente infectante (Janeway et al., 2001). Além disso, existe a necessidade de amostras de sangue coletadas na fase aguda e na fase convalescente da doença para demonstrar a soroconversão de pelo menos 4 vezes que o título inicial. Em muitos casos, quando uma segunda coleta não é possível, aceita-se como caso de leptospirose os indivíduos que apresentarem um título maior do que 800 em uma coleta única de sangue (WHO, 2003).

O diagnóstico sorológico da leptospirose é complicado pelo alto grau de reações cruzadas entre diferentes sorovares, onde muitas vezes o resultado revela títulos elevados de anticorpos para sorovares que não são os causadores da enfermidade ou surto (Levett 2003). Além dessas reações cruzadas muitos indivíduos infectados são assintomáticos, ou seja, não apresentam nenhum tipo de sintoma (Faine et al 1999).

Devido à complexidade e desvantagens do MAT, a busca por novos testes de diagnósticos estão sendo executadas, como o ELISA (Palaniappan et al 2004, Dey et al 2005, Ooteman et al 2005, Suwimonteerabutr et al 2005) e o PCR (Lucchesi et al 2004, Ooteman et al 2005, Palaniappan et al 2005), o que os torna importantes no

desenvolvimento de futuras técnicas mais eficazes para o diagnóstico de certeza da leptospirose.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra LigB, proteína da membrana externa de leptospiras patogênicas.

### **2.2 Específico**

Avaliar o potencial de diagnóstico da Imunoglobulina produzida através dos seguintes testes de caracterização:

- ? ELISA indireto;
- ? Western Blot;
- ? Imunofluorescência.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1 Produção de anticorpos monoclonais**

#### **3.1.1 Imunização**

Camundongos BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas foram inoculados intraperitonealmente com rLigB nos dias 0, 14, 21; a primeira dose foi aplicada à uma quantidade de 75ug/ml; a segunda e terceira dose com 150 ug/ml. Na primeira inoculação foi utilizado Adjuvante Completo de Freund e nas doses posteriores Adjuvante Incompleto de Freund. Para a confirmação da soroconversão, foi retirado o soro do animal imunizado, por punção do plexo retro-orbital. O título dos anticorpos foi verificado por ELISA indireto utilizando LigB para sensibilização da placa. A titulação mostrou reações até uma diluição de 1:64000. Uma dose de reforço protéico intraperitoneal com adjuvante incompleto e uma intravenosa, apenas com o antígeno, foi aplicada quatro dias antes da fusão celular.

#### **3.1.2 Pré-fusão**

No dia anterior a realização da fusão, células companheiras de um camundongo não imunizado foram preparadas da seguinte forma: o animal foi sacrificado por deslocamento cervical e transferido para um ambiente estéril onde seu baço foi removido. Dentro de uma placa de Petry o órgão foi macerado com o auxílio de uma delicada tela de metal e um êmbolo de uma seringa estéril, em meio de cultivo DMEM incompleto (MI). As células foram centrifugadas a uma velocidade de 1000g por 5 min. e ressuspendidas em DMEM incompleto três vezes. Logo após, 50 ml de meio HAT 20 foi adicionado as células e distribuídas em 5 placas com 100ul nas 480 cavidades.

### 3.1.3 Fusão celular

Células de mieloma da linhagem SP2/0 cultivadas em meio DMEM completo foram removidas dos frascos de cultivo e centrifugadas a 1000 RPM\* por 5 min. As mesmas foram novamente centrifugadas a 1000RPM\* por 5 min e ressuspensas em meio incompleto. O mesmo sacrifício e maceração com o órgão do animal saudável foi repetido com o animal imunizado, para a utilização de seu baço na fusão. As células do baço foram centrifugadas e ressuspensas três vezes a uma velocidade de 1000 RPM\* por 5 min. Logo após, as células foram ressuspensas em 10ml de MI, enquanto ocorreram as lavagens o PEG (Polietilenoglicol) foi derretido em água quente. A fusão foi realizada da seguinte forma: as suspensões foram misturadas (mieloma/baço) e centrifugadas por 8 min a 1000RPM\*, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido. A uma temperatura de 37°C foi adicionado 1mL de PEG (Polietilenoglicol) durante 1min e agitado por mais 1min. Logo após foi adicionado 1mL de meio incompleto durante 1 min e por fim acrescentado e agitado 7mL de meio incompleto durante 3 min.

\* Centrifugador Exselsa Baby (FANEM LTDA)

### 3.1.4 Seleção dos hibridomas

A seleção dos hibridomas foi realizada através de um ELISA indireto usando como antígeno a Ligrep. Uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 50uL/poço da proteína recombinante a uma concentração final de 3ug/mL e incubada por 1 h à 37°C. As cavidades foram lavadas 3 vezes com 200uL de PBS-T e 50uL do sobrenadante de cada cavidade da placa de cultivo da fusão celular foi adicionado e incubado por 1h a 37°C. Novamente a placa foi lavada e adicionado 50uL de conjugado anti-IgG-M/peroxidase diluído 1:2000 em PBS-T e incubada por 1h a 37°C. A placa foi lavada pela última vez e 50uL de substrato foi adicionado e deixado por 15 min no escuro. A placa foi lida em leitor de ELISA Multiskan MCC/340 comprimento de onda 450nm.

### 3.1.5 Cultivo dos Hibridomas

Os hibridomas foram cultivados em garrafas de 75m<sup>2</sup> em MC em uma estufa de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37°C e então congelados em nitrogênio ou inoculados em camundongos para produção de ascite.

### 3.1.6 Produção de Ascite

Os animais utilizados para a produção do fluido ascítico, foram camundongos BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas, que previamente (10 dias antes) haviam sido inoculados com 500uL de pristane (2, 6, 10,14 tetra-metil-pentadecano) intraperitonealmente. 500uL de  $8 \times 10^6$  células de hibridomas foram inoculados novamente em cada animal. A coleta da ascite foi feita por punção com agulha após 10-14 dias.

## 3.2 ELISA Indireto com a *Leptospira* nativa e a LigB

Uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 50uL/poço de poly-L-lisina diluída 1:10 em água destilada, incubada por 1 hora à 37 °C e deixada overnite em temperatura ambiente. Também foi sensibilizada uma placa com 50 uL/poço de LigB, concentração final de 3ug/mL e deixada pelo mesmo período. 50 uL da suspensão de cinco espécies de *Leptospira*: *L. interrogans* L 1-130 cepa fiocruz, *L. borgpetersenii*, *L. kirschineri*, *L. noguchii* e *L. weilii*, todas de baixa passagem com concentração de  $10^8$  cel/mL foi adicionado a placa com a poly-L-lisina e incubada por 1 h à 37°C. Após a placas foram lavadas com PBS-T 3 vezes com 200uL por cavidade e a placa com a bactéria foi bloqueada com 50uL/poço de PBS a 5% de leite em pó. Diluidos em PBS-T 1:50 foi usado como controle positivo soro de camundongo imunizado e negativo soro de camundongo não imunizado. A ascite foi diluída 1:50 e todos os poços foram cobertos com 50uL. Novamente a placa foi lavada pelo mesmo procedimento e então foi adicionado o conjugado-peroxidase Anti-IgG de camundongo diluído em PBS-T 1:2000. As placas foram incubadas por 1 h à 37°C, após as placas foram lavadas pela última vez e

adicionado 50uL/poço de substrato (5uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+5mL de tampão fosfato-citrato pH-4+ 2mg de OPD) e deixada no escuro por 15 minutos. A leitura da placa foi feita em leitor de ELISA Multiskan MCC/ 340 comprimento de onda 450nm.

### 3.3 Western Blot

Eletroforeticamente foram separadas em gel de acrilamida 10%, a suspensão de *Leptospira* (10<sup>9</sup> leptospiras/mL) induzidas com cloreto de sódio, e a proteína recombinante LigB. Após o término da eletroforese, a proteína e a *Leptospira* foram transferidas por 1,5 horas, DDP (diferença de potencial elétrico) = 100V e C (corrente) = 400mA para uma membrana de PVDF (Amersham). A membrana com os antígenos (*Leptospira* e rLigB) foi bloqueada overnight com PBS a 5% de leite em pó. Como controle positivo foi usado soro de camundongo imunizado e negativo soro de camundongo não imunizado, diluídos em PBS-T 1:1000. O fluido ascítico diluído 1:1000 foi testado contra a *Leptospira* e a LigB. Foi adicionado o conjugado-peroxidase Anti-IgG-M de camundongo diluído em PBS-T 1:2000. Por último foi adicionado o substrato para a visualização das bandas. A membrana foi lavada em todas as etapas 3 vezes com PBS-T e agitada por 1h a temperatura ambiente.

### 3.4 Imunofluorescência indireta com leptospiras vivas fixadas

A sensibilização das lâminas foi realizada no dia anterior com poly-L-lisina, diluída em água destilada 1: 10 e deixadas por uma hora a 37° C. Logo após foram deixadas em temperatura ambiente overnight. Cinco espécies de *Leptospira* foram usadas para a realização do experimento: *L. interrogans* (L 1 130), *L. borgpetersenii*, *L. kirschineri*, *L. noguchii* e *L. weilii*, todas de baixa passagem induzidas com cloreto de sódio. As suspensões foram centrifugadas a 10000 RPM\* por 5 minutos e o pellet foi ressuspendido em PBS estéril em volume igual ao inicial. 10 uL do meio contendo as leptospiras foi acrescentado em cada círculo e deixados a 30 °C por uma hora (até a gota secar). As lâminas foram lavadas 2 vezes com BSA2% diluído em PBS. 20 uL da ascite diluída 1:5 foi acrescentado a cada círculo da lâmina e deixada em câmara úmida por 1 h. O processo de lavagem foi novamente realizado e 20 uL do



anticorpo secundário (anti- IgG-M de camundongo) diluído 1:2000 foi acrescentado à lâmina e incubado por 1 h em câmara úmida. Uma gota de meio de montagem (solução anti-fading) foi adicionada sobre os poços. Em seguida a visualização foi feita em microscópio de fluorescência.

\* Centrifugador Exselsa Baby (FANEM LTDA)

## 4. Resultados

### 4.1 Elisa indireto com a *Leptospira* nativa e a LigB

O anticorpo monoclonal reagiu com a proteína LigB e apresentou reações fracas com as diversas leptospiros testadas. Com esses resultados podemos concluir que o Mab produzido não tem grande afinidade com LigB nativa através do ELISA indireto.

### 4.2 Imunofluorescência indireta com leptospiros vivas fixadas

A imunofluorescência indireta com as leptospiros vivas fixadas detectou a *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 (Fig. 1). As outras espécies testadas, *L. borgpetersenii*, *L. kirschineri*, *L. noguchii* e *L. weilii* não apresentaram imunofluorescência. No controle negativo (Fig. 7) foi adicionado Mab anti-*Salmonella* que não reagiu, comprovando a reação específica do Mab anti-LigB com as leptospiros.

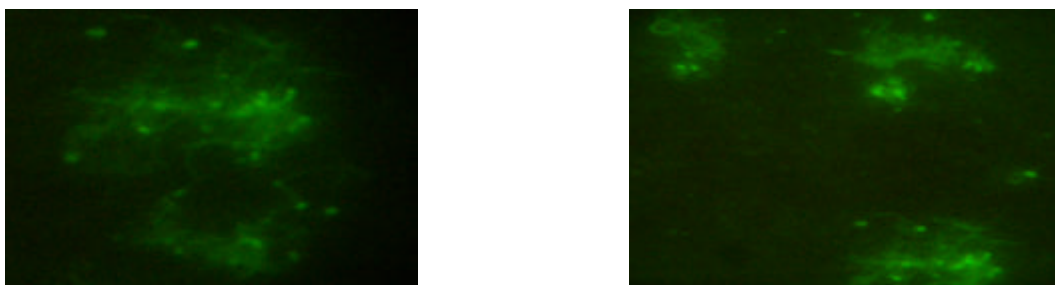


Figura 6 – Reações do Mab anti-LigB com a *L. interrogans* L1 130 Cepa fiocruz

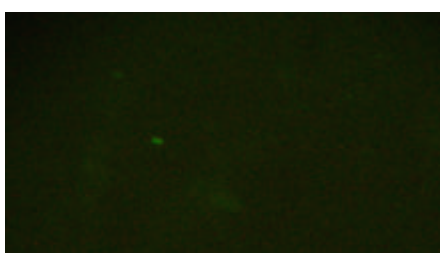


Figura 7 – Controle negativo (Mab anti-*Salmonella*).

### 4.3 Western Blot

O Western Blotting é um teste imunoenzimático que além de detectar através de anticorpos um determinante antigênico, visa identificar o tamanho molecular do antígeno, pela formação de bandas na membrana de nitrocelulose. Nesse ensaio a *Leptospira* nativa não foi reconhecida, sendo possível visualizar apenas a reação do Mab anti-LigB com a proteína recombinante (Fig. 8).



Figura 8 – Reação do Mab anti-LigB com a proteína.

## 5. Discussão

A fase inicial da leptospirose é caracterizada por febre, calafrios, dores de cabeça e mialgia, entretanto, a febre é o único sintoma encontrado em muitos casos (Faine et al 1999, Farr 1995). A grande maioria dos sintomas da leptospirose são freqüentemente associados com outras doenças como a dengue, a hantavirose, a influenza, entre outras, o que dificulta o diagnóstico clínico da doença (Bruce et al., 2005). Um exemplo importante que contribui para o confundimento no diagnóstico clínico e eleva a taxa de mortalidade pela leptospirose, pode ser evidenciado quando ocorrem simultaneamente epidemias de dengue e de leptospirose onde estas doenças ocorrem de forma endêmica (Flannery et al, 2001). Por isso, existe a necessidade de desenvolver técnicas rápidas para o diagnóstico laboratorial, e que sejam disponíveis para a rede de saúde pública ambulatorial e hospitalar.

Nos últimos anos, a membrana externa das leptospirosas foi muito estudada com a intenção de conhecer quais moléculas imunogênicas estão envolvidas no processo de patogenicidade (Haake et al, 2000; Matsunaga et al 2003; Palaniapan 2004). A busca por tais moléculas conduziu a um avanço na elaboração de novos testes de diagnóstico laboratorial que confirmem a leptospirose, principalmente no estágio inicial, e de novas estratégias para a elaboração de uma vacina recombinante contra a leptospirose (McBride et al 2005). Embora existam muitos trabalhos sobre métodos alternativos de diagnóstico da leptospirose, há claramente a necessidade de mais esforços nesse sentido para a compreensão da interação, entre o indivíduo hospedeiro e a bactéria patogênica.

A superfície da *Leptospira* consiste predominantemente de um pequeno número de proteínas, e três tipos de proteínas de membrana externa tem sido descritas como as proteínas transmembrana, proteínas periféricas e as lipoproteínas (Cullen et al., 2004). As três principais proteínas em ordem de abundância na membrana externa são LipL32, LipL21, and LipL41 (Cullen et al, 2005). LipL32, OMPL1 e LipL41 têm sido relatadas como estimuladoras parciais de imunoproteção contra leptospirose em modelos animais (Branger et al 2001, Haake et al 1999). Além disso, anticorpos monoclonais contra algumas destas proteínas tem sido produzidos e caracterizados para a utilização em ensaios de imunodiagnóstico e

classificação de leptospiros pela diferenciação em sorogrupos e sorovares (Ciceroni et al, 2002).

Com a descrição das proteínas Ligs e a caracterização da sua atividade na ligação com a fibronectina e outros componentes da matriz extracelular das células do hospedeiro evidenciou-se o importante papel destas adesinas durante a penetração, disseminação e colonização das leptospiros durante o processo infeccioso (Choy et al 2007). Outros trabalhos mostraram que a expressão destas proteínas em cultivos é fortemente induzida quando a osmolaridade é elevada para níveis encontrados em tecidos de hospedeiros mamíferos como o homem e o rato, sugerindo a importância da osmolaridade no período de transição do ambiente para o hospedeiro (Matsunaga et al 2007).

Em nosso trabalho, a utilização de uma estratégia semelhante, com o aumento da osmolaridade dos cultivos de L1-130, 12 horas antes de sua utilização na técnica de Imunofluorescência indireta, mostrou o reconhecimento da proteína nativa pelo Mab anti-LigB. Embora tal estratégia não tenha tido sucesso para os ensaios de ELISA e Western Blot.

O não reconhecimento da proteína nativa nas outras cepas das espécies genômicas disponíveis, quando utilizadas nos ensaios de imunofluorescência e ELISA indiretos, confirma os resultados encontrados por Cerqueira (2006), o qual destacou a diversidade que existe entre as proteínas LigB das diferentes espécies patogênicas das leptospiros estudadas.

Neste contexto, a investigação do potencial do anticorpo monoclonal anti-LigB produzido, através de técnicas de ELISA indireto, Western Blot e Imunofluorescência, realizada para fins da utilização no diagnóstico da leptospirose, demonstraram pouca afinidade do anticorpo pela *Leptospira* nativa. Estes resultados sugerem que novos anticorpos monoclonais contra a proteína LigB sejam produzidos e caracterizados para elaboração de testes que confirmem precocemente a leptospirose.

## 6. Conclusões

- ? Foi obtido um hibridoma que secretou anticorpos monoclonais anti-LigB;
- ? O Mab anti-LigB apresentou baixa afinidade pela *Leptospira* nativa, quando testado por Western Blot e ELISA indireto;
- ? O Mab anti-LigB reconheceu a proteína nativa nos ensaios de Imunofluorescência indireta com a cepa homóloga (Fiocruz L1-130), porém não reconheceu a proteína nativa em exemplares de outras 4 espécies.

## 7. Referências Bibliográficas

Andreotti PE, Ludwig GV, Peruski AH, Tuite G, Morse JJ, Peruski Jr L.F. Immunoassay of infectious agents. **Biotechniques**, 35, 850–859, 2003.

Babudieri B. Animal reservoirs of leptospire. **Annals of New York Academy of Science**, v.70, n.3, p.393-413, 1958.

Barcellos C, Lammerhirt CB, Almeida MAB, Santos E. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.5, p.1283-1292, 2003.

Berry, JD. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal** 170: 193 – 211. 2005.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, 3 (12):757-71, 2003.

Bolin C, Alt D. Clinical signs, diagnosis and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practitioner** 33:50-55, 1999.

Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G, Eloit M. Identification of the Hemolysis-Associated Protein 1 as a Cross- Protective Immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-Mediated Vaccination. **Infection and Immunity** 69:6831-6838, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual da Leptospirose. FNS, CENEPI, 2ª ed. – **Brasília: Fundação Nacional de Saúde**, 98 p, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas Operacionais de Centros de Controle de zoonoses- Procedimentos para o Controle de roedores. FNS, CENEPI, Coordenação

de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. 1ª ed. – **Brasília: Fundação Nacional de Saúde**, 80 p, 1993.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematics Bacteriology**. 49: 839–58. 1999.

Bruce MG, Sanders EJ, Leake JA, Zaidel O, Bragg SL, Aye T, Shutt KA, Deseda CC, Rigau-Perez JG, Tappero JW, Perkins BA, Spiegel RA, Ashford DA. Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Tropica**, 96 (1):36-46, 2005.

Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**. 103:14560-14565. 2006.

Cerqueira GM. **Caracterização de *Leptospira* spp quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnóstico**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**. 2007. (in press).

Ciceroni L, Ciarrocchi S, Ciervo A, Petrucca A, Pinto A, Calderaro A, Viani I, Galati L, Dettori G, Chezzi C. Differentiation of leptospire of the serogroup Pomona by



monoclonal antibodies, pulsed-field gel electrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Research in Microbiology**, 153:37-44, 2002.

Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic leptospira species. **Infection and Immunity** 71:2414-2421, 2003.

CULTURA PADRE ANCHIETA: Disponível em: [www.tvcultura.com.br](http://www.tvcultura.com.br). Acesso 30 mar. 2007.

Dey S, Mohan CM, Kumar TM, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology** 103 (1-2):99-106, 2004.

Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospire. In: Bergan T, Norris J, eds. **Methods in microbiology**. London: Academic Press, 259–307. 1978.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MedSci, Melbourne**, 1999, 2nd.ed., 272p.

Flannery B, Pereira MM, Velloso LF, Carvalho, De Codes LG, Orrico GS, Dourado CM, Riley LW, Reis MG, Ko AI. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 65:657-663, 2001.

Frankel G, Lider O, Hershkoviz R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DC, Cahalon L, Humphries MJ, Dougan G. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. **Journal of Biological Chemical**. 271: 20359-64, 1996.

Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LC, Ho PL, Nascimento AL. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters** 244 (2):305-13, 2005.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis M G, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity** 69 (8):4958-4968, 2001.

Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. **Journal of Bacteriology** 175:4225-4234, 1993.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity** 68:2276-2285, 2000.

Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. **Science**. 286: 291-5, 1999.

Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. **Cell**, 50: 769-78, 1987.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 2001. 5<sup>th</sup>ed. **Garland Publishing**, New York, NY. 732p.

Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**. 354(9181):820-5. 1999.

Koizumi N, Watanabe H. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. **Journal of Medical Microbiology** 52:585-589, 2003.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematics and Evolution Microbiology**. 56:671–673. 2006.

Levett PN. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews** 14:296-326, 2001.

Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? **Journal of Medical Microbiology** 48:417-418, 1999.

Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**. 36:447-452. 2003.

Linha agrícola características de roedores: Disponível em: [www.protectioninsumos.com.br/.../ratazana.jpg](http://www.protectioninsumos.com.br/.../ratazana.jpg). Acesso em 30 mar. 2007.

Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, Zuerner RL, Adler B. Effects of Temperature on Expression Patterns in *Leptospira interrogans* Serovar Lai as Assesed by Whole-Genome Microarrays. **Infection and Immunity**, 74, (10): 5848-5859, 2006.

Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(2):131-4, 2004.

Luo Y, Frey EA, Pfuetzner RA, Creagh AL, Knoechel DG, Haynes CA, Finlay BB, Strynadka NC. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**. 405: 1073-7, 2000.

Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, 49:929-946, 2003.

McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 18: 376-386. 2005.

Meites E, Jay MT, Deresinski S, Shieh WJ, Zaki SR, Tompkins L, Smith DS. Reemerging leptospirosis, California. **Emerging Infectious Diseases**. 10(3):406-12. 2004.

MICROBIOLOGY AND IMUNOLOGY on-line: Disponível em: [www.pathmicro.med.sc.edu/leptospiras.jpg](http://www.pathmicro.med.sc.edu/leptospiras.jpg). Acesso em: 30 mar. 2007.

Ministério da Saúde. Disponível em [www.saude.gov](http://www.saude.gov). Acesso em: 30 mar. 2007.

Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. 44(10):3510-6. 2006.

Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setúbal JC, Haake DA, Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, 37 (4):459-77, 2004.

Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M, Itamoto K, Iwata H, Kano R, Hasegawa A, Onishi T, Inokuma H. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant OmpL1 protein. **Journal of Veterinary Medical Science** 67 (3): 249 – 254. 2005.

Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Microbiologic Methods**, 2005.

Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of lig-based

conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire.

**Molecular Cell Probes** 19 (2):111-7, 2005.

Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P, Zuerner RL, Qu J, Roe B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal Medical Microbiology** 53 (10):975-84, 2004.

Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, Chang YF. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**. 74 (3):1745-1750, 2006.

Payne Jr. WJ, Marshall DL, Shockley RK, Martin WJ. Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. **Clinical Microbiology Reviews** 1, 313–329. 1998.

Pereira MM, Matsuo MGS, Bauab AR, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Baranton G, Saint Girons I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* Sensus Stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p.450-452, 2000.

Perolat P, Chappel RJ, Adler B, et al. *Leptospira fainei* sp nov, isolated from pigs in Australia. **International Journal of Systematics Bacteriology**. 48: 851–58.1988.

Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 42: 215–19. 1992.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YN, Shi YM, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of

*Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature** 422:888-893. 2003.

Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, Haake DA. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. **Infection and Immunity** 63:3174-3181, 1995.

Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity** 64:2322-2330, 1996.

Silva, E.F., Brod CS, Cerqueira GM, Bourscheidt D, Seyffert N, Queiroz A, Santos CS, Ko AI, Dellagostin OA. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology** 121:144-149, 2007.

Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella Bvg*-intermediate phase protein. **Mol Microbiol.** 39: 65-78, 2001.

Suwimonteerabutr J, Chaicumpa W, Saengjaruk P, Tapchaisri P, Chongsa-Nguan M, Kalambaheti T, Ramasoota P, Sakolvaree Y, Virakul P. Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of *Leptospira* spp in bovine urine samples. **American Journal of Veterinary Research** 66(5):762-6, 2005.

Terpstra WJ. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. **Acta Leiden.** 60: 79–87. 1992.

Thomas DD, Higbie LM. In vitro association of leptospire with host cells. **Infection and Immunity.** 58 (3):581-5, 1990.

Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS,

Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **Journal of Infectious Diseases**. 178(5):1457-63. 1998.

Vasconcellos SA, Oliveira JCF, Morais ZM, Baruselli PS, Amaral R, Pinheiro SR, Ferreira F, Ferreira-Neto JS, Schönberg A, Hartskeerl RA. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 32:298-300, 2001.

Vinetz JM. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases** 14:527-538, 2001.

World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication** Data, 2003.

World Health Organization. Leptospirosis worldwide. **Weekly Epidemiological record** 74, 237-242. 1999.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**. 37: 407–15. 1987.