

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína de membrana externa LigB7-11 de leptospiras

Najara Carneiro Bittencourt

Pelotas, 2014

Najara Carneiro Bittencourt

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína de membrana externa LigB7-11 de leptospiras

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Co-orientador: Dra. Flávia Aleixo Vasconcellos

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B624p Bittencourt, Najara Carneiro

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína de membrana externa LigB7-11 de leptospiras / Najara Carneiro Bittencourt. – 29f. il. – Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Éverton Fagonde da Silva ; coorientador Flávia Aleixo Vasconcellos.

1.Biologia. 2.Leptospira. 3.Fator de virulência. 4.MAbs.
5.Diagnóstico 6.Leptospirose. I.Silva, Éverton Fagonde.
II.Vasconcellos, Flávia Aleixo. III.Título.

CDD:614.56

Najara Carneiro Bittencourt

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína de membrana externa LigB7-11 de leptospiros

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13/11/2014

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Geferson Fisher
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Dr. Marcelo Mendonça
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

A minha família. Meus pais, Adilmar e Neusa, meus maiores exemplos na vida, pelo amor incondicional, amizade, doação e presença nas etapas da minha formação pessoal e acadêmica. Aos meus irmãos queridos, Allan e Maíra pela amizade e paciência.

Ao meu namorado e amigo Ranieri pelo companheirismo, compreensão e carinho.

Ao meu orientador Éverton e co-orientadora Flávia por acreditarem sempre em mim e me auxiliarem de forma presente. Obrigada pela amizade, oportunidades e ensinamentos.

A minha primeira orientadora, Dulce, que ensinou, no início da minha jornada, os primeiros passos da pesquisa científica e por seguir me orientando, agora como amiga.

Aos meus colegas de laboratório, e grandes amigos, Karina e Amilton, por todos os momentos que compartilhamos, por toda a ajuda e companheirismo.

Aos meus amigos, Jéssica, Liliane, Matheus e William, que são um presente que ganhei há cinco anos. Obrigada pela amizade, risadas, brigas, estudos...

Ao professor Geferson Fisher e ao Marcelo Mendonça pelo auxílio prestado, que tornou possível a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação pessoal e acadêmica, obrigada!

Resumo

BITTENCOURT, Najara Carneiro. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína de membrana externa LigB7-11 de leptospiros.** 2014. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso- Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*. Geralmente, a transmissão ocorre por contato com a urina e tecidos dos animais carreadores. O diagnóstico da leptospirose em sua fase inicial é dificultado pelo fato de seu quadro clínico ser similar ao de outras doenças infecciosas. Para a confirmação da leptospirose é necessário a realização do diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial. O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o método de referência para o diagnóstico sorológico, entretanto possui baixa sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença. As proteínas de superfície LigA e LigB foram identificadas e relacionadas com a virulência de leptospiros patogênicas. Estas proteínas têm despertado o interesse para utilização como antígenos vacinais e em testes de diagnóstico. Com o advento de tecnologias para a produção de anticorpos monoclonais (MAbs), tornou-se possível desenvolver testes mais específicos e reprodutíveis do que aqueles baseados em anticorpos policlonais. Em razão disso, o objetivo deste trabalho foi produzir MAbs contra um fragmento da proteína recombinante LigB, a fim de possibilitar o desenvolvimento de uma nova tecnologia de diagnóstico imunológico. Para isso, um camundongo da linhagem BALB/c foi imunizado com 70µg da proteína recombinante LigB7-11, posteriormente o animal foi eutanasiado e a fusão celular dos linfócitos B do baço com as células de mieloma linhagem Sp2/O-Ag14 foi realizada, seguida de clonagem por diluição limitante. O clone produtor de MAbs foi expandido e isotipado. A partir da fusão e clonagem, foi obtido um hibridoma secretor de MAbs do isotipo IgM, com promissor potencial de uso em testes de triagem diagnóstica.

Palavras-chave: *Leptospira*; fator de virulência; MAbs; diagnóstico; leptospirose

Abstract

BITTENCOURT, Najara Carneiro. **Production and characterization of monoclonal antibodies against the outer membrane protein LigB7-11 of leptospires.** 2014. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso- Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic bacteria belonging to the *Leptospira* genus. Usually, transmission occurs by contact with the urine or tissue of carrier animals. The diagnosis of leptospirosis in its early stage is difficult because the clinical disease is similar to several infectious diseases. To confirm leptospirosis is necessary to conduct the clinical, epidemiological and laboratory diagnosis. The microscopic agglutination test (MAT) is the reference method for serological diagnosis, but it has low sensitivity, especially in the early stages. Efforts to identify the immunogenic components in the leptospires resulted in the characterization of three classes of lipoproteins. A surface proteins LigA and LigB were identified and related to the virulence of pathogenic *Leptospira*. These proteins have aroused interest for their use as vaccine antigens and in diagnostic tests. The advent of technologies for the production of monoclonal antibodies (MAbs) made possible to develop more specific and reproducible tests than those based on polyclonal antibody. For this reason, the aim of this work was to produce MAbs against a fragment of recombinant protein LigB of *Leptospira* to enable the development of a new technology for immunological diagnosis. In order to do so, a 7-week-old BALB/c mouse was immunized intraperitoneally with 70µg of the recombinant protein LigB7-11. Latter, the animal was euthanized and it was made the cellular fusion of the splenic lymphocytes with murine Sp2/O-Ag14 myeloma cells, followed by cloning via limiting dilution. The clone which produces MAbs was expanded and isotyped. From the cellular fusion and cloning, it was obtained a hybridoma which produces MAbs IgM isotype with potential use in diagnostic screening tests.

Key-words: *Leptospira*; virulence factor; MAbs; diagnostic; leptospirosis

Sumário

1 Introdução	7
1.1 Objetivo geral	8
1.2 Objetivos específicos.....	8
2 Revisão de Literatura	9
2.1 <i>Leptospira</i> e Leptospirose	9
2.2 Diagnóstico	10
2.3 Proteínas de membrana externa de leptospiros.....	12
2.4 Anticorpos monoclonais	13
3 Material e Métodos	15
3.1 Aspectos éticos.....	15
3.2 Proteína recombinante	15
3.3 Cultivo Celular	15
3.4 Obtenção e seleção de hibridomas	16
3.4.1 Imunização e avaliação da resposta imune	16
3.4.2 Fusão celular e seleção de hibridomas	17
3.4.3 Teste da produção de anticorpos por ELISA e clonagem	17
3.4.4 Expansão <i>in vitro</i>	18
3.4.5 Teste da produção de anticorpos por <i>Western blot</i>.....	18
3.4.6 Isotipagem dos anticorpos monoclonais (MAbs).....	18
4 Resultados	20
4.1 Caracterização da proteína recombinante	20
4.2 Avaliação da produção de anticorpos pelos hibridomas	20
4.3 Isotipagem	21
5 Discussão	22
6 Conclusão	24
Referências	25

1 Introdução

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, e tem grande importância econômica e de saúde pública no Brasil (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Os principais transmissores da leptospirose são animais infectados, os quais podem manifestar a doença de forma aguda ou crônica, podendo carrear as leptospirosas durante longos períodos de forma assintomática (BHARTI et al., 2003). A transmissão ocorre diretamente ou indiretamente pelos animais aos seres humanos (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

O diagnóstico da leptospirose em sua fase inicial é dificultado porque o quadro clínico é similar ao de outras doenças infecciosas, como gripe, malária, e dengue (FAINE et al., 1999; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Portanto, para a confirmação da leptospirose é necessário a realização do diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial. O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o método de referência para o diagnóstico sorológico, entretanto possui baixa sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença (WHO, 2003). Para substituir o MAT foram propostos diversos ensaios imunológicos baseados no uso de antígenos totais de leptospirosas, porém sua avaliação com amostras de origem clínica mostrou baixa sensibilidade (39 a 72%) na fase aguda da doença (SMITS et al., 2001; EFFLER et al., 2002; BAJANI et al., 2003).

Esforços para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospirosas, com potencial para o desenvolvimento de testes diagnósticos, resultaram na caracterização de três classes de lipoproteínas que são expressas na membrana externa durante a infecção, sendo estas compostas por lipoproteínas, proteínas transmembrana com função de porina e proteínas periféricas. Além dessas, algumas proteínas descritas há cerca de uma década têm despertado o interesse para utilização como antígenos vacinais e em testes de diagnóstico (PALANIAPPAN et al., 2002). Os genes de *Leptospira*, que contêm domínios repetitivos de aminoácidos, foram denominados de “*Leptospiral immunoglobulin-like (Lig)*” e codificam para as proteínas LigA e LigB, encontradas em leptospirosas patogênicas

(MATSUNAGA et al., 2003). Essas proteínas têm uma grande semelhança estrutural com adesinas conhecidas, e estreita associação com a virulência, o que sugere que podem estar envolvidas na colonização dos tecidos do hospedeiro (CHOY et al., 2007).

Com o advento de tecnologias para a produção de anticorpos monoclonais (MAbs), tornou-se possível desenvolver testes mais específicos e reprodutíveis, do que aqueles baseados em anticorpos policlonais (ANDREOTTI et al., 2003). Os MAbs possuem uniformidade, característica fundamental para o desenvolvimento de testes que melhorem a especificidade e sensibilidade dos ensaios (BERRY et al. 2005).

Tendo em vista a necessidade de um teste com alta sensibilidade no diagnóstico precoce da leptospirose, torna-se importante a produção de anticorpos monoclonais contra fatores de virulência de *Leptospira* a fim de possibilitar o desenvolvimento de novos insumos para o diagnóstico imunológico de leptospirose.

1.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais (MAbs) contra a proteína recombinante LigB, domínios 7 a 11, de *Leptospira*.

1.2 Objetivos específicos

- Obter hibridomas produtores de MAbs contra a proteína rLigB7-11;
- Caracterizar os MAbs produzidos por ELISA, *Western blot* e isotipagem.

2 Revisão de Literatura

2.1 *Leptospira* e Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, e tem grande importância econômica e de saúde pública no Brasil (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001). É mantida na natureza devido à infecção renal crônica dos animais carreadores. O principal reservatório são roedores, porém animais de produção e de companhia também são fonte de infecção humana (LEVETT, 2009). Até o momento cerca de 300 sorovares patogênicos de *Leptospira* foram identificados (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales e inclui espécies saprofíticas e patogênicas. Leptospiras são espiroquetas, com cerca de 0,1µm de diâmetro e 6-20µm de comprimento (FAINE et al., 1999). Por serem muito delgadas, são mais bem visualizadas em microscópio de campo escuro. A motilidade da leptospira é caracterizada por rotação em torno do seu eixo longitudinal e de flexão e extensão (WHO, 2007).

Leptospiras têm a estrutura típica de espiroquetas, em que a membrana citoplasmática e da parede celular de peptidoglicano estão intimamente associados e são recobertas por uma membrana externa (HAAKE, 2000; LEVETT, 2001). O lipopolissacarídeo (LPS) tem uma composição, morfológica e química, semelhante à de bactérias gram-negativa (LEVETT, 2001; VINH; ADLER; FAINE, 1986), porém sua atividade endotóxica é inferior (LEVETT, 2001; SHIMIZU et al., 1987).

A transmissão da doença ocorre por contato direto ou indireto com a urina e tecidos dos animais infectados. O contato direto acontece quando veterinários, trabalhadores de ordenha em propriedades leiteiras, de matadouros, e caçadores entram em contato com animais infectados. O contato indireto, mais comum, acontece através da exposição ao solo ou água contaminados (LEVETT, 2009). Os principais transmissores da leptospirose 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).

A leptospirose é, provavelmente, a zoonose mais difundida e predominante no mundo. Os surtos de leptospirose humana estão associados a períodos de intensa precipitação pluviométrica e consequentes inundações, pois nesses períodos pode ocorrer a exposição das mucosas e pele à água contaminada. Além disso, os riscos de infecção também aumentam devido à capacidade da bactéria sobreviver em ambiente úmido por um longo período (WHO, 2003).

As leptospiras penetram no corpo através de pequenos cortes ou abrasões, através das membranas mucosas, como a conjuntiva. Posteriormente, penetrando na corrente sanguínea causando bacteremia (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Com o aumento do número de leptospiras no sangue e tecidos, aparecem os sintomas devido às lesões causadas pela ação das toxinas da *Leptospira* (FAINE et al., 1999). O patógeno é capaz de se alojar no fígado, rins, coração e pulmões, porém outros órgãos também podem ser afetados de acordo com a gravidade da infecção (LEVETT, 2001). A doença pode ser leve ou grave e possivelmente fatal. Os sintomas iniciais são dores de cabeça, febre, mal-estar, derrames na conjuntiva. Porém, em casos graves pode ser observada hemorragia na pele e mucosas, miocardite, insuficiência hepática, podendo levar à morte se não tratada (FAINE et al., 1999).

As taxas de morbidade e mortalidade aumentam devido à 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 (LEVETT, 2001).

2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose em sua fase inicial é extremamente importante, no entanto é dificultado pelo fato de seu quadro clínico ser similar ao de várias doenças infecciosas, como gripe, malária, hepatite e dengue (FAINE et al., 1999; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Portanto, para a confirmação de leptospirose é necessário a realização do diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial (WHO, 2003).

A maioria dos casos de leptospirose são diagnosticados por sorologia. O método de referência para diagnóstico sorológico é o soroaglutinação microscópica (MAT), um ensaio complexo em que o soro do paciente reage com uma suspensão de antígenos vivos de sorovares de leptospiros (LEVETT, 2001).

No entanto, esse teste possui algumas desvantagens, como a necessidade de instalações adequadas para manter os cultivos de leptospiros vivos, a técnica é demorada, apresenta baixa sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença. A baixa sensibilidade do MAT atribui-se ao fato de que o sistema imune do indivíduo infectado leva de 5 a 10 dias para produzir níveis detectáveis de anticorpos contra o agente infectante (WHO, 2003). Além das dificuldades enfrentadas para o diagnóstico durante a fase inicial da leptospirose, existe um alto grau de reações cruzadas entre diferentes sorovares, onde muitas vezes o resultado revela títulos elevados de anticorpos contra sorovares que não são os causadores da enfermidade ou surto (LEVETT, 2003).

Outro teste considerado padrão na identificação da leptospirose é o isolamento da leptospiros através de cultivo bacteriano. Cultura de sangue, coletado na fase inicial da doença, fornece evidências de leptospirose. No entanto, as leptospiros são bactérias fastidiosas, de crescimento lento e demora semanas ou meses para o cultivo se tornar positivo. Assim, esta ferramenta de diagnóstico não é benéfica para o tratamento do paciente (AHMED; VAN DER LINDEN; HARTSKEERL, 2014; FAINE et al., 1999; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; WHO, 2003).

Para substituir os testes padrão foram propostos diversos ensaios imunológicos baseados no uso de antígenos totais de leptospiros, porém sua avaliação com amostras de origem clínica mostrou baixas sensibilidades (39% a 72%) na fase aguda da doença (BAJANI et al., 2003; EFFLER et al., 2002; LEVETT; BRANCH, 2002; SMITS et al., 2001).

Muitos testes rápidos para humanos estão disponíveis atualmente. Porém, são apenas para fim de triagem. Os resultados obtidos devem ser confirmados por teste padrão e, além disso, eles são aplicáveis apenas em estágio avançado da doença. Deste modo, testes novos ou simplificados para diagnóstico em animais e humanos são extremamente necessários (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

2.3 Proteínas de membrana externa de leptospiras

O lipopolissacarídeo (LPS) de leptospiras tem propriedades estruturais, químicas e imunológicas semelhantes às do LPS de bactérias gram-negativas. Inicialmente pensava-se que ele era o único antígeno importante nas leptospiras (FAINE et al., 1999). Atualmente se sabe que existem várias proteínas expostas na superfície da membrana que interagem com o sistema imune (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; CULLEN et al. 2005). As proteínas da membrana externa (OMPs) das leptospiras, também estão expostas na superfície da célula, são imunogênicas e muitas são conservadas apenas em sorovares patogênicos (CULLEN et al., 2004; CULLEN et al., 2005; MATSUNAGA et al., 2005).

Foram identificadas três classes de OMPs de leptospiras. A maior classe é composta pelas lipoproteínas de membrana externa onde estão incluídas a LipL36, LipL48, LipL41 e a LipL32, a qual é considerada a maior proteína de membrana externa (CULLEN et al., 2003), a mais abundante em leptospiras patogênicas, a proteína mais reconhecida pelo soro de pacientes infectados com leptospiras e, assim como a LipL41, existe apenas em leptospiras patogênicas (HAAKE et al., 2000).

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

Mediante a construção de bibliotecas de expressão com genes das cepas Fiocruz L1-130 e *Leptospira kirschneri* Grippotyphosa RM52, utilizando-se soros de pacientes humanos na 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 à família proteica (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 leptospiras patogênicas. Estudos de microscopia imunoeletrônica confirmaram que as proteínas Lig estão localizadas na superfície das leptospiras (MATSUNAGA et al., 2003). LigA e LigB têm uma grande semelhança

estrutural com adesinas conhecidas e estreita associação com a virulência o que sugere que podem estar envolvidas na colonização dos tecidos do hospedeiro (CHOY et al., 2007).

2.4 Anticorpos Monoclonais

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais (MAbs) iniciou-se quando Köhler e Milstein (1975) concluíram que poderiam fundir dois tipos de células de camundongos; células do mieloma e os linfócitos B do baço. A partir dessa fusão foram obtidas células híbridas (hibridomas) com as duas características desejáveis, o caráter imortal das células do mieloma e a capacidade de secreção de anticorpos específicos das células B do baço (CAMPBELL, 1991). Desta forma, “cada clone de hibridoma é uma fábrica de uma molécula de anticorpo, produzindo um anticorpo monoclonal que reconhece somente um epítipo” (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009, p.169).

Os MAbs possuem aplicações terapêuticas, no diagnóstico, no desenvolvimento de estratégias vacinais, entre outras (CAMPBELL, 1991). No que se refere ao diagnóstico, com o advento de tecnologias para a produção de anticorpos monoclonais, tornou-se possível desenvolver testes diagnósticos mais específicos e reprodutíveis do que aqueles baseados em anticorpos policlonais (ANDREOTTI et al., 2003). Os anticorpos monoclonais são altamente específicos e reconhecem um único sítio de ligação do antígeno (epítipo) em um patógeno. Porém, não é capaz de reconhecer variantes do mesmo antígeno. Isso difere dos anticorpos policlonais, que podem reconhecer vários determinantes antigênicos, porém com menos especificidade (CAMPBELL, 1991). Segundo Berry et al. (2005), a habilidade de produzir anticorpos monoclonais contra proteínas que são expressas por organismos patogênicos é uma das mais significantes realizações da biotecnologia.

A uniformidade dos MAbs é uma característica fundamental para o desenvolvimento de pesquisas e trabalhos que melhorem a sensibilidade e especificidade dos ensaios (BERRY et al. 2005). Estes anticorpos têm constituído a base para um grande número de imunoenaios específicos e reprodutíveis para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (ANDREOTTI et al., 2003; PAYNE et al., 1998).

Autores relataram o uso de anticorpos monoclonais para detecção de anticorpos em ELISA competitivo (SURUJBALLI; ELMGREN, 2000) ou em ELISA de captura de anticorpos (YAN et al., 1999), mas ambos detectam anticorpos sorovar-específicos. Trabalhos mais recentes demonstraram a produção de anticorpos monoclonais contra LipL32 (COUTINHO et al., 2005; FERNANDES et al., 2007) e LigBRep (MONTE et al., 2011) visando o diagnóstico para leptospirose, em que os anticorpos produzidos conseguiram reconhecer de forma eficiente a proteína na forma nativa em leptospirosas patogênicas.

O mercado de anticorpo monoclonal representa o segmento de crescimento mais rápido da indústria farmacêutica (GUIMARÃES; SILVA; RANGEL, 2008). Segundo Reichert (2005), em 2005 os anticorpos monoclonais já constituíam a maioria das proteínas recombinantes com utilização clínica, com mais de 150 produtos em estudo, patrocinados por empresas localizadas em todo o mundo.

3 Material e Métodos

3.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 5238.

3.2 Proteína recombinante

Para a imunização do camundongo foi utilizado o fragmento de 43 kDa da proteína recombinante LigB de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, correspondente aos domínios 7-11 (625-1044aa) da respectiva proteína (LigB7-11). O fragmento foi produzido no Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (LATER/FIOCRUZ/RJ).

A fim de possibilitar o cálculo das doses, foi realizada a quantificação da proteína, utilizando Kit “BCA- *Protein Assay kit*” (PIERCE®) seguindo as instruções do fabricante. Para confirmar a integridade da proteína e a reatividade com soro de humano convalescente, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western blot*, respectivamente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3 Cultivo celular

As células cultivadas pertencem à linhagem Sp2/0-Ag14, de mieloma murino. Para obtenção de um cultivo celular viável, possibilitando o processo de fusão celular, primeiramente foram descongeladas alíquotas de células. Para isso, as alíquotas foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria a 37°C. Todo o volume de células contido no criotubo foi adicionado a 6ml de MEM (Modified Eagle Medium) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco®) em garrafa

de cultivo celular (25cm³) e incubado em estufa com 3,5% de CO₂ a 37°C e posteriormente expandido para garrafas de 75cm³.

3.4 Obtenção e seleção de hibridomas

3.4.1 Imunização e avaliação da resposta imune

Um (1) camundongo (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c, com sete semanas de idade, foi inoculado via intraperitoneal. Foram administradas cinco doses, com intervalos de uma semana entre cada inoculação. Cada dose foi composta por 70µg de proteína, 250µl de adjuvante (Marcol-Montanide 1:10) e PBS estéril, completando o volume final de 500µl. Antes da primeira imunização e após cada imunização foi retirado sangue do camundongo, o soro foi separado por centrifugação e testado por ELISA indireto (Enzime-Linked Immunosorbent Assay), a fim de avaliar a resposta humoral do camundongo.

Para o ELISA, uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 50µL da proteína recombinante na concentração de 3µg/ml e armazenada a 4°C *overnight*. As cavidades foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas por 1h a 37°C com solução de leite em pó desnatado. Novas lavagens foram realizadas e 50µL do soro diluído (1:100) foi adicionado e mantido a 37°C por 1h. Após lavagens, foi adicionado 50µL de conjugado anti-camundongo/peroxidase diluído 1:4000 e incubado por 1h a 37°C, seguido de cinco lavagens. Foi adicionado à placa 50µL da solução de revelação ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato pH 5,0 com 0,01% de H₂O₂. Após 15min, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, a reação foi parada com Ácido Sulfúrico 4N, por fim, a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro comprimento com filtro de 492nm. Como controle negativo foi utilizado soro do camundongo não imunizado.

Cinco dias antes da fusão foi feita uma inoculação de reforço, endovenosa, com 100µl da proteína pura na concentração de 0,78µg/µl. O animal foi eutanasiado, através de aprofundamento anestésico com Isoflurano. No momento da eutanásia coletou-se sangue e baço do camundongo, para utilização como controle em testes futuros e na etapa de fusão celular, respectivamente.

3.4.2 Fusão celular e seleção dos hibridomas

O baço coletado foi macerado em meio de cultivo MEM, sem adição de soro fetal bovino (MEM incompleto) e centrifugado por 8 minutos a 1000rpm. As células foram lavadas (três vezes) com MEM incompleto (MI) e ao final ressuspendidas em 10ml de MI.

Células de mieloma da linhagem celular Sp2/0, cultivadas em MEM completo (MC) foram removidas dos frascos de cultivo e centrifugadas a 1000rpm por 8 minutos. Após duas lavagens com MI, foram ressuspendidas em 5ml de MI e contadas em câmara de Neubauer. As suspensões de células do baço foram misturadas com as células Sp2/0-Ag14 na proporção de 2:1 e centrifugadas a 1000rpm por 8 minutos, o sobrenadante foi desprezado e uma solução de PEG 3.000 e MI foi adicionado em agitação durante seis minutos. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em 80ml de MEM-HAT 20 (MEM acrescido de hipoxantina, timidina e aminopterina) e distribuídas em 4 placas de cultivo de 96 cavidades (200µl/cavidade). A partir do quarto dia após a fusão foi realizada troca de meio de cultivo e no décimo dia foi adicionado às cavidades MEM-HAT10.

Três cavidades foram utilizadas como controle, contendo apenas células de mieloma Sp2/0-Ag14 a fim de testar a eficiência do meio de cultivo MEM-HAT 20 em selecionar apenas células fusionadas.

3.4.3 Teste da produção de anticorpos por ELISA e clonagem

Após um período de cultivo de 14 dias, os sobrenadantes das cavidades que apresentavam crescimento celular foram testados por ELISA indireto usando como antígeno de sensibilização rLigB 7-11 (3µg/ml). Cultivos de hibridomas que reagiram ao teste foram clonados por diluição limitante. Para tal, foi realizada a eutanásia e coleta do baço de um camundongo não imunizado. Foi utilizada, na clonagem, a proporção de um baço de um camundongo não imunizado para seis cavidades a serem clonadas. O baço foi macerado em 10ml de MI e centrifugado a 2000rpm por 8min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Por fim, o pellet foi ressuspendido em um volume de 60ml de MC. Retirou-se 1µl do sobrenadante a ser clonado o qual foi diluído em 10ml do meio contendo células do baço e adicionado a placas de cultivo celular. O teste de

ELISA foi realizado a cada clonagem para confirmar a produção de anticorpos pelos grupamentos de células fusionadas visualizados. A clonagem foi repetida até a obtenção de um clone isolado (hibridoma) secretor de anticorpos.

3.4.4 Expansão *in vitro*

A expansão *in vitro* dos clones foi feita em garrafas de cultivo celular contendo MC, visando obter uma maior quantidade de células produtoras de anticorpos para testes de caracterização e posterior purificação dos anticorpos específicos.

3.4.5 Teste de produção de anticorpos por *Western blot*

A proteína rLigB7-11 foi confrontada com o sobrenadante do clone produtor de anticorpos monoclonais através de WB. Para isso, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com a proteína rLigB7-11. Posteriormente, foi realizada a transferência do gel para a membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com uma solução de 5% de leite em pó desnatado, *overnight*. A membrana foi separada em duas tiras e então adicionado a uma tira o soro do camundongo imunizado, como controle positivo e na outra tira o sobrenadante do cultivo do hibridoma. Após uma hora de incubação a temperatura ambiente e lavagens com PBS-T, foi adicionado o anticorpo anti-mouse conjugado a peroxidase em ambas as tiras de membrana. Após mais uma hora de incubação foi feita a revelação com DAB/H₂O₂. Foi utilizado um marcador pré-corado *Amersham™ Full-Range Rainbow™*; para verificação correta do tamanho das bandas de reconhecimento.

3.4.6 Isotipagem dos anticorpos monoclonais (MAbs)

A isotipagem dos MAbs obtidos foi realizada utilizando o kit de isotipagem (Sigma), conforme orientações do fabricante. Uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 100µL de rLigB7-11 (3µg/ml), e mantida à 4°C *overnight*. A placa foi lavada por 3 vezes com PBS-T e então adicionou-se 100µL do sobrenadante de cultivo do hibridoma. Incubou-se à 37°C por 1h e, em seguida, a placa foi lavada novamente 3 vezes. Após, 50µL de anticorpos de cabra anti-isotipo específicos (Sigma) foram diluídos em PBS-T na proporção de 1:1000 e adicionados

às cavidades. A placa foi incubada a 37°C por 1h, lavada 3 vezes com PBS-T, e foi adicionado 100µL de conjugado de anticorpos de coelho anti-IgG de cabra com peroxidase, diluído na proporção 1:5000 em PBS-T, e a placa foi novamente incubada a 37°C por mais 1h. Após, foi realizada nova lavagem e adicionado 100µL de cromógeno ortofenilenodiamina (OPD). A leitura visual foi realizada após 15min de reação na ausência de luz.

4 Resultados

4.1 Caracterização da proteína recombinante

Os resultados visualizados a partir do SDS-PAGE e WB (Figura 1) demonstraram que a proteína (43kDa) encontra-se íntegra e reagindo na presença de soro de humano convalescente (FIOCRUZ-Bahia). A proteína rLigB7-11 quantificada através do *BCA Kit* (PIERCE®) se encontrava na concentração de 0,78µg/µl.

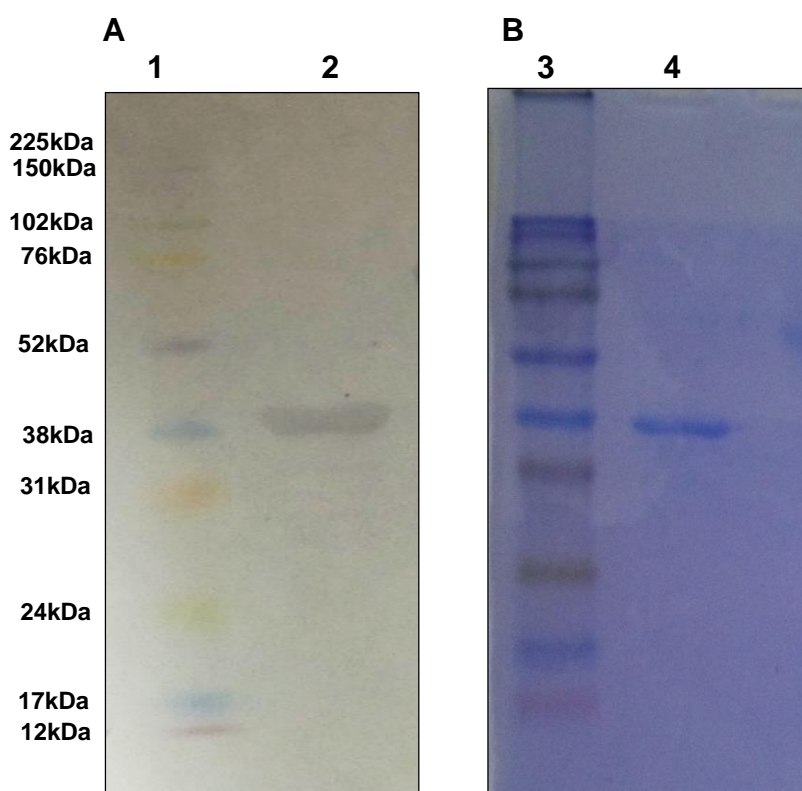


Figura 1 - Caracterização da proteína recombinante LigB7-11 por *Western blot* (A) e eletroforese SDS-PAGE (B). (A) Coluna 1: Marcador *Amersham™ Full-Range Rainbow™*; Coluna 2: Proteína recombinante LigB7-11 (B) Coluna 3: Marcador *Full-range Amersham Rainbow Marker*; Coluna 4: Proteína recombinante LigB7-11

4.2 Avaliação da produção de anticorpos pelos hibridomas

Após ser realizada a técnica de fusão celular, todas as cavidades que apresentaram crescimento foram testadas, através de ELISA indireto e

comparados a controle (soro policlonal do camundongo imunizado). À medida que foram sendo realizadas as clonagens por diluição limitante dos hibridomas, o número de células fusionadas reagentes ao ELISA foram sendo selecionadas. Por fim, foi obtido um hibridoma (1A9) reagente em ELISA e WB (figura 2).

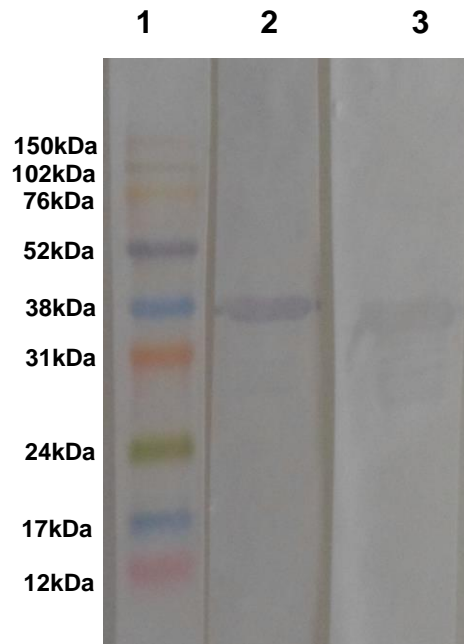


Figura 2. Avaliação do anticorpo monoclonal 1A9 por *Western blot*. 1: Marcador *Amersham™ Full-Range Rainbow™*; 2: Sobrenadante do cultivo de hibridoma 1A9; 3: Soro do camundongo imunizado.

4.3 Isotipagem

A partir do teste de ELISA para isotipagem realizado, conclui-se que o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 1A9 é do isotipo IgM.

5 Discussão

A leptospirose é, provavelmente, a zoonose mais difundida no mundo. Devido à dificuldade de diagnóstico clínico e laboratorial, a doença é subdiagnosticada e é, conseqüentemente, negligenciada (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; WHO, 2003). Testes de diagnóstico baseados na detecção de anticorpo possuem baixa sensibilidade no início da doença, portanto, testes que visam a detecção do antígeno possuem maior sensibilidade e especificidade, possibilitando o diagnóstico precoce (LEVETT, 2001). Reagentes contendo anticorpos monoclonais têm constituído a base para um grande número de imunoenaios altamente específicos e reprodutíveis para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas, devido a uniformidade dos MAbs (ANDREOTTI et al., 2003; BERRY, 2004; PAYNE et al., 1998).

O foco deste trabalho foi produzir anticorpos monoclonais contra a proteína recombinante LigB7-11 de leptospirosas para que possam ser, posteriormente, testadas quanto ao reconhecimento de bactérias patogênicas, possibilitando um diagnóstico rápido da leptospirose. A estratégia empregada a fim de atingir este objetivo foi a imunização de um (1) camundongo com a proteína, seguido de fusão celular entre linfócitos B do camundongo e células Sp2/O de mieloma murino, obtendo-se hibridomas produtores de anticorpos.

A técnica de fusão celular mostrou-se eficiente, porém, notou-se que logo após a fusão celular, todas as cavidades que apresentavam crescimento celular demonstraram reação no ELISA. Essa reação diminuiu ao longo das clonagens, provavelmente porque a reação inicial, pós-fusão, tem interferência da reação de fundo causada por anticorpos produzidos por linfócitos B do camundongo imunizado (CAMPBELL, 1991).

Contudo, obteve-se um clone isolado de hibridoma produtor de MAbs caracterizado como isotipo IgM, que mostrou-se reativo frente a proteína recombinante no ELISA e apresentou bandas fortes no WB comparado ao controle utilizado (soro do camundongo imunizado). Anticorpos da classe IgM estão,

predominantemente, presentes na resposta humoral durante a fase inicial da doença (NATARAJASEENIVASAN et al., 2008). Desta forma, este anticorpo tem potencial para possibilitar o diagnóstico na fase inicial da doença. Além disso, se empregado em um teste de ELISA, por exemplo, pode facilitar o diagnóstico em locais que possuem pouca tecnologia, e falta de apoio técnico. Visto que é uma técnica de baixo custo e simplificada quando comparado a técnicas como o MAT e métodos moleculares (CANAL et al., 2013).

Além da metodologia empregada neste trabalho, há necessidade de testes complementares frente a proteínas nativas de leptospirosas, para demonstrar o potencial diagnóstico destes anticorpos. Porém, os resultados obtidos até o momento, confirmam a produção de um anticorpo monoclonal IgM, insumo este, essencial para o desenvolvimento e validação de testes imunológicos que visam o diagnóstico da leptospirose em sua fase inicial.

6 Conclusões

A partir da metodologia adotada foi possível produzir um hibridoma secretor de anticorpo monoclonal (MAb), contra um fator de virulência de *Leptospira*, que reconhece a proteína rLigB7-11 por ELISA indireto e *Western Blot*. Os anticorpos monoclonais, parcialmente caracterizados, pertencem ao isotipo IgM.

Referências

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296, 2010.
- AHMED, A.; VAN DER LINDEN, H.; HARTSKEERL, R. A. Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Pathogenic *Leptospira*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, p.4953-4964, 2014.
- ANDREOTTI, P. E.; LUDWING, G. V.; PERUSKI, A. H.; TUIITE, J. J.; MORSE, S. S.; PERUSKI, L. F. Immunoassay of infectious agents. **BioTechniques**, v.35, p.850-859, 2003.
- BAJANI, M. D.; ASHFORD, D. A.; BRAGG, S. L.; WOODS, C. W.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; PLIKAYTIS, B. D.; PERKINS, B. A.; PHELAN, M.; LEVETT, P. N.; WEYANT, R. S. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.803-809, 2003.
- BERRY, Jody. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal**, v.170, p.193-211, 2005.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease**. v.3, p.757-771, 2003.
- CAMPBELL, Ailsa. **Monoclonal and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- CANAL, E.; POLLETT, S.; HEITZINGER, K.; GREGORY, M.; KASPER, M.; HALSEY, E.; MEZA, Y.; CAMPOS, K.; PEREZ, J.; MEZA, R.; BERNAL, M.; GUILLEN, A.; KOCHER, T. J.; ESPINOSA, B.; HALL, E. R.; MAVES, R. C. 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, n.438, p.2-7.
- CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v.75, n.5, p.2441-2450, 2007.

COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; FERNANDES, C. P. H.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Evaluation of the anti-LipL32 monoclonal antibodies potential for use in leptospirosis immunodiagnostic tests. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.28, p.279-288, 2007

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, n.3, p.291-318, 2004.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; BULASH, D. M.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. **Infection and Immunity**, v.71, n.5, p.2414–2421, 2003.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp.. **Infection and Immunity**, v.73, n.8, p. 4853-4863, 2005.

EFFLER, P. V.; BOGARD, A. K.; DOMEN, H. Y.; HIGA, A. R. K.; SASAKI, D. M. Evaluation of Eight Rapid Screening Tests for Acute Leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1464-1469, 2002.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, Austrália, 1999. 272p.

FERNANDES, C. P. H.; SEIXAS, F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; MCBRIDE, A. J.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal Antibodies Against LipL32, the Major Outer Membrane Protein of Pathogenic *Leptospira*: Production, Characterization, and Testing in Diagnostic Applications. **Hybridoma**, v.26, n.1, p.35-41, 2007.

FRIGUET, B.; CHAFFOTTE, A. F.; DJAVADI-OHANIANCE, L.; GOLDBERG, M. E.; Measurements of the true affinity constant in a solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Immunological Methods**, v.7, p.305-319, 1985.

GUIMARÃES, M. C. C.; SILVA, I. V.; RANGEL, L. B. A. Anticorpos na terapia contra o câncer. **Perspectivas online**, v.5, n.2, p.96-100.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.4, p.2276–2285, 2000.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.736-747, 2009.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, v.256, p.495-497, 1975.

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n.6, p.745-748, 2002.

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**, Orlando: Saunders Elsevier, 2009. p.1-7.

LEVETT, Paul. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.296-326, 2001.

LEVETT, Paul. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.447-52, 2003.

MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X.; HAAKE, D. A. 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, 2005.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v.49, n.4, p.929-945, 2003.

MONTE, L. G.; CONCEIÇÃO, F. R.; COUTINHO, M. L.; SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; VASCONCELLOS, F. A.; DE CASTRO, L. A. S.; HARTLEBEND, C. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal antibodies against the leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B conserved regions. **Microbiology and Infectious Diseases**, v.34, p.441-446, 2011.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948 p.

NATARAJASEENIVASAN, K.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SUGUNAN, A. P.; SELVIN, J; SEHGAL, S. C. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.8, n.102, p.699-708, 2008.

REICHERT, J. M.; ROSENSWEIG, C. J.; FADEN, L. B.; DEWITZ, M. C. Monoclonal antibody successes in the clinic. **Nature Biotechnology**, v.23, n.9, p.1073-1078, 2005.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.; JUSUF, S. S. D.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.70, n.11, p.5924–5930, 2002.

PAYNE, W. J.; MARSHALL, D. L.; SHOCKLEY, R. K.; MARTIN, W. J. Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n.3, p.313-329, 1998.

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

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, I. Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar canicola strain Moulton. **Microbiology and Immunology**, v.31, p.727–735, 1987.

SMITS, H. L.; EAPEN, C. K.; SUGATHAN, S.; KURIAKOSE, M.; GASEM, H.; YERSIN, C.; SASAKI, D.; PUJANTO, B.; VESTERING, M.; ABDOEL, T. H.; GUSSENHOVEN, G. C. Lateral-Flow Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.1, p.166-169, 2001.

SURUJBALLI, O.; ELMGREN, C.; Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.149-159, 2000.

VINH, T. B.; ADLER, B.; FAINE, S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Journal of General of Microbiology**, v.132, p.103-109, 1986.

YAN, K. T.; ELLIS, W. A.; MACKIE, D. P.; TAYLOR, M. J.; MCDOWELL, S. W. J.; MONTGOMERY, J. M.. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.173 -187, 1999.

World Health Organization. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta: WHO, 2003. 109p.

World Health Organization. **Leptospirosis: Laboratory Manual**. India, New Delhi: WHO, 2007. 69p.