

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico
de leptospirose canina**

Francine R. Philippsen

Pelotas, 2012

FRANCINE R. PHILIPPSEN

Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico de leptospirose canina

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador de Estágio: MSc. André Alex Grassmann

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

P551f Philippsen, Francine Rodrigues
Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico de leptospirose canina / Francine Rodrigues Philippsen. – 56f. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2013. – Orientador Alan John Alexander McBride; co-orientador André Alex Grassmann.

1. Biotecnologia. 2. Cães. 3. Leptospirose. 4. Diagnóstico. 5. LigBrep. I. McBride, Alan John Alexander. II. Grassmann, André Alex. I. III. Título.

CDD:636.7

BANCA EXAMINADORA

Dr. Daiane Hartwig, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcelo Mendonça, Universidade Federal de Pelotas

MSc. Samuel Félix, Universidade Federal de Pelotas

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Clóvis e Vera, à minha irmã Fabiana e à minha irmã de coração Roseli, pelo amor, apoio e pelos princípios ensinados que são o alicerce da minha formação pessoal. Em especial agradeço à minha mãe, meu modelo de determinação, honestidade e profissionalismo, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos;

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Alan John Alexander McBride, pela ampla dedicação, disponibilidade e atenção, e pelos importantes conhecimentos passados;

Ao orientador de estágio, André Alex Grassmann, pela dedicação, amizade e pela disponibilidade em sempre ajudar;

Aos colegas do LPDI, pelas contribuições nas atividades do laboratório, pela amizade e por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável;

Aos professores da biotecnologia, pelos ensinamentos passados e dedicação. Em especial ao professor Fabricio, por ter me concedido o primeiro estágio logo no início do curso e por ser um exemplo de profissionalismo e competência;

À primeira orientadora, Carla, pelo auxílio durante os primeiros passos na biotecnologia, pela introdução no meio de pesquisa e pela amizade;

Aos ex-colegas do Laboratório de Imunologia, pelos ensinamentos, amizade e incentivo;

Aos amigos, em especial Amanda, Caroline, Gabriela, Karina, Rafael e Wallace, por estarem sempre comigo e torcerem pelo meu sucesso;

Aos demais colegas e funcionários do Núcleo de Biotecnologia, pelo bom convívio e aprendizado;

Ao CNPq e FAPERGS pela concessão de bolsas de Iniciação Científica.

Resumo

PHILIPPSEN, Francine Rodrigues. **Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico de leptospirose canina**. 2012. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A leptospirose é uma grave doença infecciosa emergente causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, que afeta humanos e animais. Mais de 500.000 casos de leptospirose humana severa são reportados anualmente, com índices de fatalidade superiores a 10%. A leptospirose humana é comumente adquirida de uma fonte animal. Quase todos os mamíferos podem ser reservatórios da doença, incluindo animais domésticos, como cães, bovinos e suínos. Os cães são considerados a segunda principal fonte de infecção para o homem, em função de seu estreito contato com humanos. O teste de aglutinação microscópica (MAT), considerado o teste sorológico padrão para o diagnóstico da leptospirose, é laborioso e exige soros pareados. Além disso, emprega o uso de bactérias vivas, o que impõe dificuldade de padronização e representa um risco considerável para manipuladores. Há uma necessidade urgente de desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido, sensível e que possa ser empregado no diagnóstico laboratorial de rotina para a detecção da leptospirose canina. Neste trabalho, diversas proteínas recombinantes de *L. interrogans* foram avaliadas quanto ao potencial diagnóstico nos formatos de ensaio imunoenzimático (ELISA) e *dot blot*, utilizando um banco de soros caninos caracterizados por MAT e ELISA de antígeno bruto. Através de análises tipo *checkerboard*, as proteínas rLigBrep e rLipL32 demonstraram melhor desempenho e foram selecionadas para a análise de soros individuais. Na análise de soros individuais por ELISA-IgG, rLigBrep apresentou os melhores resultados, com sensibilidade 70% e especificidade de 100%, o que é considerado um desempenho promissor. No *dot blot* com soros individuais, rLigBrep apresentou sensibilidade de 82% e especificidade de 64% para o grupo de cães vacinados, porém a especificidade caiu para 25% com o grupo de animais não vacinados. Esses valores foram obtidos com um número limitado de soros e devem ser validados com um número maior. Existem limitações nos resultados de ambos os testes, as condições de utilização desses antígenos ainda necessitam aprimoramento.

Palavras-chave: Leptospirose. Diagnóstico. Leptospirose canina. LigBrep. LipL32

Abstract

PHILIPPSEN, Francine Rodrigues. **Fase inicial do desenvolvimento de um teste diagnóstico de leptospirose canina**. 2012. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leptospirosis is a serious infectious disease caused by pathogenic species of the *Leptospira* genus, which affects humans and animals. More than 500,000 cases of severe leptospirosis are reported each year, with fatality rates exceeding 10%. Human leptospirosis is commonly acquired from an animal source. Almost every mammal worldwide has been shown to be a carrier of leptospires, including domestic animals, mainly as dogs, cattle and swine. Dogs are considered to be the second most important source of infection for humans, due to their close contact with them. The microscopic agglutination test (MAT), the standard test for the diagnosis of leptospirosis, is laborious and requires paired serum samples. Moreover, this test uses live leptospires as antigens, imposing difficulty in antigen standardization and represents a potential risk to laboratory personnel. There is an urgent need to develop a rapid and sensitive diagnostic test that can be used for routine laboratory diagnosis to detect canine leptospirosis. In this work, several recombinant proteins from *L. interrogans* were evaluated for diagnostic potential in ELISA and dot blot formats, using a canine serum bank previously characterized by MAT and whole-cell ELISA. Following checkerboard analysis, the rLigBrep and rLipL32 performed better and were selected for further analysis using individual sera. The analysis of individual sera by ELISA-IgG, rLigBrep showed promising results, 70% sensitivity and 100% specificity. In the dot blot using individual sera, rLigBrep had a sensitivity of 82% and specificity of 64% for the group of vaccinated dogs, but the specificity decreased to 25% with sera from the group of unvaccinated animals. These results were obtained with a limited number of sera and should be validated with a larger number of serum samples. There are limitations in the results of both tests, and the conditions for use of these antigens still need improvement.

Keywords: Leptospirosis. Diagnosis. Canine leptospirosis. LigBrep. LipL32

Lista de Figuras

Figura 1. Seleção de antígenos recombinantes por SDS-PAGE.....	33
Figura 2. Análise de pureza das proteínas recombinantes produzidas.	34
Figura 3. Caracterização de antígenos por <i>Western blot</i> com <i>pool</i> de soros caninos.	34
Figura 4. rLipL32-ELISA tipo <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e anti-IgG:HRP	35
Figura 5. rLigBrep-ELISA tipo <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e <i>pool</i> negativo	36
Figura 6. rLipL32-ELISA tipo <i>checkerboard</i> com <i>pool</i> positivo e <i>pool</i> negativo.....	36
Figura 7. Desempenho de rLigBrep frente a soros individuais	37
Figura 8. Desempenho de rLipL32 frente a soros individuais.....	38
Figura 9. <i>Dot blot</i> tipo <i>checkerboard</i> para nove diferentes antígenos recombinantes	39
Figura 10. <i>Dot blot</i> tipo <i>checkerboard</i> para rLigBrep e rLipL32 com anti-IgG:AP	40
Figura 11. <i>Dot blot</i> tipo <i>checkerboard</i> para rLigBrep e rLipL32 com anti-IgM:HRP ...	40
Figura 12. Análise de soros individuais por <i>dot blot</i> , com os antígenos rLigBrep e rLipL32	41

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Antígenos disponíveis para avaliação.	32
Tabela 2 – Classificação das reações obtidas com rLigBrep para soros individuais.	42

Lista de Abreviaturas e Siglas

aa - Aminoácido

Abs – Absorbância

BSA – Albumina Sérica Bovina

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças, EUA

ECM – Matriz extracelular

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EMJH – Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

Lig – *Leptospiral Immunoglobulin-like*

LPS – Lipopolissacarídeo

MAT – Teste de Microaglutinação

OMP – Proteína de membrana externa (*Outer Membrane Protein*)

SPHG – Síndrome Pulmonar Hemorrágica Grave

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Etiologia e Epidemiologia	15
2.2 Microbiologia, Genoma e Taxonomia	16
2.3 Transmissão	18
2.4 Manifestações Clínicas	20
2.5 Patogênese	21
2.6 Tratamento e Controle	22
2.7 Diagnóstico Laboratorial	24
2.7.1 Isolamento da Bactéria	24
2.7.2 Testes Sorológicos	24
2.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	277
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	29
4.1 Metodologia	29
4.1.1 Banco de Soros Caninos	29
4.1.2 Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes	29
4.1.3 <i>Western Blot</i>	29
4.1.4 Protocolo padrão para execução dos ELISAs.....	30
4.1.5 Protocolo padrão para execução dos <i>dot blots</i>	30
4.2 Resultados.....	31
4.2.1 Seleção inicial de antígenos	31
4.2.2 Expressão e Purificação de Proteínas	33
4.2.3 <i>Western Blot</i>	34
4.2.4 Desenvolvimento do ELISA	35
4.2.5 Desenvolvimento do <i>dot blot</i>	38
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose, uma zoonose de distribuição global, é hoje reconhecida como uma grave doença infecciosa negligenciada (VIJAYACHARI et al., 2008). O maior impacto da doença ocorre entre populações empobrecidas de países em desenvolvimento e regiões tropicais, onde a inadequação das instalações sanitárias e períodos de enchente constantes favorecem a transmissão da doença (MCBRIDE et al., 2005). Em países desenvolvidos, a leptospirose é considerada uma doença primariamente ocupacional (KO et al., 2009). Mundialmente são reportados mais de 500.000 casos severos por ano, com índices de mortalidade excedendo 10% (WHO, 1999; PAPPAS et al., 2008; WHO, 2011).

A doença é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, o qual também inclui espécies saprófitas (LEVETT, 2001). A leptospirose humana é geralmente contraída pelo contato direto com animais reservatórios ou indireto, através de água ou solo contaminado com a urina desses animais. Dentre os reservatórios, o rato é destacado como o principal transmissor da leptospirose para humanos, principalmente no ambiente urbano (FAINE et al., 1999). Entretanto, os cães também são importantes reservatórios (LEVETT, 2001; WHO e ILS, 2003; BROWN e PRESCOTT, 2008), sendo considerados como a segunda principal fonte de infecção para o homem, já que vivem em estreito contato com humanos (BROD et al., 2005). Atualmente, não há um método de prevenção eficaz para a leptospirose. As vacinas disponíveis para uso veterinário induzem uma proteção de curta duração e sorovar-específica (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A ausência de um diagnóstico laboratorial adequado é a principal barreira para a implementação de medidas de saúde pública apropriadas para leptospirose humana e animal (MCBRIDE et al., 2005). A antibioticoterapia, quando iniciada precocemente, pode reduzir os sintomas e duração da doença (GRIFFITH et al., 2006; SUPUTTAMONGKOL et al., 2010; SYKES et al., 2011) porém, os testes disponíveis atualmente não apresentam sensibilidade adequada para a detecção da leptospirose em fase inicial (MCBRIDE et al., 2005; GOLDSTEIN, 2010). O MAT é considerado o teste de referência no diagnóstico de leptospirose, contudo, é um teste complexo de controlar, executar e interpretar (LEVETT, 2001). Embora o teste tenha bom desempenho com soros pareados, a sensibilidade do teste cai

drasticamente para a detecção da doença na fase aguda. Assim, o resultado do teste tem pouco ou nenhum impacto no tratamento do paciente humano ou animal (MCBRIDE et al., 2005). Os ensaios sorológicos baseados em antígeno bruto disponíveis, apenas para diagnóstico humano, também apresentam baixa sensibilidade durante a fase aguda (BAJANI et al., 2003; MCBRIDE et al., 2007).

Uma necessidade crítica na abordagem da leptospirose canina é um teste diagnóstico que identifique os animais positivos durante a fase inicial da doença e que forneça resultados rápidos. Dessa forma, médicos veterinários têm a possibilidade de tomar decisões efetivas quanto à terapia e manejo, trazendo diversos benefícios tanto para animais como para a saúde pública (HARTSKEERL et al., 2011). O uso de proteínas recombinantes em testes sorológicos rápidos ou no formato ELISA permite uma análise mais específica, uma vez que os antígenos recombinantes são purificados. Ainda, através destes testes, podem ser avaliados um grande número de soros de maneira rápida.

Este trabalho representa a fase inicial de desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose canina, utilizando proteínas recombinantes. Através da utilização de um banco de soros caninos já caracterizados, dez proteínas recombinantes de *L. interrogans* foram analisadas quanto ao potencial de uso em diagnóstico nos formatos ELISA e *dot blot*. Este último formato visando, futuramente, o desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia e Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global, reconhecida hoje como uma doença infecciosa emergente (BHARTI et al., 2003; VIJAYACHARI et al., 2008). Registros de surtos na Nicarágua (TREVEJO et al., 1998), Brasil (KO et al., 1999; SOUZA et al., 2011), sudeste da Ásia (TANGKANAKUL et al., 2000), Estados Unidos (MORGAN et al., 2002; STERN et al., 2010) e Índia (SHARMA et al., 2006), bem como o surgimento de uma forma clínica mais letal, a síndrome hemorrágica pulmonar grave (SEGURA et al., 2005; GOUVEIA et al., 2008) contribuíram para o alerta em torno da doença. Trata-se de uma doença negligenciada, que afeta

principalmente populações pobres de países em desenvolvimento e regiões tropicais (MCBRIDE et al., 2005). É uma doença endêmica em moradores de zonas rurais, expostos a ambientes contaminados com urina de reservatórios animais domésticos e selvagens. Além disso, a leptospirose é um grande problema nas favelas, onde a falta de saneamento básico cria condições para a transmissão da doença por meio de roedores (JOHNSON et al., 2004; RILEY et al., 2007; REIS et al., 2008).

No Brasil, mais de 10.000 casos de leptospirose são confirmados anualmente, com surtos surgindo durante os períodos de enchentes (MCBRIDE et al., 2005; SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Mundialmente são reportados mais de 500.000 casos severos por ano, com índices de mortalidade excedendo 10% (WHO, 1999; PAPPAS et al., 2008; WHO, 2011). Sabe-se, porém, que esses números são subestimados. Frequentemente os sintomas leves não são detectados ou são atribuídos a outras doenças (KO et al., 1999; LEVETT, 2001). Além disso, a qualidade e disponibilidade de testes de diagnósticos, bem como de laboratórios de diagnóstico especializados e sistemas de vigilância, variam amplamente entre países e muitas vezes estão ausentes (HARTSKEERL et al., 2011). Em países desenvolvidos a leptospirose se apresenta principalmente como uma doença ocupacional, que afeta fazendeiros, funcionários de abatedouros, veterinários, mineradores, entre outros (MCBRIDE et al., 2005). Nos últimos anos, porém, surtos durante eventos esportivos, atividades recreativas, turismo de aventura e desastres naturais, ressaltam a capacidade da leptospirose tornar-se um problema público de saúde em cenários não tradicionais (KO et al., 2009).

A leptospirose também é um problema para a saúde animal, causando impacto econômico principalmente por acarretar falhas reprodutivas. Normalmente a leptospirose animal não é monitorada regularmente, já que a vigilância só é feita rotineiramente para doenças endêmicas para as quais existem programas de controle (HARTSKEERL et al., 2011).

2.2 Microbiologia, Genoma e Taxonomia

As leptospiras são bactérias da ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*, o qual compreende tanto espécies patogênicas quanto

saprófitas. Leptospiras possuem cerca de 0,1 µm de diâmetro e 6-20 µm de comprimento, são altamente móveis e possuem extremidades características em forma de gancho (FAINE et al., 1999). Seu metabolismo é aeróbio obrigatório, com uma temperatura ótima de crescimento entre 28 e 30°C (LI et al., 2000; EVANGELISTA e COBURN, 2010). Crescem em meio enriquecido com vitaminas B1 e B12, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio (FAINE et al., 1999). Há descrição de crescimento de leptospiras em meios contendo tanto soro ou albumina com polissorbato quanto em meios sintéticos isentos de proteína. Atualmente, o meio líquido mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), baseado em ácido oléico, polissorbato (Tween) e albumina de soro bovino (BSA). Além do meio líquido, são utilizados o meio semissólido e o meio sólido, o qual tem o acréscimo de ágar, empregados, respectivamente, para a manutenção por períodos mais prolongados de cultura (de 15 a 30 dias) e para isolamento de colônias (FAINE et al., 1999; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras possuem uma estrutura de dupla membrana comum em bactérias Gram-negativas, cuja membrana externa possui grande quantidade de proteínas e lipopolissacarídeo (LPS) (BHARTI et al., 2003; VIJAYACHARI et al., 2008). O LPS associado à membrana externa é o principal responsável pela variabilidade de sorovares. Na membrana também estão associadas diferentes lipoproteínas, como LipL32 (HAAKE et al., 2000), LipL41 (SHANG et al., 1996) e as proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*) (MATSUNAGA et al., 2003). No espaço periplasmático, há uma camada de peptidoglicano associado à membrana interna, e dois endoflagelos ou filamentos axiais com inserções polares, responsáveis pela alta motilidade da bactéria (BHARTI et al., 2003; WOLGEMUTH et al., 2006; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Até 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies, *L. interrogans*, que compreendia todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa*, que incluía todas as cepas não patogênicas. Pela classificação atual, baseada em análise de hibridização de DNA, o gênero *Leptospira* inclui nove espécies patogênicas, cinco espécies intermediárias e seis saprófitas (SMYTHE et al., 2012). Existe uma segunda classificação, sorológica, baseada na heterogeneidade estrutural do componente carboidrato do LPS, que categoriza todas as espécies em cerca de 300 sorovares (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Por conveniência, os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos. A classificação em sorogrupos e sorovares não indica relação taxonômica entre as cepas, já que um sorovar (definido por anticorpos contra seu antígeno LPS) pode pertencer a mais de uma espécie e membros do mesmo grupo genético não necessariamente pertencem ao mesmo sorogrupo (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2003). Embora não tenha valor taxonômico, a sorotipagem de leptospiros é importante para investigações clínicas e epidemiológicas, fornecendo pistas dos reservatórios animais envolvidos na transmissão do patógeno (LEVETT, 2001; KO et al., 2009).

Grandes avanços no entendimento de *Leptospira* spp. e de seus mecanismos de patogenicidade têm sido possíveis em função do recente sequenciamento de cinco espécies de *Leptospira*. Foram sequenciados os genomas de três espécies patogênicas, *L. interrogans* (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004), *L. borgpetersenii* (BULACH et al., 2006) e *L. santarosai* (CHOU et al., 2012), uma espécie patogênica intermediária, *L. licerasiae* (RICALDI et al., 2012), e uma espécie saprófita, *L. biflexa* (PICARDEAU et al., 2008). O genoma das leptospiros é caracterizado por um conteúdo G+C de 35-41,8% dependendo da espécie, com um tamanho de 3,9-4,6 Mb (NASCIMENTO et al., 2004; BULACH et al., 2006; PICARDEAU et al., 2008; CHOU et al., 2012; RICALDI et al., 2012). As espécies patogênicas possuem dois cromossomos circulares (CI e CII), enquanto que a espécie saprófita possui um terceiro *replicon* com apenas 74kb, denominado de p74 (PICARDEAU et al., 2008). Uma análise comparativa entre oito genomas de *Leptospira* spp. demonstrou a existência de um *core* do genoma leptospiral compreendendo 1547 genes, além de 452 genes conservados restritos a espécies patogênicas (incluindo *L. licerasiae*), e que provavelmente estão relacionados à patogenicidade (RICALDI et al., 2012).

2.3 Transmissão

Os animais podem ser divididos em hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais. Os sorovares de *Leptospira* spp. apresentam preferências específicas, porém não exclusivas, de hospedeiros. Os ratos, por exemplo, são hospedeiros de manutenção do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (BHARTI et al.,

2003). Os sorovares geralmente causam uma infecção crônica e assintomática em seus animais reservatórios, para os quais estão altamente adaptados, mas causam a doença em hospedeiros acidentais (KO et al., 2009). Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, embora estudos recentes demonstrem que podem desenvolver leptospirúria assintomática em ambientes com elevada transmissão de leptospirose (GANOZA et al., 2010).

A doença é mantida na natureza pela infecção crônica dos túbulos renais dos hospedeiros. Quase todos os mamíferos podem ser portadores, incluindo animais de rebanho, domésticos e selvagens. As leptospiras são excretadas na urina dos animais reservatórios para o meio ambiente, onde podem sobreviver por períodos prolongados (CHANG et al., 1948; SMITH e SELF, 1955; KARASEVA et al., 1973). A infecção ocorre diretamente pela exposição de mucosas ou pele lesada à urina ou material biológico contaminado ou, ainda, indiretamente, pela exposição a ambientes contaminados com urina de animais infectados, como água, solo e alimentos (HARTSKEERL et al., 2011). A transmissão entre os hospedeiros de manutenção geralmente ocorre por contato direto (LEVETT, 2001).

No Brasil, a maioria dos casos urbanos é devido à infecção pelo sorovar Copenhageni, o qual é associado ao reservatório *Rattus norvegicus*, o rato doméstico (KO et al., 1999; ROMERO et al., 2003; DIAS et al., 2007; REIS et al., 2008). Em geral, o rato é considerado o principal reservatório responsável pela transmissão da leptospirose no ambiente urbano (VINETZ et al., 1996; FAINE et al., 1999; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Porém, os cães também são reservatórios importantes (LEVETT, 2001; WHO e ILS, 2003; BROWN e PRESCOTT, 2008), sendo considerados a segunda principal fonte de infecção para o homem (BROD et al., 2005). A importância dos cães como reservatórios se deve ao estreito contato entre esses animais e humanos e pela capacidade dos cães de eliminar leptospiras na urina durante vários meses mesmo sem apresentar sinais clínicos e, em alguns casos, mesmo sendo vacinados. A transmissão do sorovar Icterohaemorrhagiae de cães imunizados para humanos já foi reportada (FEIGIN et al., 1973; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Ainda, cães vacinados podem ser portadores de outros sorovares que não aqueles presentes na vacina comercial (PRESCOTT, 2008). Deste modo, faz-se necessária uma constante

vigilância epidemiológica para que sorovares prevalentes em uma região sejam inclusos na vacina.

2.4 Manifestações Clínicas

A leptospirose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, muitas das quais são similares as de outras doenças, como gripe, hepatite, dengue, febre amarela, malária, brucelose, borreliose, entre outras. Por isso, muitas vezes é diagnosticada como outra doença, contribuindo para sua negligência (KO et al., 1999; LEVETT, 2001; HARTSKEERL et al., 2011). Os sintomas da doença variam de brandos a graves, potencialmente fatais, dependendo de fatores como o sorovar infectante, imunidade do hospedeiro e dose infectante (MCBRIDE et al., 2005). O período de incubação normalmente é de 7-14 dias, podendo variar de 2-30 dias (FAINE et al., 1999). Estima-se que cerca de 90% das infecções por *Leptospira* spp. são subclínicas ou resultam em doença febril branda e autolimitada (LEVETT, 2001). Na doença branda ou anictérica, os sintomas mais comuns são febre, cefaleia e mialgia, os quais podem ser acompanhados por outros sintomas não específicos como náusea e vômito, diarreia e tosse não produtiva (RICALDI e VINETZ, 2006).

Contudo, uma menor proporção dos casos desenvolve várias complicações em função do envolvimento de múltiplos órgãos. As manifestações severas da leptospirose incluem qualquer combinação de icterícia, insuficiência renal, hemorragia (principalmente pulmonar), miocardite e hipotensão refratária à reposição volêmica. Outras complicações são meningite asséptica e envolvimento ocular, incluindo uveíte (RICALDI e VINETZ, 2006). A leptospirose humana severa é caracteristicamente vista em infecções pelos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai e outros. As fontes de infecção são geralmente ratos e outros roedores (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Dois quadros graves da doença se destacam: a doença de Weil, caracterizada por icterícia, disfunção renal, hemorragia e esplenomegalia, com taxa de fatalidade acima de 10%; e a síndrome pulmonar hemorrágica grave associada à leptospirose caracterizada por pneumonite e sangramento pulmonar maciço, com fatalidade superior a 50% (SEGURA et al., 2005; GOUVEIA et al., 2008).

Em cães foram identificadas quatro síndromes: icterica, hemorrágica, urêmica (Doença de Stuttgart) e reprodutiva (aborto e filhotes prematuros ou fracos). Tipicamente a leptospirose em cães se apresenta com febre, icterícia, vômito, diarreia, fraqueza muscular, desidratação, coagulação intravascular disseminada, uremia causada por falência renal, hemorragias e morte (VAN DE MAELE et al., 2008; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Em bovinos e suínos, os sinais de leptospirose incluem falha reprodutiva, aborto, natimortos, mumificação fetal, leitões ou bezerros fracos e agalactia (ELLIS, 1984; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Em equinos, além de manifestações reprodutivas, a leptospirose frequentemente gera uma manifestação crônica, a Uveíte Recorrente Equina (URE), uma das causas mais comuns de cegueira nessa espécie (GILGER e MICHAU, 2004). A uveíte recorrente, contudo, não ocorre exclusivamente em equinos e pode ocorrer ocasionalmente em humanos (RATHINAM, 2005).

2.5 Patogênese

As leptospirosas penetram a pele lesada e membranas mucosas, rapidamente se multiplicam no sangue (leptospiremia) e estabelecem uma infecção sistêmica, através do cruzamento de barreiras teciduais e por disseminação hematogênica (FAINE et al., 1999; KO et al., 1999). Embora sejam consideradas patógenos extracelulares, as leptospirosas virulentas são capazes de aderir e invadir células do hospedeiro *in vitro* (LIU et al., 2007) e de translocar rapidamente através de monocamadas polarizadas de células MDCK (BAROCCHI et al., 2002). Dessa forma, alguns autores especulam que a bactéria possa ter uma fase curta intracelular, provavelmente atuando na evasão do sistema complemento e de anticorpos (LI et al., 2010).

As leptospirosas possuem mecanismos que as permitem evadir o sistema imune inato durante a fase inicial da infecção. O recrutamento do Fator H para a superfície bacteriana, mediado por proteínas LenA e LenB (STEVENSON et al., 2007), ou de C4BP, mediado por LcpA (BARBOSA et al., 2010), promove um efeito inibitório e evasão do sistema complemento (FRAGA et al., 2011). Recentemente foi demonstrado que a proteína LigB é capaz de ligar reguladores do complemento, possivelmente atuando juntamente com LenA, LenB e LcpA na evasão do sistema

complemento (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY, 2012). Além disso, diversos possíveis mecanismos envolvidos na capacidade das leptospiros de sobreviver e colonizar os rins foram sugeridos, como a quantidade aumentada de antígeno O no LPS em rins cronicamente infectados (NALLY et al., 2005), redução da expressão de proteínas antigênicas (MONAHAN et al., 2008) e formação de biofilmes (RISTOW et al., 2008).

2.6 Tratamento e Controle

O tratamento da leptospirose é baseado em antibioticoterapia e medidas de suporte direcionadas aos órgãos acometidos, principalmente pulmões e rins (BHARTI et al., 2003). O papel da antibioticoterapia no tratamento da leptospirose humana é controverso (DAHER e NOGUEIRA, 2000; COSTA et al., 2003). Contudo, vários relatos de caso apontam uma redução na duração da doença quando uma antibioticoterapia adequada é realizada durante a fase inicial (dentro de 2-4 dias) (GRIFFITH et al., 2006; PAPPAS e CASCIO, 2006; SUPUTTAMONGKOL et al., 2010). Em pacientes com doença severa, a administração tardia também resultou em eficiência clínica e redução da mortalidade (WATT et al., 1988). A Organização Mundial da Saúde recomenda o tratamento com antibióticos aos pacientes humanos assim que houver suspeita de leptospirose, preferencialmente até o quinto dia após o início da doença. Casos severos devem ser tratados com altas doses de penicilina intravenosa e casos menos severos podem ser tratados com antibióticos orais, como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina ou eritromicina. Cefalosporinas de terceira geração, tais como ceftriaxona e cefotaxima, e quinolonas também parecem ser eficazes (WHO e ILS, 2003).

Em função de sua epidemiologia complexa, o controle da leptospirose se torna complicado e dependente das condições locais. Em geral, prevenção e controle devem ser direcionados à fonte de infecção, à via de transmissão entre a fonte de infecção e o hospedeiro humano ou à infecção humana. O controle da fonte de infecção pode ser feito pela identificação e controle das espécies animais responsáveis pelas infecções em determinada área. Essa medida é bastante complexa, já que existem muitas espécies reservatório e algumas populações, como as de roedores, são numerosas. Outra medida mais simples é a imunização de cães

e animais de criação. A interrupção da transmissão ocorre evitando contato com animais infectados, sua urina ou, ainda, ambientes contaminados. Dessa maneira, a melhoria das condições de higiene são de extrema importância. Quando apropriado, devem ser utilizadas vestimentas de proteção, como luvas, botas e óculos (WHO e ILS, 2003; HARTSKEERL et al., 2011).

As vacinas podem ser usadas como uma medida de prevenção, através da imunização de seres humanos ou dos animais reservatórios. Contudo, as vacinas existentes atualmente contra leptospirose são bacterinas compostas por um painel limitado de sorovares locais, as quais conferem uma proteção de curta duração e sorovar-específica, além de haver efeitos colaterais (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). A necessidade de inclusão de sorovares locais foi evidenciada em Cuba na década de 1990, quando um surto nacional provocado pelo sorovar Ballum obrigou a reformulação da vacina cubana para a inclusão desse sorovar (MARTINEZ et al., 2004). Em função dessas limitações, a vacina humana só é liberada em alguns países, como China, Japão, Cuba, França e Rússia (DELLAGOSTIN et al., 2011; HARTSKEERL et al., 2011).

A vacina veterinária, por outro lado, é utilizada globalmente em cães, bovinos e suínos, sendo parcialmente eficaz, em função da imunidade restrita aos sorovares da vacina e a potencial presença de sorovares locais não inclusos na vacina. Ainda, em alguns casos, a vacina pode ser capaz de proteger os animais contra a doença, porém não impede a leptospirose e consequente transmissão ao homem (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Um programa de vacinação adequado requer estudos epidemiológicos constantes a fim de avaliar os diferentes sorovares presentes em uma determinada população (BHARTI et al., 2003). Nos Estados Unidos, por exemplo, recentemente foram inclusos na vacina canina os sorovares Pomona e Grippityphosa, além dos habituais Canicola e Icterohaemorrhagiae, em função da crescente incidência de infecções caninas com estes sorovares (GOLDSTEIN, 2010; SYKES et al., 2011).

2.7 Diagnóstico Laboratorial

Um pré-requisito para o controle de doenças infecciosas é a disponibilidade de testes de diagnóstico confiáveis, sensíveis, de baixo custo e fácil execução (HARTSKEERL et al., 2011). Atualmente, nenhum dos testes disponíveis para o diagnóstico de leptospirose preenche adequadamente todos esses requisitos. Ainda, a seleção correta do tipo de amostra, execução e interpretação correta dos resultados dos testes são fundamentais. Os diferentes métodos utilizados em laboratório são classificados amplamente em bacteriológico, microscópico, sorológico e molecular (BHARTI et al., 2003). As técnicas mais comumente utilizadas são descritas abaixo.

2.7.1 Isolamento da Bactéria

A detecção de leptospiras através de cultivo consiste em um diagnóstico definitivo. Leptospiras podem ser isoladas de sangue e líquido cefalorraquidiano durante os primeiros 7-10 dias de doença, e de urina durante a segunda e terceira semana (BHARTI et al., 2003). O isolamento requer que as amostras sejam recentes e coletadas preferencialmente antes do tratamento com antibiótico. Dependendo do nível de contaminação utiliza-se 5-fluorouracil ou outros agentes antimicrobianos seletivos para inibir contaminantes (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). O cultivo deve ser incubado por pelo menos 13 semanas a 28-30 °C, com verificações semanais em microscopia de campo escuro para que as culturas possam ser consideradas negativas. Por isso, o cultivo não é útil como teste de rotina no diagnóstico de pacientes individuais, porém é muito importante para propósitos epidemiológicos (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

2.7.2 Testes Sorológicos

O teste mais utilizado e de referência para o diagnóstico sorológico de leptospirose, tanto humana quanto animal, é o MAT. Nesse teste, o soro do paciente é misturado com suspensões de leptospiras vivas de diferentes sorovares individualmente. A reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro do paciente e o antígeno O do LPS das bactérias é observada ao microscópio e são determinados os títulos de diluição do soro ainda com aglutinação de pelo menos 50% das bactérias (LEVETT, 2001). O critério para considerar o resultado indicativo

de infecção atual varia. O CDC recomenda a utilização de um título ≥ 200 para definir um provável caso, com uma doença clinicamente compatível (CDC, 1997). Em áreas onde a leptospirose é endêmica, um título único ≥ 800 em pacientes sintomáticos é considerado indicativo de leptospirose (KO et al., 1999). Um aumento de quatro vezes ou mais no título entre soros pareados confirma o diagnóstico, independentemente do intervalo de tempo entre as amostras (LEVETT, 2001).

Embora tenha sensibilidade superior a 92% e especificidade superior a 95% com soros pareados, esses valores caem drasticamente para a detecção da doença na fase aguda (MCBRIDE et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2007). Assim, o resultado do teste tem pouco ou nenhum impacto no tratamento do paciente, já que há necessidade de coleta de uma amostra de soro durante a segunda semana da doença. Ainda, o diagnóstico de leptospirose animal é afetado pela dificuldade do MAT em discriminar anticorpos resultantes de infecção ou vacinação, resultando em falsos-positivos (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O MAT é um teste complexo de controlar, executar e interpretar, havendo muita variação dos resultados entre laboratórios. A gama de antígenos utilizados deve incluir sorovares representativos de todos os sorogrupos e de todos os sorovares localmente presentes. Culturas vivas de todos os sorovares inclusos no teste devem ser mantidas, necessitando verificação periódica e oferecendo riscos aos manipuladores (LEVETT, 2001). Ressalta-se ainda que o MAT é considerado um teste sorogrupo-específico, podendo indicar os sorogrupos prevalentes em uma população. Porém, apesar de ser usado na predição do sorovar infectante de casos individuais, estudos indicam que o MAT não é suficientemente sensível para tal finalidade (LEVETT, 2003).

Outros testes sorológicos que utilizam antígenos de célula inteira estão comercialmente disponíveis, primariamente ensaios de detecção de IgM. A maior parte utiliza extratos brutos de células inteiras lisadas como antígeno em testes de ELISA ou em formatos rápidos como *dot blot*, *dipstick*, *Western blot*, *lateral flow* e aglutinação em látex. Avaliações amplas desses testes encontraram sensibilidade variando de 28-72% para fase aguda e 75-94% para fase convalescente e especificidade de 10-99% (WINSLOW et al., 1997; SMITS et al., 1999; SMITS et al., 2000; LEVETT et al., 2001; EFFLER et al., 2002; LEVETT e BRANCH, 2002;

VIJAYACHARI et al., 2002; BAJANI et al., 2003; SEHGAL et al., 2003; HULL-JACKSON et al., 2006; MCBRIDE et al., 2007). O desempenho varia significativamente entre regiões geográficas, enfatizando a necessidade de validação desses testes para diferentes situações epidemiológicas (MCBRIDE et al., 2007).

Testes sorológicos utilizando proteínas recombinantes são amplamente utilizados para o diagnóstico de outras infecções por espiroquetas, como doença de Lyme e sífilis. Sabe-se que pacientes com leptospirose apresentam uma resposta robusta de anticorpos contra proteínas de *Leptospira* spp. no início da infecção (GUERREIRO et al., 2001). Ainda, estudos recentes têm permitido identificar novas proteínas de membrana externa (OMPs) e lipoproteínas (CULLEN et al., 2005; PINNE e HAAKE, 2009; PINNE et al., 2012), um passo essencial para a busca de antígenos para desenvolvimento de um teste diagnóstico. Algumas destas proteínas, como LipL36, LipL42, LipL32, GroEL, Loa22, família das proteínas Len e Lig, têm sido testadas em diferentes formatos de testes sorológicos, alguns com resultados promissores (ADLER et al., 2011).

As proteínas de superfície da família Lig (LigA, LigB e LigC) (MATSUNAGA et al., 2003) têm se mostrado candidatos promissores para diagnóstico. Os genes *lig* possuem regiões altamente conservadas e estão presentes apenas em leptospiros patogênicas (CERQUEIRA et al., 2009; MCBRIDE et al., 2009). As proteínas Lig são expressas durante a infecção do hospedeiro e induzem alta resposta imune tanto em humanos quanto animais. Comparado com outros antígenos, como LipL32, LipL41 e GroEL, uma porção da proteína LigB demonstrou um desempenho superior para a detecção de pacientes com leptospirose em fase aguda (CRODA et al., 2007). Recentemente, um teste do tipo *Dual Path Platform* (DPP) utilizando antígenos Lig recombinantes para aplicação no diagnóstico rápido (*point-of-care*) de leptospirose humana, obteve sensibilidade similar ao teste IgM-ELISA (NABITY et al., 2012).

A lipoproteína LipL32, o antígeno mais abundante e imunodominante no perfil de proteínas das leptospiros, é altamente conservada em espécies patogênicas e ausente em espécies saprófitas (HAAKE et al., 2004), além de ser um alvo de resposta imune durante infecção natural por leptospiros (HAAKE, 2000; HAAKE e MATSUNAGA, 2010). A utilidade dessa proteína já foi reportada em diversos

ensaios sorológicos, para a detecção de leptospirose humana (FLANNERY et al., 2001; DEY et al., 2007a; DEY et al., 2008; CHALAYON et al., 2011), bovina (Bomfim et al., 2005) e canina (DEY et al., 2004; DEY et al., 2007a; DEY et al., 2007b; ABDOEL et al., 2011), com sensibilidades e especificidades entre 90 e 100% em fase convalescente ou em soros com título no MAT \geq 100. Porém, sensibilidades de 56% são reportadas para detecção na fase aguda em humanos (FLANNERY et al., 2001).

2.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Vários protocolos de PCR para amplificação de DNA de leptospiras a partir de diferentes amostras clínicas foram descritos, a maior parte obtendo alta sensibilidade (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Contudo, dois protocolos ganharam maior aceitação e foram difundidos em função de extensiva avaliação em estudos clínicos (BROWN et al., 1995; MERIEN et al., 1995). Apesar disso, ambos os protocolos têm limitações. Os *primers* descritos por MERIEN e colaboradores (1992), amplificam um fragmento de 331pb do rRNA 16S presente tanto em leptospiras patogênicas quanto saprófitas, o que poderia produzir um resultado falso-positivo. O protocolo descrito por GRAVEKAMP e colaboradores (1993) e avaliado por Brown et al. (1995) necessita a utilização de dois pares de *primers* para a detecção de todos os sorovares patogênicos. Um aumento de sensibilidade tem sido obtido através de PCR em tempo real, utilizando sondas TaqMan (STODDARD et al., 2009) ou SYBR Green (AHMED et al., 2009). No diagnóstico de leptospirose canina a PCR já é empregada, porém com cautela. Atualmente há pouca informação com respeito à validade do teste, à sensibilidade e especificidade. Deste modo, os resultados devem sempre ser interpretados em conjunto com outros métodos de diagnóstico, como o MAT (SYKES et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação de diferentes abordagens para utilização de proteínas recombinantes de *L. interrogans* no desenvolvimento de um teste diagnóstico para leptospirose canina.

3.2 Objetivos Específicos

- Expressão e purificação de antígenos de *L. interrogans*.
- Avaliação de antígenos recombinantes de *L. interrogans* em dois formatos de teste diagnóstico (ELISA e *dot blot*) utilizando um banco de soros caninos caracterizado por MAT e ELISA de antígeno bruto.
- Determinar, por *checkerboard*, as melhores concentrações de antígeno, soro canino e anticorpo anti-IgG e anti-IgM para utilização no formato ELISA.
- Determinar, por *checkerboard*, as melhores concentrações de antígeno, soro canino e anticorpo anti-IgG e anti-IgM para utilização no formato *dot blot*.
- Selecionar antígenos para avaliação de soros individuais positivos e negativos para leptospirose por ELISA e *dot blot*.

4. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

4.1 Metodologia

4.1.1 Banco de Soros Caninos

Uma colaboração entre a Fiocruz-BA e o Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Salvador permitiu a obtenção de um banco de soros caninos caracterizados por MAT e ELISA de antígeno bruto. O banco é composto de soros pertencentes a cães de área endêmica para leptospirose e compreende tanto animais vacinados quanto não vacinados. O MAT foi realizado utilizando 11 sorovares de *Leptospira* spp: Autumnalis, Ballum, Bataviae, Copenhageni, Canicola, Grippotyphosa, Hardjobovis, Hebdomadis, Javanica, Pomona e Panama. Títulos maiores que 50 foram considerados evidência de exposição prévia. O ELISA utilizou *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni como antígeno e a detecção foi realizada com anticorpo anti-IgG.

4.1.2 Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes

As proteínas recombinantes empregadas neste trabalho foram produzidas previamente utilizando o sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*, conforme descrito anteriormente e indicado na Tabela 1. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida foram dialisadas e concentradas em polietilenoglicol (PEG) e, por fim, quantificadas através do kit *BCA Protein Assay* (PIERCE), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, e em SDS-PAGE pela comparação de uma curva de BSA com as proteínas recombinantes. As proteínas quantificadas foram aliquotadas e armazenadas a -20 °C.

4.1.3 Western Blot

Os antígenos recombinantes foram submetidos a SDS-PAGE (2µg de cada antígeno) e em seguida eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose através do sistema *iBlot Dry Blotting System* (Invitrogen). As membranas foram incubadas com solução de bloqueio (solução tampão salina-fosfato com 0,05% de Tween 20, o PBS-T, com 5% [p/v] de leite em pó desnatado) por 16h a 4 °C. As membranas

foram lavadas três vezes com PBS-T entre cada uma das etapas. Após lavagem, as membranas foram incubadas com pool de soros caninos positivos ou com pool de soros negativos, na diluição 1:200, durante 1h, à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas e em seguida incubadas com anticorpo anti-IgG canino conjugado com fosfatase alcalina (Rockland) (anti-IgG:AP) na diluição 1:1000 por 1h, à temperatura ambiente, sob agitação. Novamente as membranas foram lavadas e finalmente reveladas com o kit *AP Conjugate Substrate* (Bio-Rad).

4.1.4 Protocolo padrão para execução dos ELISAs

Placas de poliestireno de fundo chato NUNC Polysorp (Thermo Scientific) foram sensibilizadas com antígeno recombinante diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por 16h a 4°C. A concentração ótima de antígeno foi determinada em diferentes ELISAs do tipo *checkerboard*. As placas foram incubadas com solução de bloqueio (PBS-T com 1% [p/v] de leite em pó desnatado) por 1h a 37 °C. Foram feitas quatro lavagens das placas com PBS-T entre cada uma das etapas. Os soros foram diluídos em solução de bloqueio até a concentração desejada, também determinada por *checkerboards*, adicionados às cavidades (50 µL em cada poço), em duplicata, e incubados a 37 °C por 1 h. Após a lavagem, adicionou-se o anticorpo anti-cão (50 µL/poço), podendo este ser anti-IgG (Rockland) ou anti-IgM (Jackson ImmunoResearch) conjugados com peroxidase (anti-IgG:HRP e anti-IgM:HRP), diluídos em solução de bloqueio para a concentração desejada e incubados por 1 h a 37 °C. A revelação foi feita com O-fenilenodiamina (OPD) e H₂O₂. Após 15 min a reação foi parada com ácido sulfúrico 4N e lida a 492 nm (Leitor de microplacas modelo MR-96A, Mindray).

4.1.5 Protocolo padrão para execução dos *dot blots*

A concentração desejada de antígeno foi aplicada em membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, GE Healthcare) respeitando um volume mínimo de 2 µL e máximo de 3,5 µL, sendo que, dentro de um teste individual, utilizou-se o mesmo volume para todos os antígenos. Quando necessário, diluiu-se os antígenos em PBS. O controle positivo das reações foram células de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (10⁶ células por ponto) lisadas por aquecimento a 100 °C por 10 minutos. As membranas foram incubadas a 37 °C por 20 min para a secagem e fixação dos antígenos e em seguida bloqueadas com PBS-T com 5% [p/v] de leite

em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Entre cada uma das etapas as membranas foram lavadas quatro vezes, permanecendo com excesso de PBS-T por 5 min em cada uma das lavagens. Em seguida, as membranas foram incubadas individualmente com os soros, diluídos em PBS-T com 1% [p/v] de leite em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo anti-cão, podendo este ser anti-IgG canino conjugado com fosfatase alcalina (Rockland) (anti-IgG:AP) ou anti-IgM conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch) (anti-IgM:HRP), diluídos para a concentração desejada em PBS-T com 1% [p/v] de leite em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. A revelação foi realizada utilizando o kit *AP Conjugate Substrate* (Bio-Rad) para as membranas incubadas com anticorpo secundário anti-IgG e diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ para as membranas incubadas com anticorpo secundário anti-IgM. Quando necessário, as reações obtidas foram classificadas em quatro graus de desenvolvimento de cor (-, +1, +2 e +3) e avaliadas por três leitores, de maneira cega, sendo as médias analisadas.

4.2 Resultados

4.2.1 Seleção inicial de antígenos

Inicialmente, 15 proteínas recombinantes previamente produzidas (Tabela 1) foram submetidas à análise em SDS-PAGE 12% visando à seleção de proteínas íntegras, puras e presentes em quantidade suficiente para a realização das etapas subsequentes, Fig. 1. Foram selecionadas 10 proteínas recombinantes: rLigANI, rLigBrep, rLigB#9, rLipL32, rOmpL37, rLemA, rFlaA1, FlaB1 produzidas a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, e rLigANI e rLigBct1 obtidas a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Canicola. Estes antígenos foram quantificados conforme descrito no item 4.1.2.

Os antígenos selecionados nesta etapa, foram avaliados através de análises tipo *checkerboard*, tanto para o formato ELISA quanto *dot blot*, visando o estabelecimento das concentrações ótimas de antígeno, soro e anticorpos anti-IgG e IgM caninos. Essa avaliação foi realizada utilizando um *pool* de dez soros de cães saudáveis (negativos por MAT e ELISA de célula inteira) e um *pool* de dez soros

caninos positivos para leptospirose (positivos por ELISA de célula inteira e com título no MAT \geq 200).

Tabela 1 – Antígenos disponíveis para avaliação.

Nome do Antígeno	Fonte (Sorovar)	Massa Molecular (kDa)*	Referência
LigBrep	Copenhageni ¹	54	Silva et al., 2007
LigB 7-9	Copenhageni ¹	27	LPDI ³
LigB 9-11	Copenhageni ¹	27	LPDI ³
LigB #1 [1340-1448 aa]	Copenhageni ¹	12	LPDI ³
LigB #9 [1478-1578 aa]	Copenhageni ¹	11	LPDI ³
LigBct1	Canicola ²	45	Schuch et al., 2011
LigBct2	Canicola ²	45	Schuch et al., 2011
LigBNI	Canicola ²	52	Schuch et al., 2011
LigANI	Canicola ²	64	Schuch et al., 2011
LigANI	Copenhageni ¹	63	Silva et al., 2007
LipL32	Copenhageni ¹	29	Grassmann et al., 2012 ^a
LemA	Copenhageni ¹	17	Hartwig et al., 2011
OmpL37	Copenhageni ¹	37	Oliveira et al., 2012
FlaA1	Copenhageni ¹	34	Grassmann et al., 2012b
FlaB1	Copenhageni ¹	32	Grassmann et al., 2012b

¹*L. interrogans* sorovar Copenhageni, cepa Fiocruz L1-130

²*L. interrogans* sorovar Canicola, cepa Honda Utrecht

³Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas – CDTec, UFPel.

*Sem cauda de 6xhis

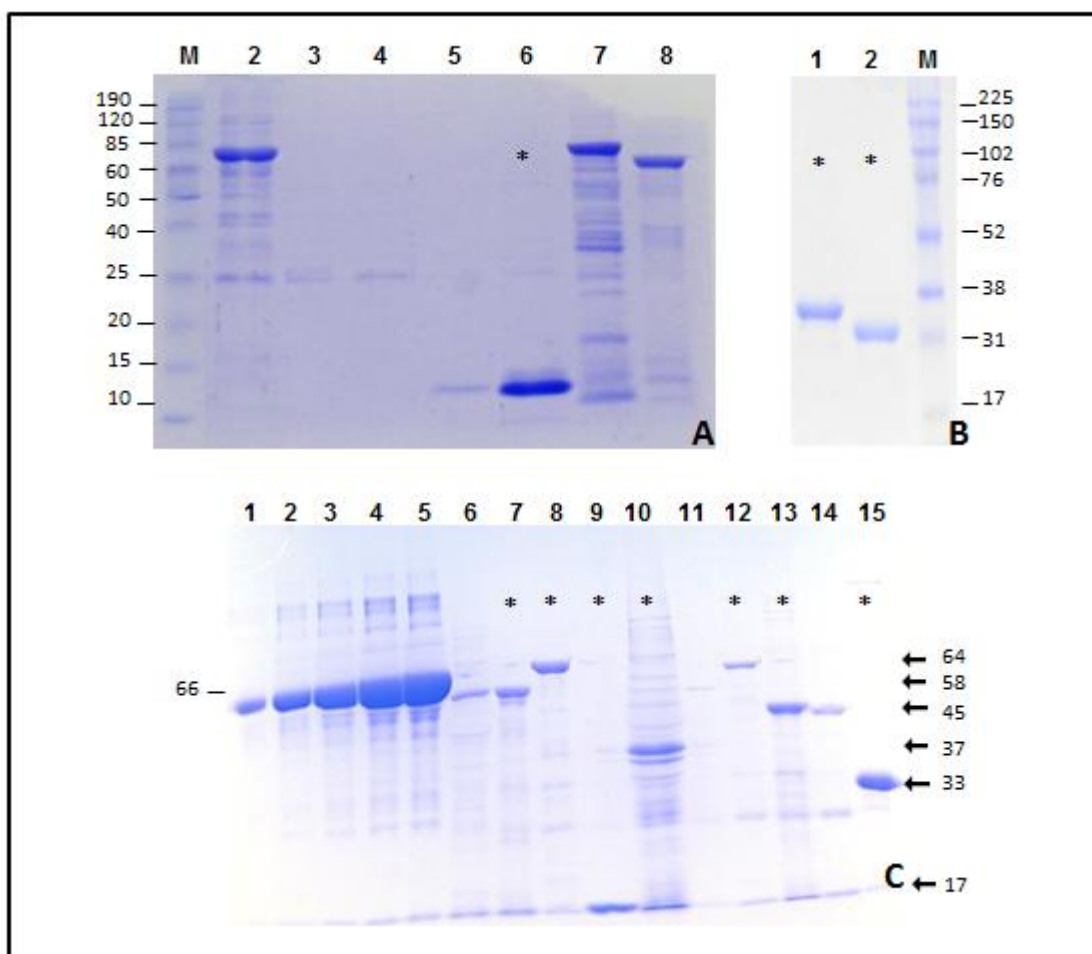


Figura 1. Seleção de antígenos recombinantes por SDS-PAGE. **A:** (M) Marcador de massa molecular (kDa); (2) rLigANI (L1-130); (3) rLigB 7-9; (4) rLigB 9-11; (5) rLigB #1; (6) rLigB #9; (7) rLigANI; (8) rLigBrep. **B:** (1) rFlaA1; (2) rFlaB1; (M) Marcador de massa molecular (kDa). **C:** (1) BSA 1 μ g; (2) BSA 3 μ g; (3) BSA 5 μ g; (4) BSA 8 μ g; (5) BSA 10 μ g; (6) rLigBrep; (7) rLigBrep; (8) rLigANI; (9) rLemA; (10) rOmpL37; (11) rLigBNI; (12) rLigANI (canicola); (13) rLigBct 1; (14) LigBct 2; (15) LipL32. As alíquotas selecionadas de cada proteína estão destacadas com asterisco (*).

4.2.2 Expressão e Purificação de Proteínas

Foram produzidos lotes de rLigBrep e rLipL32 em sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. A proteína rLipL32 foi expressa na forma solúvel e no tamanho esperado de 30 kDa (Apêndice A, Fig. 1S) e a proteína rLigBrep na forma insolúvel, com o tamanho esperado de 58 kDa (Apêndice A, Fig. 2S). O tamanho esperado inclui a proteína, a cauda 6xHis e a região do vetor entre a cauda 6xHis e o local do clonagem (33 aminoácidos no vetor pET100/LigBrep e 3 aminoácidos no vetor pAE/LipL32). A purificação permitiu a obtenção de proteínas com alto grau de pureza, Fig. 2.

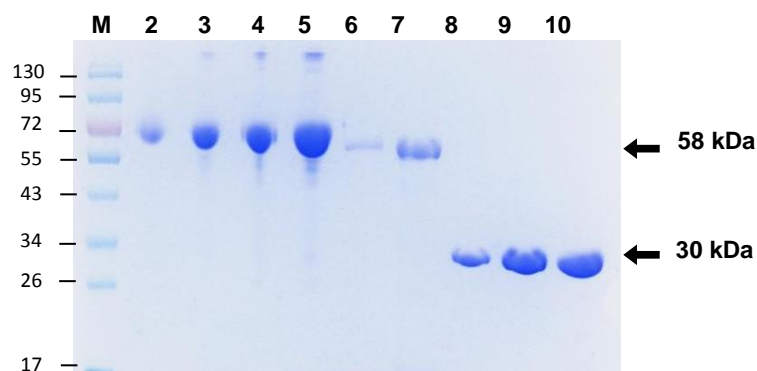


Figura 2. Análise de pureza das proteínas recombinantes produzidas. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (2) BSA 1 μ g; (3) BSA 3 μ g; (4) BSA 5 μ g; (5) BSA 8 μ g; (6) rLigBrep purificada; (7) rLigBrep concentrada; (8) rLipL32 purificada; (8-9) rLipL32 concentrada.

4.2.3 Western Blot

A análise através de *Western blot* permitiu identificar os antígenos capazes de ser reconhecidos pelo *pool* de soros caninos positivos – LigBrep, LigANI (L1-130), OmpL37, LigBct1, LipL32, FlaA1 e FlaB1 – bem como antígenos reconhecidos pelo *pool* de soros positivos e não reconhecidos pelo *pool* soros negativos – LigBrep, LigANI, LigBct1 e FlaA1 (Fig. 3). Todas as proteínas foram reconhecidas no tamanho esperado e com alto grau de pureza, com exceção da proteína OmpL37, que apresentou bandas adicionais ao tamanho esperado, que podem ser atribuídas a degradação ou contaminação com proteínas de *E. coli*.

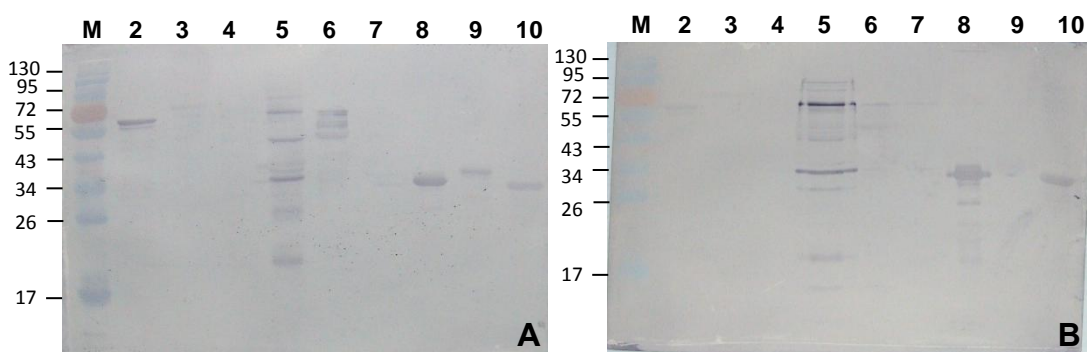


Figura 3. Caracterização de antígenos por *Western blot* com pool de soros caninos. (1) Marcador de massa molecular; (2) rLigBrep; (3) rLigANI (L1-130); (4) rLigANI (canicola); (5) rOmpL37; (6) rLigBct1; (7) rLemA; (8) rLipL32; (9) rFlaA1; (10) rFlaB1. **A:** Reação com pool de soros positivos; **B:** Reação com pool de soros negativos.

4.2.4 Desenvolvimento do ELISA

As 10 proteínas selecionadas foram avaliadas em diferentes concentrações de antígeno por poço, com diferentes diluições do *pool* de soros positivos e de anti-IgG:HRP e anti-IgM:HRP. Efetuaram-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois para antígenos e *pool* positivo. O resultado esperado para esta abordagem é a diminuição da absorbância acompanhando a diluição dos anticorpos e dos antígenos, demonstrando a especificidade da reação. Este cenário foi mais adequadamente observado em 4 (rLipL32, rLigBrep, FlaA1 e FlaB1) das 10 proteínas avaliadas, as quais foram selecionadas para análises posteriores. A Fig. 4 apresenta o resultado para rLipL32, avaliando os níveis de IgG total no *pool* de soros positivos, representativo para esta análise. Fenômeno semelhante foi observado também para rLigBrep, rFlaA1 e rFlaB1, com anti-IgG:HRP e anti-IgM:HRP caninos.

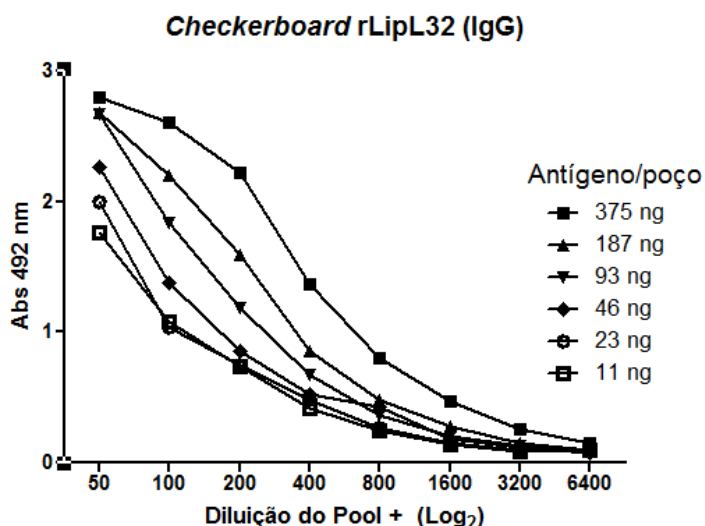


Figura 4. rLipL32-ELISA tipo *checkerboard* com *pool* positivo e anti-IgG:HRP. Diluições seriadas em escala geométrica de razão dois para antígenos e *pool* positivo. Diluição de anti-IgG:HRP 1:2500.

Os antígenos rLigBrep e rLipL32 foram produzidos em novo lote (item 4.2.2), pela necessidade de maior quantidade para a realização dos testes, e avaliados, juntamente com rFlaA1 e rFlaB1 com *pool* de soros positivos e *pool* de soros negativos. Neste *checkerboard*, as proteínas que apresentaram melhor desempenho, permitindo uma maior diferenciação entre os *pools* de soros positivos e negativos, foram rLipL32 e rLigBrep, e seus resultados são apresentados nas Figs 5 e 6.

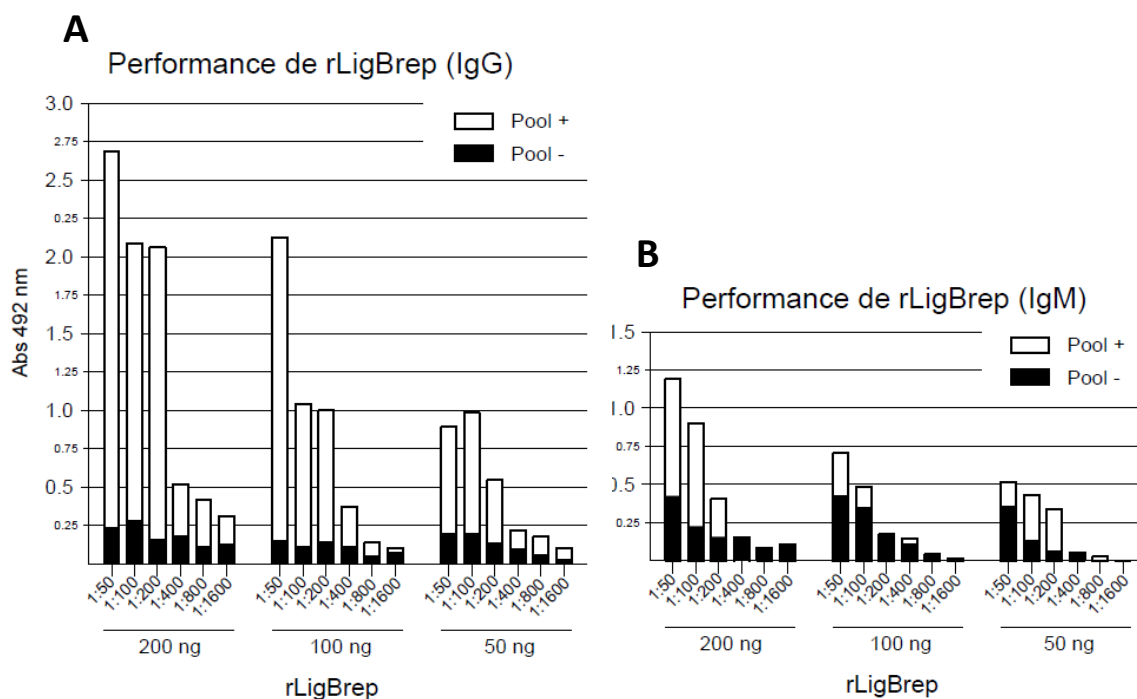


Figura 5. rLigBrep-ELISA tipo *checkerboard* com *pool* positivo e *pool* negativo. Avaliação e padronização das concentrações de rLigBrep (200, 100 e 50 ng) e diluição do soro (1:50-1:1600), pela comparação entre um pool de soros positivos (*Pool +*) e um pool de soros negativos (*Pool -*). **A:** *Checkerboard* com anti-IgG:HRP . **B:** *Checkerboard* com anti-IgM:HRP

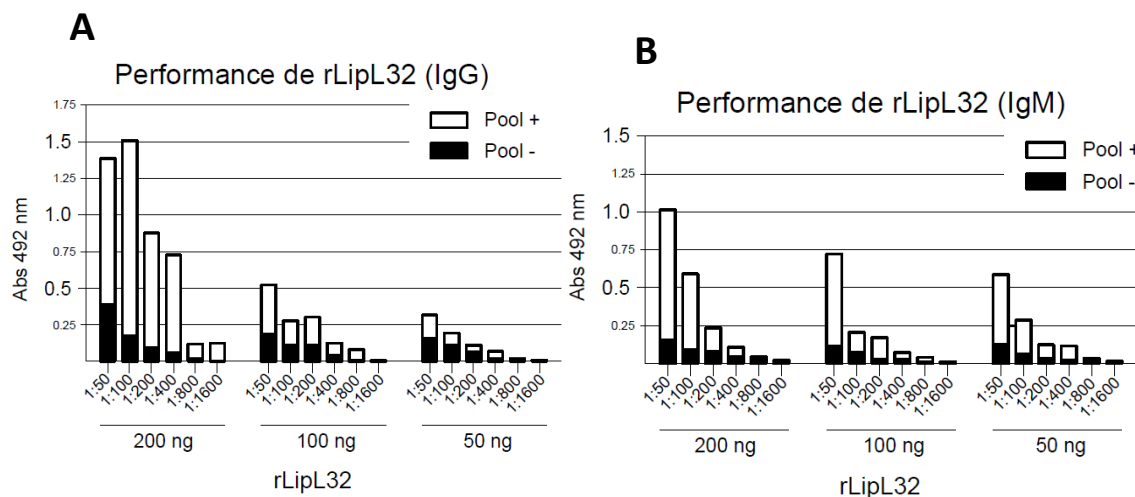


Figura 6. rLipL32-ELISA tipo *checkerboard* com *pool* positivo e *pool* negativo. Avaliação e padronização das concentrações de rLipL32 (200, 100 e 50 ng) e diluição do soro (1:50-1:1600), pela comparação entre um pool de soros positivos (*Pool +*) e um pool de soros negativos (*Pool -*). **A:** *Checkerboard* com anti-IgG:HRP . **B:** *Checkerboard* com anti-IgM:HRP

Diante dos resultados encontrados nesse *checkerboard* com *pools* de soros negativos e positivos, as proteínas rLipL32 e rLigBrep foram selecionadas para a próxima fase do desenvolvimento do ELISA com antígeno recombinante. Nessa fase, foram empregados 10 soros caninos positivos e 10 soros caninos negativos.

Foram avaliadas duas concentrações de antígeno na placa e duas diluições de soros individuais. Para rLigBrep, foram utilizadas 50 e 100 ng de antígeno com soros diluídos 1:100 e 1:200, para teste com o anticorpo anti-IgG (Fig. 7A) e, para anti-IgM:HRP, foram testadas 100 e 200 ng de antígeno com soros diluídos 1:50 e 1:100 (Fig. 7B). Para rLipL32 foram estabelecidas as concentrações de 100 e 200 ng de antígeno e soros diluídos 1:50 e 1:100, para o teste com ambos os anticorpos anti-isotipos caninos (Fig. 8).

Para rLigBrep as melhores condições foram encontradas com 100 ng de antígeno por poço, com os soros diluídos 1:200 e com anti-IgG:HRP. Nesse caso, a média da absorbância a 492 nm (Abs_{492}) dos soros negativos foi de $0,24 \pm 0,11$ (desvio padrão [DP]) e o ponto de corte foi igual a média mais duas vezes o DP, sendo $Abs_{492} = 0,47$. Com esse ponto de corte, todos os soros (10/10) caracterizados como negativos foram identificados como negativos e 7/10 dos soros positivos foram identificados como positivos (Fig. 7A).

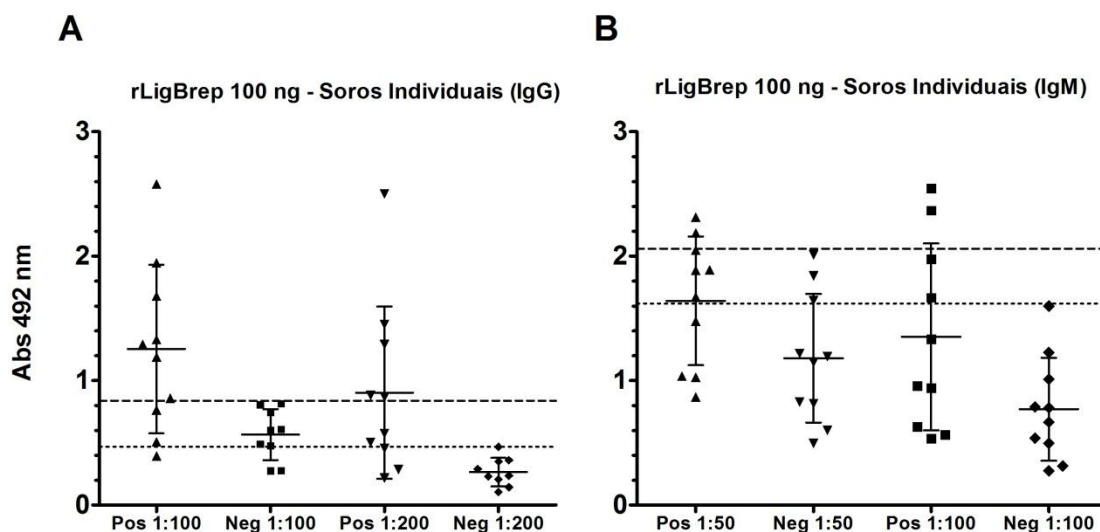


Figura 7. Desempenho de rLigBrep frente a soros individuais. **A:** Resultado para 100 ng de antígeno por poço, com soros diluídos 1:100 e 1:200 e anti-IgG:HRP 1:2500. **B:** Resultado para 100 ng de antígeno por poço, com soros diluídos 1:50 e 1:100 e anti-IgM:HRP 1:5000. As linhas horizontais representam desvio padrão. A linha tracejada superior representa o ponto de corte para a menor diluição de soro e a inferior o ponto de corte para a maior diluição.

Para rLipL32 as melhores condições foram encontradas utilizando 100 ng de antígeno por poço, com soros diluídos 1:100 e com anti-IgG:HRP. Nesse caso, a Abs_{492} média dos soros negativos foi de $0,2 \pm 0,08$ e o ponto de corte foi igual à média mais duas vezes o DP, sendo $Abs_{492} = 0,36$. Com esse ponto de corte, todos

os soros (10/10) caracterizados como negativos foram identificados como negativos e 5/10 dos soros positivos foram identificados como positivos (Fig. 8A).

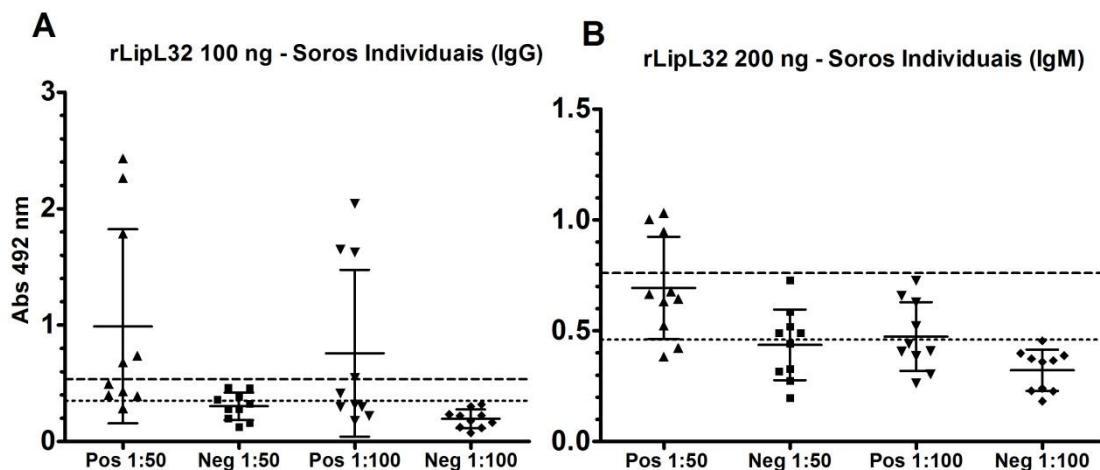


Figura 8. Desempenho de rLipL32 frente a soros individuais. **A:** Resultado para 100 ng de antígeno por poço, com soros diluídos 1:50 e 1:100 e anti-IgG:HRP 1:2500. **B:** Resultado para 200 ng de antígeno por poço, com soros diluídos 1:50 e 1:100 e anti-IgM:HRP 1:5000. As linhas horizontais representam desvio padrão. A linha tracejada superior representa o ponto de corte para a menor diluição de soro e a inferior o ponto de corte para a maior diluição.

4.2.5 Desenvolvimento do *dot blot*

Dentre os 10 antígenos avaliados, nove foram analisados em *dot blots* testando anti-IgG e anti-IgM canino, usando três concentrações de cada antígeno (300, 500 e 1000 ng por ponto de antígeno) e duas diluições (1:200 e 1:500) dos *pools* de soros caninos positivos e negativos. A maior parte dos antígenos testados apresentou reações fracas e inespecíficas, sem distinção entre o pool de soros positivos e negativos, Fig 9. Porém, com as proteínas rLigBrep e rLipL32, foi possível distinguir em algum grau as respostas para *pool* de soros positivos daquelas para *pool* de negativos. Utilizando anti-IgG:AP, rLipL32 manteve esta capacidade de distinção em todas as concentrações, com destaque para a diluição 1:500 de soro, enquanto rLigBrep teve melhor performance quando usado anti-IgM:HRP, nas concentrações de 500 e 1000 ng, independente da diluição do soro.

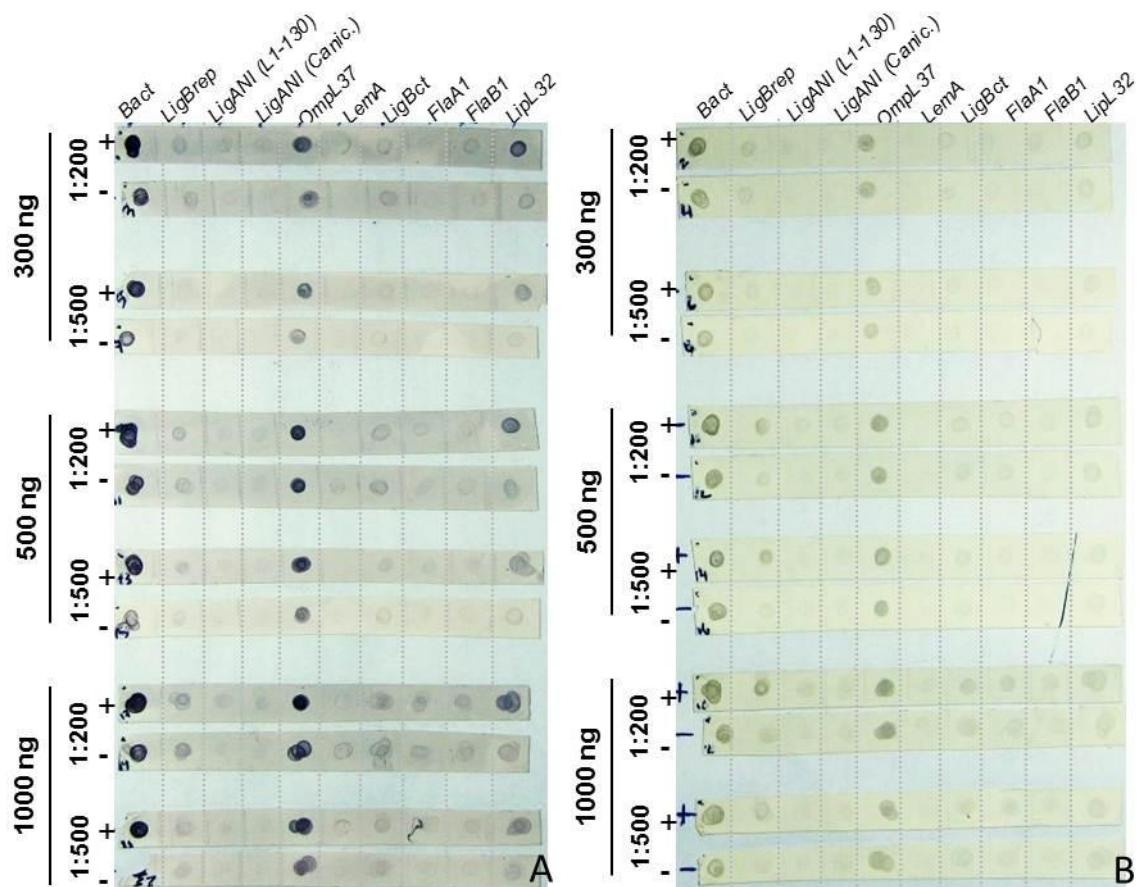


Figura 9. Dot blot tipo checkerboard para nove diferentes antígenos recombinantes. Antígenos recombinantes (rLigBrep, LigANI (L1-130), LigANI (Canicola), rOmpL37, rLemA, rLigBct1, rFlaA1, rFlaB1, rLipL32) em três diferentes concentrações (0,3 µg, 0,5 µg e 1 µg), contra pool de soros positivos (+) e pool de negativos (-) diluídos 1:200 e 1:500. **A:** anti-IgG:AP 1:1000. **B:** Conjugado anti-IgM:HRP 1:5000.

Os antígenos rLipL32 e rLigBrep foram selecionados para análise de soros caninos individuais, porém como houve necessidade de produção de um novo lote, executou-se um novo checkerboard com esses antígenos. Neste, foram testadas quatro concentrações dessas proteínas (125, 250, 500 e 1000 ng), três concentrações de soro (1:200, 1:500 e 1:1000) para detecção com anti-IgG:AP (Fig. 10) e duas concentrações de soro (1:200 e 1:500) para detecção com anti-IgM:HRP (Fig. 11). Além disso, foram testadas duas concentrações de anti-IgG:AP (1:2000 e 1:4000) e duas de anti-IgM:HRP (1:5000 e 1:10000).

Essa avaliação permitiu estabelecer para rLigBrep as melhores concentrações para utilização na avaliação de soros individuais, condições estas que permitiram a reação com pool positivo, mesmo que fraca, e ausência de reação

com *pool* negativo. Contudo, para rLipL32 as reações observadas foram muito fracas e sem distinção clara entre os *pools*.

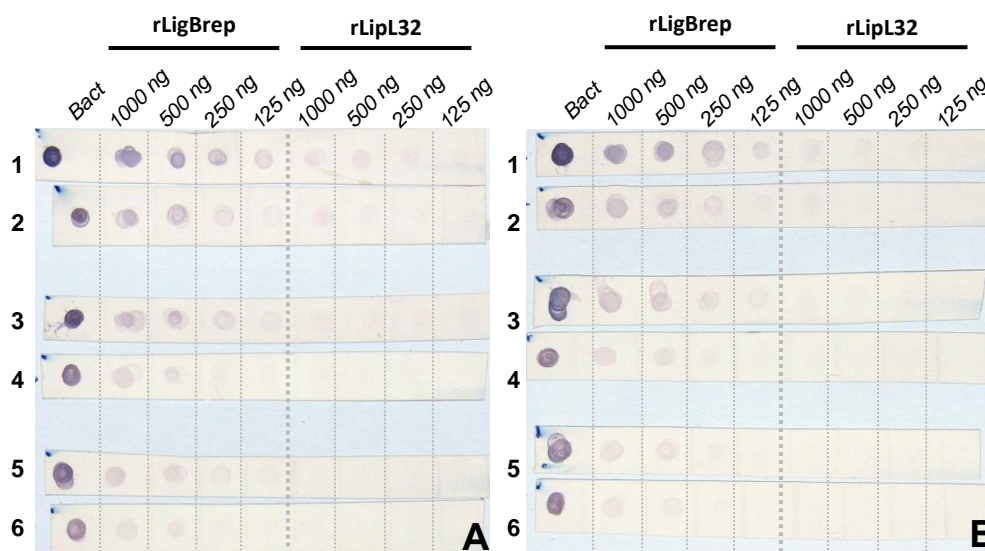


Figura 10. *Dot blot* tipo *checkerboard* para rLigBrep e rLipL32 com anti-IgG:AP. (1) *Pool* de soros caninos positivos (*Pool* +) 1:200; (2) *Pool* de soros caninos negativos (*Pool* -) 1:200; (3) *Pool* + 1:500; (4) *Pool* - 1:500; (5) *Pool* + 1:1000; (6) *Pool* - 1:1000. **A:** *Checkerboard* com anti-IgG:AP 1:2000. **B:** *Checkerboard* com anti-IgG:AP 1:4000.

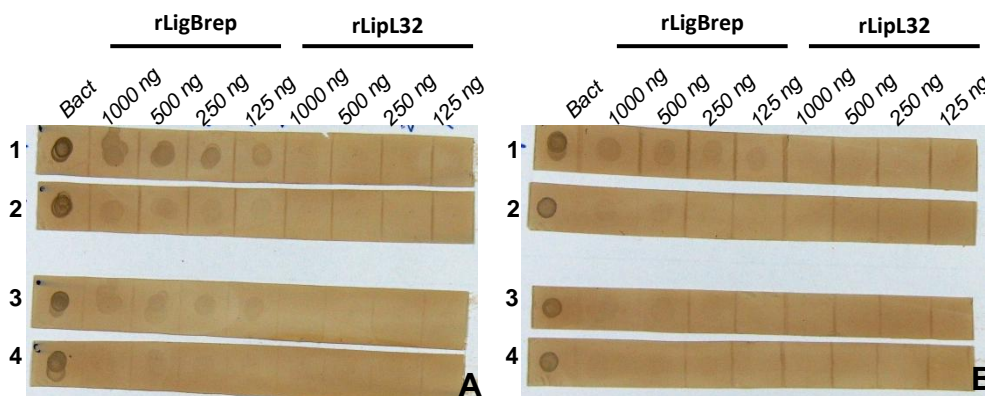


Figura 11. *Dot blot* tipo *checkerboard* para rLigBrep e rLipL32 com anti-IgM:HRP. (1) *Pool* de soros caninos positivos (*Pool* +) 1:200; (2) *Pool* de soros caninos negativos (*Pool* -) 1:200; (3) *Pool* + 1:500; (4) *Pool* - 1:500. **A:** *Checkerboard* com anti-IgM:HRP 1:5000. **B:** *Checkerboard* com anti-IgM:HRP 1:10000.

Em seguida, foram selecionadas as concentrações para o teste com soros individuais, baseadas no desempenho de rLigBrep no *checkerboard*, já que rLipL32 apresentou desempenho inadequado. Selecionou-se duas concentrações de antígeno rLigBrep (150 e 300 ng), diluição de soros 1:500 e anti-IgG:AP 1:2000. Apenas para confirmação do desempenho de rLipL32, esse antígeno também foi

adicionado às membranas, nas concentrações de 200 e 400 ng. Foram testados 11 soros de animais positivos vacinados contra leptospirose (Pos-V), 8 soros de animais positivos não vacinados (Pos-NV), 11 soros de animais negativos vacinados (Neg-V) e 8 soros de animais negativos não vacinados (Neg-NV), totalizando, portanto, 19 soros positivos e 19 soros negativos (Fig.12).

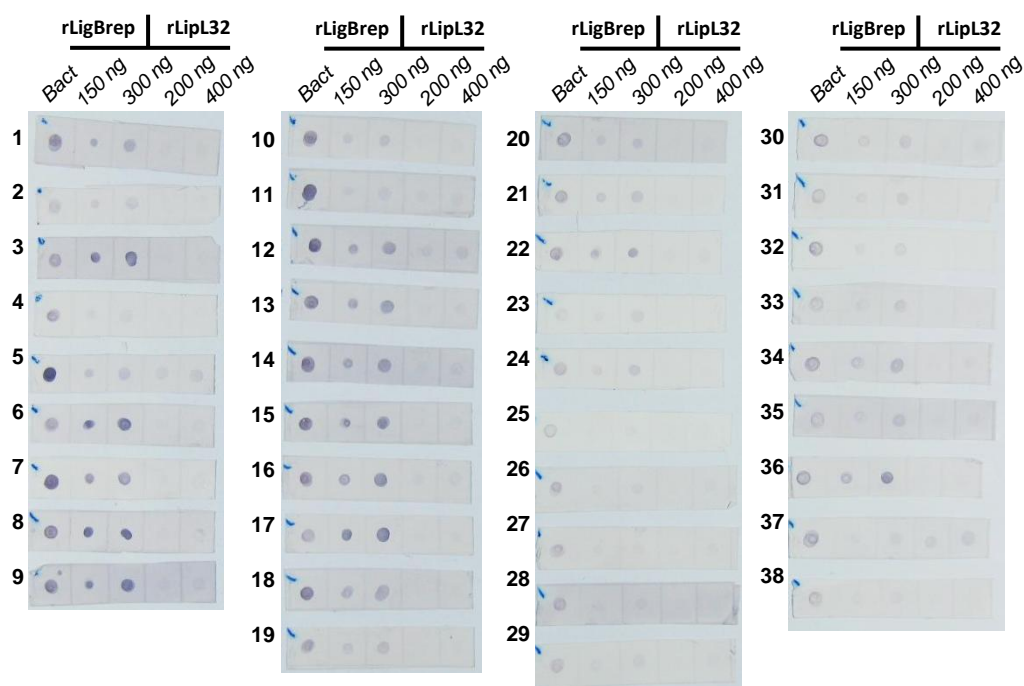


Figura 12. Análise de soros individuais por *dot blot*, com os antígenos rLigBrep e rLipL32. (1 -11) Soros caninos Pos-V; (12-19) Soros Pos-NV; (20-30) Neg-V; (31-38) Neg-NV.

A análise de soros individuais por *dot blot* com o antígeno rLigBrep, permitiu obter, de maneira geral, uma maior intensidade de reação nos soros positivos em relação aos negativos. As reações para essa proteína foram classificadas em quatro graus de desenvolvimento de cor (-, +1, +2 e +3). Foram considerados resultados positivos aqueles classificados como +2 e +3 e negativos os classificados como - e +1. Para rLigBrep 150 ng, obteve-se, no grupo de animais vacinados, uma sensibilidade de 82% (9/11) e especificidade de 64% (7/11) e, para o grupo de animais não vacinados, sensibilidade de 87.5% (7/8) e especificidade de 25% (2/8) (Tab. 2). Como as reações com rLipL32 continuaram se comportando de maneira inadequada, seu resultado não foi avaliado.

Tabela 2 – Classificação das reações obtidas com rLigBrep para soros individuais.

	LigBrep (150 ng)			
	Grau de Cor			
	-	+1	+2	+3
Pos-V (n=11)	0	2	4	5
Pos-NV (n=8)	0	1	1	6
Neg-V (n=11)	4	3	3	0
Neg-NV (n=8)	0	2	5	1

5. DISCUSSÃO

A necessidade de melhora no diagnóstico de leptospirose é evidente. Melhores testes de diagnóstico contribuirão para um aperfeiçoamento da detecção de casos e conseqüente aumento do conhecimento e controle acerca da leptospirose, beneficiando a saúde pública e veterinária (HARTSKEERL et al., 2011). Para que seja possível o desenvolvimento de um teste diagnóstico eficiente em uma variedade de situações epidemiológicas associadas com a leptospirose humana e animal, é ideal que o antígeno selecionado seja altamente conservado entre diversas espécies patogênicas de *Leptospira* (GUERREIRO et al., 2001). A utilização de proteínas recombinantes imunogênicas em testes sorológicos é uma alternativa atrativa ao uso de antígenos brutos, já que seqüências de aminoácidos dessas proteínas podem ter alta conservação entre espécies e sorovares patogênicos (CULLEN et al., 2004).

No presente trabalho, antígenos recombinantes de *L. interrogans* foram analisados nos testes sorológicos ELISA e *dot blot*, este último visando o desenvolvimento de um teste rápido, utilizando um banco de soros caninos bem caracterizados, incluindo animais saudáveis e animais positivos para leptospirose. Os antígenos selecionados para análise são imunogênicos e conservados entre espécies patogênicas de *Leptospira*: LigB, LigA (MATSUNAGA et al., 2003; MCBRIDE et al., 2009), OmpL37 (PINNE et al., 2010), LipL32 (GUERREIRO et al., 2001; GAMBERINI et al., 2005), LemA (HARTWIG et al., 2011). Os antígenos FlaA1 e FlaB1 também são imunogênicos e altamente conservados em *Leptospira* spp. (SAKOLVAREE et al., 2007), porém também estão presentes em espécies

saprófitas por serem componentes da estrutura flagelar e possuem algum grau de conservação com proteínas flagelares de outras espiroquetas (PICARDEAU et al., 2001).

Em análise por *Western blot*, os antígenos rLigBrep, rLigANI, rLipL32, rFlaA1, rFlaB1 (clonados de *L. interrogans* sv. Copenhageni) e LigBct1 (clonado de *L. interrogans* sv. Canicola) foram reconhecidos por *pool* de soros caninos positivos, sugerindo a expressão destas proteínas durante a infecção do hospedeiro canino. As proteínas rLemA e rOmpL37 não foram avaliadas já que rLemA não teve sua presença confirmada em SDS-PAGE e rOmpL37 apresentou peptídeos além do tamanho esperado, que podem corresponder a degradação ou proteínas de *E. coli*. Ainda, os antígenos rLigBrep, rLigANI, rLigBct1 e rFlaA1 não foram reconhecidos por *pool* de soros negativos, um indicativo de que estes antígenos podem ser adequados ao diagnóstico. Apesar de rLipL32 ter sido reconhecida pelo *pool* negativo neste teste, nas análises por ELISA e *dot blot* essa proteína apresentou resultados consideráveis, permitindo a diferenciação dos *pools*.

Os antígenos com resultados mais promissores encontrados nesse estudo, tanto em ELISA quanto em *dot blot*, foram LigBrep e LipL32. Esses antígenos foram clonados a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, cepa Fiocruz L1-130. O sorovar Copenhageni representa o sorovar prevalente no ambiente urbano no Brasil (REIS et al., 2008). As proteínas de superfície LigA e LigB e a proteína imunodominante LipL32 têm se mostrado candidatos promissores para diagnóstico. Essas proteínas são altamente conservadas e estão presentes apenas em leptospiros patogênicas (HAAKE et al., 2004; CERQUEIRA et al., 2009; MCBRIDE et al., 2009). Além disso, são expressas durante a infecção do hospedeiro e induzem alta resposta imune tanto em humanos quanto animais (HAAKE et al., 2000; MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2004; HAAKE e MATSUNAGA, 2010).

Croda e colaboradores (2007) demonstraram a utilidade diagnóstica do fragmento rLigB[131-649 aa], também chamado LigBrep, composto pela região idêntica entre LigA e LigB. Utilizando o antígeno no formato imunoblot (*Western blot*) os autores obtiveram sensibilidades de 81% na primeira semana de doença e 92% na identificação de infecção aguda, com altas especificidades (100% para população

onde a leptospirose não é endêmica e 96% para população de área endêmica). Recentemente, um teste do tipo *Dual Path Platform* (DPP) utilizando antígenos Lig recombinantes para aplicação no diagnóstico rápido (*point-of-care*) de leptospirose humana, obteve sensibilidade similar ao teste IgM-ELISA (NABITY et al., 2012). A utilidade da proteína rLipL32 também já foi reportada em diversos ensaios sorológicos, para a detecção de leptospirose (FLANNERY et al., 2001; DEY et al., 2004; BOMFIM et al., 2005; DEY et al., 2007a; DEY et al., 2007b; CHALAYON et al., 2011), com sensibilidades e especificidades entre 90 e 100% em fase convalescente ou em soros com título no MAT \geq 100. Porém, sensibilidades de 56% são reportadas para detecção na fase aguda (FLANNERY et al., 2001).

Nesse trabalho, os antígenos rLigBrep e rLipL32 foram capazes de reagir de maneira específica com *pool* de soros caninos positivos para leptospirose no formato ELISA. Em seguida, permitiram alto grau de diferenciação entre *pool* de soros positivos e *pool* de soros negativos, com anti-IgG:HRP e anti-IgM:HRP. No formato *dot blot*, foi possível diferenciar adequadamente os *pools* com anti-IgG:AP para rLipL32 e com anti-IgM:HRP para rLigBrep. Quando foram produzidos novos lotes das proteínas, porém, a proteína rLipL32 passou a ter resultados inadequados no *dot blot*, mas não no ELISA.

Quando analisados soros individuais com esses antígenos por ELISA, foram obtidas, com anti-IgG:HRP, sensibilidades de 70% (7/10 soros) e 50% (5/10) para rLigBrep e rLipL32 respectivamente, e especificidades de 100% para ambos. Quando empregado anti-IgM:HRP, os resultados foram inferiores para os dois antígenos, possivelmente em função de a maior parte do banco de soros utilizado ser composto por soros de animais em fase convalescente. No *dot blot*, rLigBrep mostrou uma sensibilidade de 82% (9/11) e especificidade de 64% (7/11) no grupo de animais vacinados e sensibilidade de 87.5% (7/8) e especificidade de 25% (2/8) para o grupo de animais não vacinados. Esses valores foram obtidos considerando-se reações com grau de cor – e +1 como negativas e +2 e +3 como positivas. Embora foi possível observar, em geral, uma intensidade maior da reação com a maioria dos soros positivos, o ideal para um teste visual como o *dot blot* é que não se note reação nos soros negativos. Isso demonstra que ainda há necessidade de aprimoramento das concentrações de antígeno, soro ou anticorpos anti-isotipos caninos.

Em vista dos resultados deste trabalho, bem como dos relatos da literatura, as proteínas rLigBrep e rLipL32 parecem promissoras para o diagnóstico de leptospirose canina. Contudo, este estudo representa uma análise inicial, com várias limitações. Os testes com soros individuais representaram meramente uma análise inicial para triagem, caso o intuito fosse comprovar os valores de sensibilidade e especificidade seria necessária a avaliação um maior número de soros. As condições para utilização desses antígenos nos testes de ELISA e *dot blot* ainda precisam ser aprimoradas. O ideal nessa triagem inicial é a utilização de soros caninos de animais não vacinados, positivos confirmados com sinais clínicos ou visualização de leptospiras em campo escuro, bem como negativos provenientes de área não endêmica. Posteriormente, os antígenos sofreriam avaliação de desempenho com grupos de animais vacinados, grupos de animais em fase aguda e grupos em fase convalescente. Ainda, a especificidade seria analisada com grupo cães negativos de área endêmica e grupo de portadores de outras doenças infecciosas de sintomatologia similar a leptospirose. Outra limitação é a utilização de teste-padrão imperfeitos (GORIS et al., 2012; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2012), que podem, portanto, ter classificado erroneamente alguns soros utilizados.

6. CONCLUSÕES

- Os antígenos rLigBrep e rLipL32 tiveram melhor desempenho e foram analisados com soros caninos individuais positivos e negativos para leptospirose.

- Na análise de soros individuais por ELISA-IgG, rLigBrep apresentou os melhores resultados, com sensibilidade 70% e especificidade de 100%, um desempenho promissor.

- No *dot blot* com soros individuais, rLigBrep apresentou sensibilidade de 82% e especificidade de 64% para o grupo de cães vacinados, porém a especificidade caiu para 25% com o grupo de animais não vacinados, um resultado insuficiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOEL, T. H.; HOUWERS, D. J.; VAN DONGEN, A. M.; ADESIYUN, A. A.; JIMENEZ-COELLOE, M.; CARDOSO, L.; SUEPAUL, S. M.; ORTEGA-PACHECO, A. e SMITS, H. L. Rapid test for the serodiagnosis of acute canine leptospirosis. **Vet Microbiol**, p. 2011.
- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p. 287-96. 2010.
- ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T. e MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Vet Microbiol**, p. 2011.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N. e HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS ONE**, v.4, n.9, p. e7093. 2009.
- 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. e WEYANT, R. S. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.41, n.2, p. 803-9. 2003.
- BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L. e ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, v.78, n.7, p. 3207-16. 2010.
- BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L. e RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect Immun**, v.70, n.12, p. 6926-32. 2002.
- 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. e VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.12, p. 757-71. 2003.
- BOMFIM, M. R.; KO, A. e KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.109, n.1-2, p. 89-94. 2005.
- BROD, C. S.; ALEIXO, J. A.; JOUGLARD, S. D.; FERNANDES, C. P.; TEIXEIRA, J. L. e DELLAGOSTIN, O. A. [Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.4, p. 294-300. 2005.
- BROWN, K. e PRESCOTT, J. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. **Cmaj**, v.178, n.4, p. 399-401. 2008.
- BROWN, P. D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O.; TERPSTRA, W. J. e LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **J Med Microbiol**, v.43, n.2, p. 110-4. 1995.
- BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL,

R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K. e ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.39, p. 14560-5. 2006.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A.; STROBEL, S.; JOZSI, M.; ISAAC, L. e BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J Infect Dis**, v.205, n.6, p. 995-1004. 2012.

CDC. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep**, v.46, n.RR-10, p. 1-55. 1997.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I. e DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **J Med Microbiol**, v.58, n.Pt 9, p. 1173-81. 2009.

CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P. e KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.105, n.5, p. 289-97. 2011.

CHANG, S. L.; BUCKINGHAM, M. e TAYLOR, M. P. Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*; survival in water and sewage; destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. **J Infect Dis**, v.82, n.3, p. 256-66. 1948.

CHOU, L. F.; CHEN, Y. T.; LU, C. W.; KO, Y. C.; TANG, C. Y.; PAN, M. J.; TIAN, Y. C.; CHIU, C. H.; HUNG, C. C. e YANG, C. W. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, v.511, n.2, p. 364-70. 2012.

CHOY, H. A. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. **PLoS One**, v.7, n.7, p. e41566. 2012.

COSTA, E.; LOPES, A. A.; SACRAMENTO, E.; COSTA, Y. A.; MATOS, E. D.; LOPES, M. B. e BINA, J. C. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.45, n.3, p. 141-5. 2003.

CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.5, p. 1528-34. 2007.

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

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. e ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infect Immun**, v.73, n.8, p. 4853-63. 2005.

DAHER, E. F. e NOGUEIRA, C. B. Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.42, n.6, p. 327-32. 2000.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F. e MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p. 1215-24. 2011.

DEY, S.; MADHAN MOHAN, C.; RAMADASS, P. e NACHIMUTHU, K. Recombinant antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of leptospirosis. **Vet Res Commun**, v.31, n.1, p. 9-15. 2007a.

DEY, S.; MOHAN, C. M.; KUMAR, T. M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A. M. e NACHIMUTHU, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.103, n.1-2, p. 99-106. 2004.

DEY, S.; MOHAN, C. M.; RAMADASS, P. e NACHIMUTHU, K. Recombinant antigen-based dipstick ELISA for the diagnosis of leptospirosis in dogs. **Vet Rec**, v.160, n.6, p. 186-8. 2007b.

DEY S, MOHAN CM, RAMADASS P, NACHIMUTHU K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. **Indian J Med Res**, v.128, n.2, p. 172-7. 2008.

DIAS, J. P.; TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C.; MENDES, C. M.; GUIMARAES, P.; REIS, M. G.; KO, A. e BARRETO, M. L. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.5, p. 499-504. 2007.

EFFLER, P. V.; BOGARD, A. K.; DOMEN, H. Y.; KATZ, A. R.; HIGA, H. Y. e SASAKI, D. M. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. **J Clin Microbiol**, v.40, n.4, p. 1464-9. 2002.

ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: Prevalence, pathogenesis and control. **Prev Vet Med**, v.2, p. 411-421. 1984.

EVANGELISTA, K. V. e COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol**, v.5, n.9, p. 1413-25. 2010.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C. e PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: MediSci. 1999

FEIGIN, R. D.; LOBES, L. A., JR.; ANDERSON, D. e PICKERING, L. Human leptospirosis from immunized dogs. **Ann Intern Med**, v.79, n.6, p. 777-85. 1973.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA, S. E. D.; FERREIRA, A. G. P.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A. e KO, A. I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.39, n.9, p. 3303-3310. 2001.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S. e ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Complement System. **Scand J Immunol**, v.73, n.5, p. 408-419. 2011.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L. e NASCIMENTO, A. L. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol Lett**, v.244, n.2, p. 305-13. 2005.

GANOZA, C. A.; MATTHIAS, M. A.; SAITO, M.; CESPEDES, M.; GOTUZZO, E. e VINETZ, J. M. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.2, p. e612. 2010.

GILGER, B. C. e MICHAU, T. M. Equine recurrent uveitis: new methods of management. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v.20, n.2, p. 417-27, vii. 2004.

GOLDSTEIN, R. E. Canine leptospirosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.40, n.6, p. 1091-101. 2010.

GORIS, M. G. A.; LEEFLANG, M. M. G.; BOER, K. R.; GOEIJENBIER, M.; VAN GORP, E. C. M.; WAGENAAR, J. F. P. e HARTSKEERL, R. Establishment of valid laboratory case definition for human leptospirosis. **J Bacteriol Parasitol**, v.3, p. 132. 2012.

GOUVEIA, E. L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A. L.; AIRES, T. S.; VILLASBOAS-BISNETO, J. C.; QUEIRROZ, A.; SANTOS, A. C.; SALGADO, K.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.14, n.3, p. 505-508. 2008.

GRASSMANN AA, FÉLIX SR, DOS SANTOS CX, AMARAL MG, et al. Protection against Lethal Leptospirosis after Vaccination with LipL32 Coupled or Coadministered with the B Subunit of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin. **Clin Vaccine Immunol**.19:740-5, 2012a.

GRASSMANN, AA; VALIATI, F; OLIVEIRA, TL, DOS SANTOS, CX; DELLAGOSTIN, AO; MCBRIDE, AJA. Recombinant leptospiral flagellins towards developing new leptospirosis diagnostic tests. Em: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria 1:196, 2012b.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G. J.; EVERARD, C. O.; HARTSKEERL, R. A. e TERPSTRA, W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **J Gen Microbiol**, v.139, n.8, p. 1691-700. 1993.

GRIFFITH, M. E.; HOSPENTHAL, D. R. e MURRAY, C. K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.19, n.6, p. 533-7. 2006.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I. e HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun**, v.69, n.8, p. 4958-4968. 2001.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v.146, p. 1491-1504. 2000.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N. e BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect Immun**, v.68, n.4, p. 2276-85. 2000.

HAAKE, D. A. e MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol Microbiol**, v.77, n.4, p. 805-814. 2010.

HAAKE, D. A.; SUCHARD, M. A.; KELLEY, M. M.; DUNDOO, M.; ALT, D. P. e ZUERNER, R. L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **J Bacteriol**, v.186, n.9, p. 2818-28. 2004.

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

HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J. e DELLAGOSTIN, O. A. Characterization of the Immunogenic and Antigenic Potential of Putative Lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Curr Microbiol**, v.62, n.4, p. 1337-1341. 2011.

HULL-JACKSON, C.; GLASS, M. B.; ARI, M. D.; BRAGG, S. L.; BRANCH, S. L.; WHITTINGTON, C. U.; EDWARDS, C. N. e LEVETT, P. N. Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.44, n.5, p. 1853-5. 2006.

JOHNSON, M. A.; SMITH, H.; JOEPH, P.; GILMAN, R. H.; BAUTISTA, C. T.; CAMPOS, K. J.; CESPEDES, M.; KLATSKY, P.; VIDAL, C.; TERRY, H.; CALDERON, M. M.; CORAL, C.; CABRERA, L.; PARMAR, P. S. e VINETZ, J. M. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. **Emerg Infect Dis**, v.10, n.6, p. 1016-22. 2004.

KARASEVA, E. V.; CHERNUKHA, Y. G. e PISKUNOVA, L. A. Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol**, v.17, n.3, p. 339-45. 1973.

KO, A. I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D., JR. e RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v.354, n.9181, p. 820-5. 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C. e PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v.7, n.10, p. 736-47. 2009.

KOIZUMI, N. e WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v.22, n.11-12, p. 1545-52. 2004.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p. 296-326. 2001.

LEVETT, P.N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clin Infect Dis**, v.36, n.4, p. 447-52. 2003.

LEVETT, P. N. e BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg**, v.66, n.6, p. 745-8. 2002.

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L.; WHITTINGTON, C. U.; EDWARDS, C. N. e PAXTON, H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.8, n.2, p. 349-51. 2001.

LI, C.; MOTALEB, A.; SAL, M.; GOLDSTEIN, S. F. e CHARON, N. W. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.2, n.4, p. 345-54. 2000.

LI, S.; OJCIUS, D. M.; LIAO, S.; LI, L.; XUE, F.; DONG, H. e YAN, J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun**, v.16, n.2, p. 80-92. 2010.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; TURNER, E. L.; WUTHIEKANUN, V.; THAI PADUNGPANIT, J.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L. D.; DAY, N. P.; COOPER, B. e PEACOCK, S. J. Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation

of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. **Clin Infect Dis**, v.55, n.3, p. 322-31. 2012.

LIU, Y.; ZHENG, W.; LI, L.; MAO, Y. e YAN, J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. **Med Microbiol Immunol**, v.196, n.4, p. 233-9. 2007.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; QUINONES MDEL, C.; CRUZ, R, et al. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, v.15, n.4, p. 249-55. 2004.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol Microbiol**, v.49, n.4, p. 929-45. 2003.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p. 376-86. 2005.

MCBRIDE, A. J.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A.; MOREIRA, A. N.; ZUERNER, R. L.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. e DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infect Genet Evol**, v.9, n.2, p. 196-205. 2009.

MCBRIDE, A. J.; SANTOS, B. L.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; HARTSKEERL, R. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, n.9, p. 1245-8. 2007.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G. e SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v.30, n.9, p. 2219-24. 1992.

MERIEN, F.; BARANTON, G. e PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J Infect Dis**, v.172, n.1, p. 281-5. 1995.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J. e NALLY, J. E. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. **Infect Immun**, v.76, n.11, p. 4952-8. 2008.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BRUCE, M, et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin Infect Dis**, v.34, n.12, p. 1593-9. 2002.

NABITY, S. A.; RIBEIRO, G. S.; LESSA AQUINO, C.; TAKAHASHI, D, et al. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of Human Leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.11, p. e1878. 2012.

NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R. e LOVETT, M. A. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infect Immun**, v.73, n.6, p. 3251-60. 2005.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, v.186, n.7, p. 2164-72. 2004.

OLIVEIRA, TL; PEREIRA, MB; GRASSMANN, AA; VALIATI, FE; HARTWIG, DD; DELLAGOSTIN, AO. Production of the recombinant protein OmpL37 of *Leptospira interrogans* for use as a subunit vaccine against Leptospirosis. . Em: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria 1:197, 2012.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S. e CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.20, n.3, p. 284-92. 2007.

PAPPAS, G. e CASCIO, A. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. **Int J Antimicrob Agents**, v.28, n.6, p. 491-6. 2006.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L. e AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int J Infect Dis**, v.12, n.4, p. 351-7. 2008.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A. e SAINT, G. I. Targeted mutagenesis of the flagellar core protein gene of the spirochete *Leptospira biflexa* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology**, v.101, p. 309. 2001.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L., et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. **PLoS ONE**, v.3, n.2, p. e1607. 2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A. e HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.9, p. e815. 2010.

PINNE, M. e HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v.4, n.6, p. e6071. 2009.

PINNE, M.; MATSUNAGA, J. e HAAKE, D. A. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. **J Bacteriol**, v.194, n.22, p. 6074-87. 2012.

PRESCOTT, J. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. **Cmaj**, v.178, n.4, p. 397-8. 2008.

RATHINAM, S. R. Ocular manifestations of leptospirosis. **J Postgrad Med**, v.51, n.3, p. 189-94. 2005.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G. e KO, A. I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p. e228. 2008.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y., et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v.422, n.6934, p. 888-93. 2003.

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; LEHMANN, J. S.; PURUSHE, J.; SANKA, R.; TORRES, M.; WEBSTER, N. J.; VINETZ, J. M. e MATTHIAS, M. A. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae*

Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.10, p. e1853. 2012.

RICALDI, J. N. e VINETZ, J. M. Leptospirosis in the tropics and in travelers. **Curr Infect Dis Rep**, v.8, n.1, p. 51-8. 2006.

RILEY, L. W.; KO, A. I.; UNGER, A. e REIS, M. G. Slum health: diseases of neglected populations. **BMC Int. Health Hum. Rights**, v.7, p. 2. 2007.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W. e PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v.154, n.Pt 5, p. 1309-17. 2008.

ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C. e YASUDA, P. H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.45, n.5, p. 245-8. 2003.

SAKOLVAREE, Y.; MANEEWATCH, S.; JIEMSUP, S.; KLAYSING, B.; TONGTAWE, P.; SRIMANOTE, P.; SAENGJARUK, P.; BANYEN, S.; TAPCHAI SRI, P.; CHONSA-NGUAN, M. e CHAICUMPA, W. Proteome and immunome of pathogenic *Leptospira* spp. revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with immune serum. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v.25, n.1, p. 53-73. 2007.

SCHUCH, R; BACELO, KL; HARTWIG, DD; FORSTER, KM; DELLAGOSTIN, AO. Clonagem, Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes da Superfície da Membrana de *Leptospira* em *Escherichia Coli*. Em: XX Congresso de Iniciação Científica, UFPel, 2011. Disponível em: <http://ufpel.edu.br/cic/2011/anais/cb.htm>. Acessado em: dezembro, 2012.

SECRETARIA VIGILÂNCIA EM SAÚDE e MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leptospirose. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_leptospirose.pdf: Brasil. Caderno 8 2007.

SEGURA, E. R.; GANOZA, C. A.; CAMPOS, K.; RICALDI, J. N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CESPEDES, M. J.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; LOPEZ LINAN, R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R. H. e VINETZ, J. M. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clin Infect Dis**, v.40, n.3, p. 343-51. 2005.

SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P. e UMAPATHI, T. Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. **J Med Microbiol**, v.52, n.Pt 10, p. 897-901. 2003.

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A. e HAAKE, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect Immun**, v.64, n.6, p. 2322-30. 1996.

SHARMA, S.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; NATARAJASEENIVASAN, K. e SEHGAL, S. C. Seroprevalence of leptospirosis among high-risk population of Andaman Islands, India. **Am J Trop Med Hyg**, v.74, n.2, p. 278-83. 2006.

SILVA EF, MEDEIROS MA, MCBRIDE AJ, MATSUNAGA J, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**. v.25, n.33, p. 6277-86. 2007.

SMITH, D. J. e SELF, H. R. Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. **J Hyg (Lond)**, v.53, n.4, p. 436-44. 1955.

SMITS, H. L.; ANANYINA, Y. V.; CHERESHKY, A.; DANCEL, L.; LAI, A. F. R. F.; CHEE, H. D.; LEVETT, P. N.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; MUTHUSETHUPATHI, M. A.; SANDERS, E. J.; SASAKI, D. M.; DOMEN, H.; YERSIN, C.; AYE, T.; BRAGG, S. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J. e HARTSKEERL, R. A. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. **J Clin Microbiol**, v.37, n.9, p. 2904-9. 1999.

SMITS, H. L.; HARTSKEERL, R. A. e TERPSTRA, W. J. International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. **Trop Med Int Health**, v.5, n.2, p. 124-8. 2000.

SMYTHE L, ADLER B, HARTSKEERL RA, GALLOWAY RL et al. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, genomospecies 3, genomospecies 4 and genomospecies 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov., *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2012 [Epub ahead of print]

SOUZA, V. M.; ARSKY MDE, L.; CASTRO, A. P. e ARAUJO, W. N. Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil. **Rev Saude Publica**, v.45, n.6, p. 1001-8. 2011.

STERN, E. J.; GALLOWAY, R.; SHADOMY, S. V.; WANNEMUEHLER, K.; ATRUBIN, D.; BLACKMORE, C.; WOFFORD, T.; WILKINS, P. P.; ARI, M. D.; HARRIS, L. e CLARK, T. A. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. **Clin Infect Dis**, v.50, n.6, p. 843-9. 2010.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A. e HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, v.2, n.11, p. e1188. 2007.

STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K. e HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.64, n.3, p. 247-55. 2009.

SUPUTTAMONGKOL, Y.; PONGTAVORNPINYO, W.; LUBELL, Y.; SUTTINONT, C.; HOONTRAKUL, S.; PHIMDA, K.; LOSUWANALUK, K.; SUWANCHAROEN, D.; SILPASAKORN, S.; CHIERAKUL, W. e DAY, N. Strategies for diagnosis and treatment of suspected leptospirosis: a cost-benefit analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.2, p. e610. 2010.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K.; LUNN, K. F.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A. e GOLDSTEIN, R. E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **J Vet Intern Med**, v.25, n.1, p. 1-13. 2011.

TANGKANAKUL, W.; THARMAPHORNPII, P.; PLIKAYTIS, B. D.; BRAGG, S.; POONSUKSOMBAT, D.; CHOOMKASIEN, P.; KINGNATE, D. e ASHFORD, D. A. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. **Am J Trop Med Hyg**, v.63, n.3-4, p. 204-8. 2000.

TREVEJO, R. T.; RIGAU-PEREZ, J. G.; ASHFORD, D. A.; MCCLURE, E. M.; JARQUIN-GONZALEZ, C.; AMADOR, J. J.; DE LOS REYES, J. O.; GONZALEZ, A.; ZAKI, S. R.; SHIEH, W.-J.; MCLEAN, R. G.; NASCI, R. S.; WEYANT, R. S.; BOLIN, C. A.; BRAGG, S. L.; PERKINS, B. A. e SPIEGEL, R. A. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, n.5, p. 1457-1463. 1998.

VAN DE MAELE, I.; CLAUS, A.; HAESEBROUCK, F. e DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **Vet Rec**, v.163, n.14, p. 409-13. 2008.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P. e SEHGAL, S. C. Evaluation of Lepto Dri Dot as a rapid test for the diagnosis of leptospirosis. **Epidemiol Infect**, v.129, n.3, p. 617-21. 2002.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P. e SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J Biosci**, v.33, n.4, p. 557-69. 2008.

VINETZ, J. M.; GLASS, G. E.; FLEXNER, C. E.; MUELLER, P. e KASLOW, D. C. Sporadic urban leptospirosis. **Ann Intern Med**, v.125, n.10, p. 794-8. 1996.

WATT, G.; PADRE, L. P.; TUAZON, M. L.; CALUBAQUIB, C.; SANTIAGO, E.; RANOA, C. P. e LAUGHLIN, L. W. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **Lancet**, v.1, n.8583, p. 433-5. 1988.

WHO. Leptospirosis worldwide, 1999. **Wkly Epidemiol Rec**, v.74, n.29, p. 237-42. 1999.

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

WINSLOW, W. E.; MERRY, D. J.; PIRC, M. L. e DEVINE, P. L. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. **J Clin Microbiol**, v.35, n.8, p. 1938-42. 1997.

WOLGEMUTH CW, CHARON NW, GOLDSTEIN SF, GOLDSTEIN RE. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.11, n.3-5, p. 221-27, 2006.

Apêndice A – Purificação de rLipL32 e rLigBrep

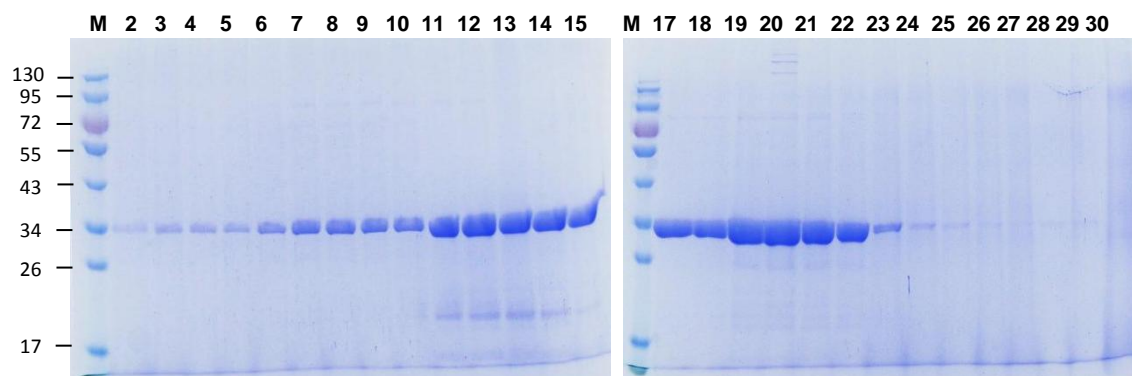


Figura 1S. Purificação da proteína rLipL32 por cromatografia de afinidade. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (2-4) proteína eluída com 10 mM de imidazol; (5-9) proteína eluída com 15 mM de imidazol; (10-15,17) proteína eluída com 30 mM de imidazol; (18-22) proteína eluída com 50 mM de imidazol; (23-27) proteína eluída com 125mM de imidazol; (28-30) proteína eluída com 500 mM de imidazol.

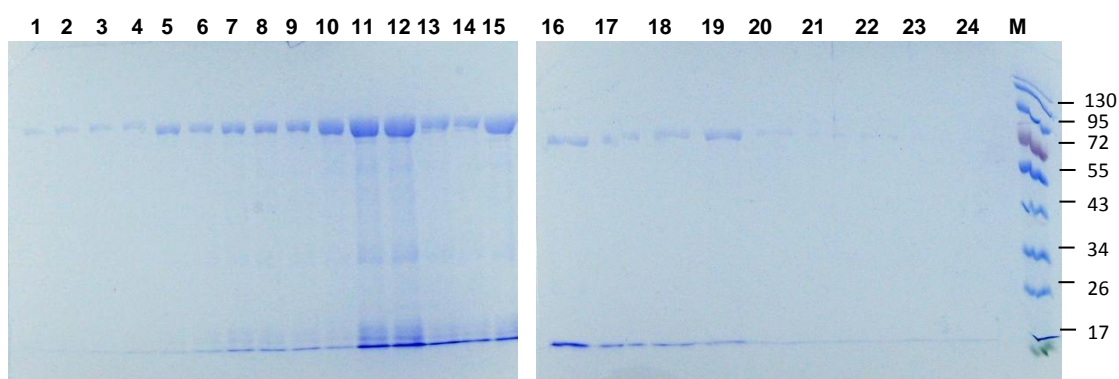


Figura 2S. Purificação da proteína rLigBrep por cromatografia de afinidade. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (1-4) proteína eluída com 10 mM de imidazol; (5-9) proteína eluída com 15 mM de imidazol; (10-15) proteína eluída com 30 mM de imidazol; (16-19) proteína eluída com 50 mM de imidazol; (20-22) proteína eluída com 50 mM de imidazol; (23-24) proteína eluída com 500 mM de imidazol.