

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



Trabalho de Conclusão de Curso

Teste de Inibição de Multiplicação: desenvolvimento de uma técnica
de correlato de imunidade para leptospirose

Vítor da Silveira Alba

Pelotas, 2019

Vítor da Silveira Alba

Teste de Inibição de Multiplicação: desenvolvimento de uma técnica
de correlato de imunidade para leptospirose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biotecnologia, do Centro de
Desenvolvimento Tecnológico da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A323t Alba, Vítor da Silveira

Teste de inibição de multiplicação : desenvolvimento de uma técnica de correlato de imunidade para leptospirose / Vítor da Silveira Alba ; Alan John Alexander McBride, orientador. — Pelotas, 2019.

40 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Leptospira. 2. Teste de inibição de multiplicação. 3. Soro. 4. Vacina. I. McBride, Alan John Alexander, orient. II. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB:
10/901

Vítor da Silveira Alba

Teste de Inibição de Multiplicação: desenvolvimento de uma técnica
de correlato de imunidade para leptospirose

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25 de novembro de 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Orientador)

Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada pela Universidade University of Manchester Institute of Science and Technology

Dra. Carolina Rodrigues Felix

Doutora em Biomedical Sciences pela Universidade University of Central Florida

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Doutor em Veterinary Sciences pela Universidade University of Wisconsin - Madison

Dedico a minha família e amigos.

Muito obrigado.

Agradecimentos

Dedico aos meus pais Ivo e Lau e as minhas irmãs Mônica e Raquel. Que me incentivaram e, apesar de não saberem muito sobre o assunto, sempre se interessaram pelo meu trabalho.

Aos meus orientadores Alan e Carolina pelas dicas e ideias que contribuíram para melhores resultados e pelos conhecimentos que me passaram.

Aos meus colegas de laboratório Liana, Gabriela, Guilherme e Elias pela ajuda, pelos incentivos, pelos almoços em conjunto e pelas risadas. Sou muito grato por tê-los próximos a mim.

Por final também queria agradecer a todos os meus colegas de classe que também passaram por momentos difíceis e me ajudaram a perceber que eu não estava sozinho e me incentivaram a continuar. Muito obrigado.

“Pode haver 100 pessoas em uma sala e 99 delas não acreditarem em você, mas basta apenas uma acreditar e isso muda toda a sua vida. ”

Stefani Germanotta

Resumo

ALBA, Vítor da Silveira. **Teste de Inibição de Multiplicação: desenvolvimento de uma técnica de correlato de imunidade para leptospirose.** 2019. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactéria de formato espiralado do gênero *Leptospira*. Anualmente, novos alvos vacinais são testados com o objetivo de se conseguir uma vacina efetiva contra o gênero. Entretanto vários animais são utilizados nestes ensaios. Deste modo é interessante a criação de protocolos de correlato de imunidade que sejam capazes de prever como será um resultado *in vivo* em um experimento *in vitro*, assim potencialmente reduzindo o número de animais utilizados em experimentos. O teste de inibição de crescimento é um potencial método de triagem visto que algumas pesquisas já mostraram que vacinas eficientes têm resultado positivo neste teste. Deste modo este trabalho objetivou testar o soro de três vacinas e também estudar variações da técnica. A metodologia consiste em inocular 10 µl de soro em diferentes diluições em 80 µl de meio EMJH mais 10 µl de *Leptospiras interrogans* cepa L1-130 na concentração 10^7 bactérias por ml. As culturas então são colocadas para crescer à 28 °C por uma semana e quantificadas usando a câmara de Petroff-Hausser em microscopia de campo escuro. Os soros testados foram o Negativo, proveniente de um animal saudável, Catalase, contra uma proteína de planta que não gera proteção contra leptospirose, Bacterina, vacina composta de leptospiros mortas, Proteína A e Proteína B, vacinas de proteínas da superfície da membrana externa do microrganismo. O único dia que obteve diferença estatística entre a vacina e o controle foi o dia 7. Também se observou que a diluição 1:10 pode ter influência de fatores secundários já que os controles negativos mostraram uma pequena taxa de inibição que poderia ser causada pela albumina, por exemplo, que é capaz de inibir a multiplicação da bactéria, dentre outros fatores. O Negativo e a Catalase obtiveram resultados negativos para inibição, algo esperado já que os animais não foram vacinados contra a doença. A Bacterina obteve resultado positivo e uma titulação de aproximadamente 1:12000. Resultado esperado já que a vacina bacterina obteve uma taxa de proteção igual a 100% quando testada em animais. Já as Proteínas A e B, apesar de possuírem taxa de proteção também igual a 100%, quando testadas em animais, elas não obtiveram resultados bons quando testadas. Isto pode se dar pelo fato de a proteção não ser gerada somente pelos anticorpos presentes no soro, mas também por outros fatores secundários (como a imunidade celular). Apesar disso ainda é interessante realizar mais experimentos com outras vacinas de subunidade contra leptospirose, como a LigB_{rep}, para ver se os resultados foram exclusivos para as proteínas A e B ou se são para todas vacinas de subunidade.

Palavras-chave: Leptospira; Teste de inibição de multiplicação; Soro; Vacina

Abstract

ALBA, Vítor da Silveira. **Multiplication Inhibition Test: development of a correlate immunity technique for leptospirosis.** 2019. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by spiral-shaped bacteria of the genus *Leptospira*. Annually, new vaccine targets are tested with the objective of getting an effective vaccine. However, several animals are used in these assays. Thus, it is interesting to create immunity correlate protocols that are able to predict what an in vivo result will look like in an in vitro experiment; thereby potentially reducing the number of animals used in experiments. Growth inhibition testing is a potential screening method as some research has shown that efficient vaccines have a positive result in this test. Thus, this work aimed to test the serum of three vaccines and to study variations of the technique. The methodology consists of inoculating 10 µl of serum at different dilutions in 80 µl of EMJH medium plus 10 µl of *Leptospira interrogans* strain L1-130 at a concentration of 10^7 bacteria per ml. The cultures are then grown to 28 °C for one week and quantified using the Petroff-Hausser chamber under dark field microscopy. The sera tested were Negative, from a healthy animal, Catalase, against a plant protein that does not generate protection against leptospirosis, Bacterin, a vaccine composed of dead leptospires, Protein A and Protein B, protein vaccines from the outer membrane surface. The only day that obtained statistical difference between vaccine and control was day 7. It was also observed that 1:10 dilution might have influence of secondary factors as negative controls showed a small inhibition rate that could be caused by albumin, for example, which is capable of inhibiting the multiplication of bacteria, among other factors. Negative and Catalase were negative for inhibition, which was expected since the animals were not vaccinated against the disease. Bacterin was positive and had a titration of approximately 1: 12000. Expected result as the bacterin vaccine obtained a protection rate of 100% when tested on animals. Proteins A and B, while having a protection rate of 100% when tested on animals, did not obtain good results when tested. This may be because protection is not only generated by antibodies present in the serum, but also by other secondary factors (such as cellular immunity). Nevertheless, it is still interesting to conduct further experiments with other leptospirosis subunit vaccines, such as LigB_{rep}, to see if the results were unique to proteins A and B or to all subunit vaccines.

Key-words: *Leptospira*; Multiplication inhibition test; Serum; Vaccine

Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo de infecção da leptospirose	14
Figura 2	Gráfico da curva de crescimento de diferentes volumes de cultivo ..	22
Figura 3	Comparação entre a densidade celular dos grupos 100 µl 10 ⁶ e D5 100 µl 10 ⁶	23
Figura 4	Curva de crescimento do Experimento 01	24
Figura 5	Curva de crescimento do Experimento 02	26
Figura 6	Titulação do Experimento 02	26
Figura 7	Curva resultante da regressão não-linear do soro Bacterina do Dia 07 ajustado ao modelo de Gompertz	27
Figura 8	Titulação dos grupos Proteína A, Proteína B e Catalase	28

Lista de Abreviaturas e Siglas

C	Celsius
EMJH	Meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
et al.	E colaboradores
g	Gramas
lp/ml	Concentração de Leptospiras por ml
Mabs	Anticorpos Monoclonais
mg	Miligramas
MIC	Contração Mínima Inibitória
ml	Mililitros
n	Número
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)
sp.	Gênero
spp.	Espécies

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Revisão Bibliográfica	13
2.1 Histórico da Doença.....	13
2.2 Leptospirose.....	13
2.3 <i>Leptospira</i> , Cultivo e Quantificação.....	14
2.4 Teste de inibição de multiplicação de <i>Leptospira</i> sp.	15
3 Hipótese e Objetivo	17
3.1 Hipótese.....	17
3.2 Objetivos.....	17
3.2.1 Objetivo Geral.....	17
3.2.2 Objetivos Específicos.....	17
4 Materiais e Métodos	18
4.1 <i>Leptospira</i> sp.	18
4.2 Soros.....	18
4.3 Quantificação.....	19
4.4 Teste de inibição de crescimento.....	19
4.5 Piloto 01.....	20
4.6 Experimento 01.....	20
4.7 Experimento 02.....	21
4.8 Experimento 03.....	21
4.9 Taxa de Duplicação, Análises Estatísticas e Gráficos.....	21
5 Resultados e Discussão	22
5.1 Piloto 01.....	22
5.2 Experimento 01.....	23
5.3 Experimento 02.....	25
5.4 Experimento 03.....	28
5.5 Experimento 01.1.....	29
5.6 Experimento 02.1.....	29
6 Conclusão	30
Referências	31
Anexos	34

1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira*. A doença afeta principalmente trabalhadores rurais e populações pobres de países em desenvolvimento. Isto se dá pelo fato da principal forma de infecção ser a exposição da pele a água contaminada com urina de animais vetores, como o rato (COSTA et al., 2015). Também impacta o setor pecuário já que pode causar abortos em bovinos e suínos, assim reduzindo a produtividade (SANHUEZA et al., 2013).

Dados do Ministério da Saúde (2019) mostram que na última década houveram 38 mil casos confirmados de leptospirose no Brasil. Destes, 3,2 mil tiveram como desfecho o óbito do paciente. Isto resulta numa taxa de mortalidade igual a 15%. Valor superior a outras doenças como a Dengue, outra doença tropical de grande importância para o país. Fato que demonstra como a zoonose é negligenciada.

Entre alguns métodos profiláticos, se destaca a vacinação. Apesar da bacterina ser um preparo vacinal que induz uma proteção a forma letal da doença, ela não é considerada ideal por ser sorovar específica e garantir proteção de baixa duração (GRASSMANN; SOUZA; MCBRIDE, 2017). Deste modo vacinas que são de proteínas de membrana externa conservadas se tornam atrativas visto a possibilidade de gerarem uma proteção contra o gênero por completo (CONRAD et al., 2017). Entretanto para a avaliação da eficácia destas fórmulas vacinais são necessários estudos em animais, como o de Conrad (2017).

É interessante desenvolver ensaios *in vitro* que possam prever a taxa de proteção que uma vacina teria sem a necessidade de utilizar um “n” grande de animais. Assim, o teste de inibição de multiplicação se mostra como um potencial método de triagem. O ensaio é feito a partir da inoculação do soro de um animal em uma cultura de bactérias e posterior quantificação para analisar se houve ou não inibição. Trabalhos como o de Rodrigues (2013), Soto (2008), Tabata (2002) e Yan (1999) já mostraram um correlato de imunidade, em que soros de vacinas que tiveram um bom desempenho *in vitro* também tiveram um bom desempenho *in vivo*.

Além disso também poderia ser feito em testes de rotina de laboratórios que produzem vacinas. Quando as empresas produzem um novo lote, é necessário que eles façam testes para garantir a qualidade do produto.

Entretanto não existem trabalhos que explorem o protocolo do teste de inibição de multiplicação de culturas de *Leptospira* spp. com mais detalhe. Não se tem estudos que observem como o soro impacta a cinética da curva de crescimento. Não se tem pesquisas em que o soro utilizado fosse produzido a partir de uma vacina de subunidade. Deste modo o trabalho objetivou explorar a dinâmica da inibição de crescimento e testou soros de duas vacinas experimentais de proteínas de superfície da bactéria para tentar correlacionar taxa de proteção da vacina com a taxa de inibição de um cultivo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Histórico da Doença

A doença foi descrita de modo formal pela primeira vez por Adolph Weil em 1886. Deste modo foi chamada de doença de Weil (ADLER, 2015). Em 1916, Inada e colaboradores injetaram sangue de pacientes com a doença de Weil em porquinhos-da-índia. Eles conseguiram reproduzir os sintomas da doença e identificaram agente etiológico como "*Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*" (INADA et al., 1916). Subsequentemente, Inada e colaboradores realizaram diversos estudos que tinham como objetivo identificar o patógeno, modo de transmissão e sintomas. Em 1918, Noguchi propôs pela primeira vez a nomenclatura do gênero *Leptospira* (STUDY et al., 1918) visando diferenciar a espiroqueta da doença de Weil de outras, como o *Treponema*.

2.2 Leptospirose

A doença normalmente se apresenta como uma febre comum, com dores de cabeça e musculares, principalmente na panturrilha. Entretanto de 5% a 15% dos casos pode evoluir para um quadro mais grave com icterícia, disfunção hepática, insuficiência renal e hemorragia pulmonar (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Estima-se que anualmente ocorram mais de 1 milhão de novos casos no mundo resultando em aproximadamente 59 mil mortes (COSTA et al., 2015). Segundo dados do Ministério da Saúde (2019), na última década houveram 38 mil casos confirmados de leptospirose no Brasil resultando na morte de 3,2 mil pessoas.

Tem maior incidência em regiões tropicais e está associada com estações chuvosa e enchentes (ADLER; 2015). Em países subdesenvolvidos está principalmente ligada às condições precárias de saneamento básico em regiões de alta concentração populacional, como as favelas. Já em países desenvolvidos, está relacionado a viagens turísticas e práticas de atividades recreativas. Populações rurais tem uma maior exposição de risco visto que o trabalho com agricultura e pecuária proporciona contato com ambientes potencialmente contaminados com a urina de animais reservatórios (MCBRIDE et al., 2005)

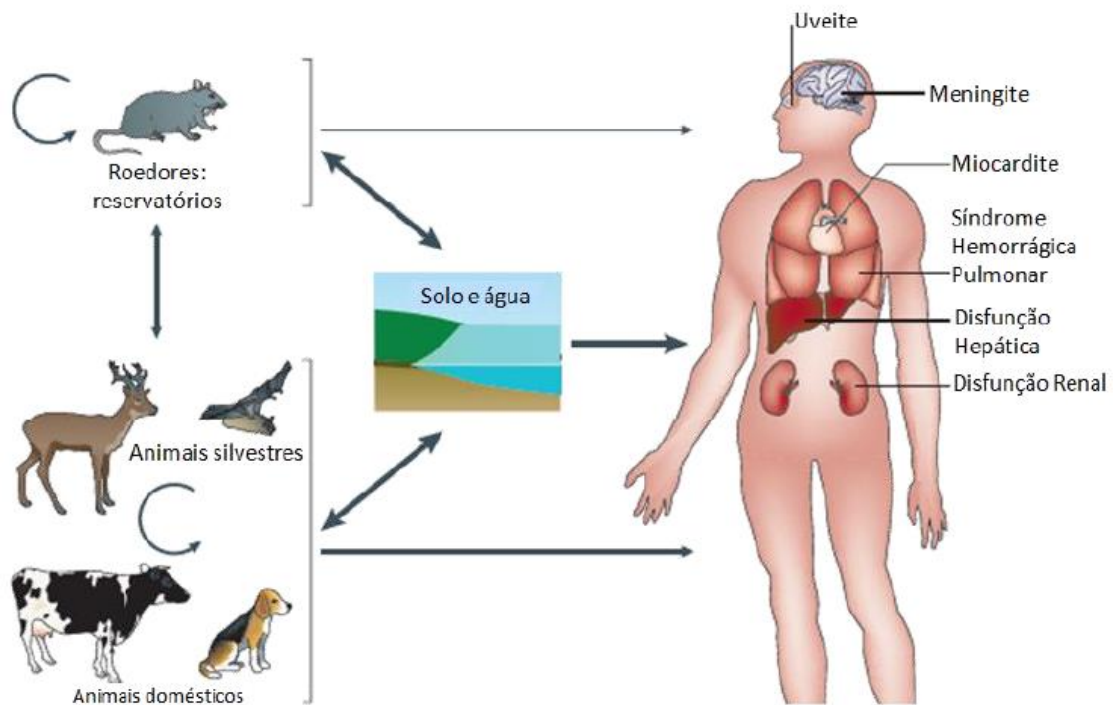


Figura 1. Ciclo de infecção da leptospirose. As espécies de mamíferos excretam leptospiras na urina e servem como reservatórios para sua transmissão. Os patógenos são mantidos em ambientes silvestres e domésticos pela transmissão entre espécies de roedores. A leptospirose é transmitida aos seres humanos pelo contato direto com os animais reservatórios ou pela exposição à água ou superfície do ambiente contaminado com a urina. As leptospiras penetram na pele desgastada ou nas membranas mucosas, entram na corrente sanguínea e se disseminam por todo o corpo. A infecção causa uma doença febril aguda durante a fase inicial 'leptospirêmica' e progride durante a fase 'imune' tardia, causando manifestações multissistêmicas graves, como disfunção hepática e icterícia, insuficiência renal aguda, síndrome da hemorragia pulmonar, miocardite e meningoencefalite. Os seres humanos são um hospedeiro acidental e não eliminam um número suficiente de leptospiras para servir como reservatórios de transmissão. Fonte: Adaptado de KO et al (2009).

Os seres humanos são hospedeiros acidentais. Como mostra a Figura 1, a transmissão da doença está associada ao contato direto com animais domésticos infectados, com a urina ou tecidos de animais reservatórios ou indiretamente por água e solo contaminado com a urina de animais reservatórios infectados. (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

2.3 *Leptospira*, Cultivo e Quantificação

As leptospiras são bactérias móveis em formato de espiral. Possuem dois flagelos periplasmáticos. Uma ou ambas de suas extremidades podem possuir formato de gancho. Tem de 10 a 20 μm de comprimento com 0,1 μm de diâmetro (ADLER, 2015). Na última década diversas espécies novas foram descritas. Atualmente o gênero conta com 64 espécies (VINCENT et al., 2019).

Em relação ao cultivo *in vitro*, o meio EMJH desenvolvido por Ellinghausen e McCullough (ELLINGHAUSEN e MCCULLOUGH, 1965) e posteriormente aprimorado por Johnson e Harris (JOHNSON e HARRIS, 1967) é mais utilizado para o cultivo de leptospiras (ADLER, 2015). A temperatura ideal para a bactéria é de 28 a 30 °C. Seu crescimento é caracterizado por ser fastidioso, demorando dias até chegar a sua densidade máxima. Para a quantificação da bactéria se recomenda a utilização da Câmara de Petroff-Hausser sob microscopia de campo escuro, visto que é uma técnica confiável capaz de diferenciar células mortas de vivas (ADLER, 2015).

2.4 Teste de inibição de multiplicação de *Leptospira* sp.

O primeiro trabalho de teste de inibição de crescimento foi publicado em 1964. Johnson e Rogers testaram o composto 8-azaguanine como um inibidor de crescimento de espécies patogênicas do *Leptospira* spp. A contagem das bactérias se deu por dispersão de luz e as amostras foram quantificadas por 9 dias (JOHNSON; ROGERS, 1964).

Durante as décadas de 1970 e 1980 poucos artigos sobre o assunto foram publicados e não foi possível acessá-los. Antes de acabar o século 20, foram publicados dois trabalhos em 1999. O de Brenner, que foi um estudo sobre características de diversas espécies, inclusive sobre a capacidade de crescerem em meio com 8-azaguanine. O método de quantificação foi visual a olho nu, se havia turbidez no tubo, realizado nos dias 7, 14, 21 e 28 (BRENNER et al., 1999).

E o de Yan, que foi um estudo envolvendo vários testes utilizando anticorpos monoclonais contra leptospiras. Dentro dessas análises de inclui a capacidade dos anticorpos inibirem o crescimento de cultivos. O protocolo era realizado com 2 ml de meio em que se adicionava 0,2 ml de anticorpos. A quantificação foi feita no 7º dia em microscopia de campo escuro utilizando o Hemocitómetro de Neubauer (YAN et al., 1999).

O trabalho também mostra que existe um certo correlato de imunidade. Os anticorpos que não foram capazes de inibir o crescimento do cultivo não geraram proteção contra a infecção quando inoculados em hamster. O que teve uma titulação de 1:100 apresentou uma taxa de sobrevivência igual a 25%. Os que obtiveram titulação 1:1000 resultaram em uma taxa de sobrevivência igual a 100% (YAN et al., 1999).

A partir dos anos 2000 se tem uma série de trabalhos de grupos brasileiros que possuem o protocolo em comum. São feitos utilizando soros de animais que foram vacinados com bacterina. O protocolo consiste em colocar 0,2 ml de soro, cujo sistema complemento era inativado previamente quando aquecido a 56 °C por 40 minutos, em um cultivo de 2,5 ml com concentração inicial próxima a 10^7 leptospiras por ml. A leitura é feita em campo escuro no 10^o dia de experimento. Os resultados são dados como soros cujo cultivos possuírem menos de 20 bactérias visíveis são positivos enquanto os que possuem mais que 20 são negativos (CORREIA; MARTINS; LILENBAUM, 2017; DE NARDI JÚNIOR et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013; SOTO et al., 2008; TABATA et al., 2002).

O trabalho de Martins, Correia e Lilenbaum também apresenta um segundo protocolo em que se usou 0,2 ml de meio ao invés de 2 ml e o ensaio foi realizado em placas de cultivo celular de 96 poços. Uma metodologia interessante considerando que isto mostra a possibilidade de se trabalhar com volumes menores e mesmo assim obter resultados relevantes.

Em 2018 foi realizado um teste de inibição com soros de uma vacina de DNA. O protocolo é semelhante ao dos pesquisadores brasileiros (GARBA et al., 2018). Este trabalho juntamente ao de Yan (1999) foram os únicos que utilizaram anticorpos/soros que são de vacinas de subunidade, mostrando que o efeito de inibição de multiplicação não é exclusivo a bacterina.

3 Hipótese e Objetivo

3.1 Hipótese

A taxa de proteção de uma vacina está proporcionalmente ligada a capacidade que o soro produzido por esta tem de inibir a multiplicação de uma cultura.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Geral

- Correlacionar a inibição de multiplicação com a taxa de proteção de uma vacina de subunidade.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética da curva de crescimento em cultivos de 100 e 250 µl;
- Observar a correlação entre a diluição do soro e a redução da multiplicação do cultivo;
- Analisar performance dos soros de vacinas de subunidade no teste.

4 Materiais e Métodos

4.1 *Leptospira* sp.

Em todos experimentos foi utilizada a espécie patogênica *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa L1-130 com uma passagem em DMC (GRASSMANN, André et al., 2015). Os cultivos foram realizados em 5 ml de meio EMJH comercial (Difco) (Anexo A) em tubos de 15 ml à 28 °C (BARBOSA, 2018).

4.2 Soros

Foram usados cinco soros. Todos eles foram produzidos e cedidos por outros pesquisadores do Programa de Pós-graduação de Biotecnologia da UFPel. Foram coletados de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da universidade (CEEA/UFPEL, n.º 8230-2017 e n.º 4336-2015,).

Os soros são: Negativo, Catalase, Bacterina, Proteína A e Proteína B. Todos não são pools e foram obtidos de apenas um animal O sangue do soro Negativo foi coletado de um animal saudável por punção cardíaca, foi incubado a 4 °C por 18h e centrifugado também a 4 °C a 5000 g por 10 minutos. Após isto, o sobrenadante (soro) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20 °C.

Os outros quatro soros foram coletados após um processo de estímulo imunológico dos animais, visando a criação de anticorpos capazes de reconhecer os antígenos. Nestes, os ratos foram inoculados com 50 µg da vacina, diluída em PBS e emulsificada em volume equivalente de adjuvante de Freund (primeira dose com adjuvante completo e demais doses com incompleto) pela via intraperitoneal. Os inóculo possuíram um intervalo de três semanas entre a primeira e segunda dose e duas semanas entre as demais 3 doses (SOUZA, 2017).

A Catalase é referente a enzima α -catalase de arroz. Ela foi usada como um segundo negativo visando comparar se existisse diferença entre o soro de um animal saudável (Negativo) de um soro hiperimune em que o animal foi inoculado com doses de 50 µg da enzima por várias semanas com uma proteína vegetal que não gera proteção contra leptospirose (Catalase). A Bacterina é um preparo de células mortas (*L. interrogans* cepa L1-130) que foram inativadas quando incubadas por 30 minutos a 56° C. É o controle positivo já que é esperado que uma vacina feita da própria bactéria e que tem uma taxa de proteção igual a 100% tenha a melhor

performance no teste. As proteínas A e B são proteínas da leptospira com potencial vacinal que já foram testados e obtiveram taxa de proteção igual a 100%.

4.3 Quantificação

As contagens foram executadas utilizando a câmara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific) em microscopia de campo escuro, a metodologia recomendada para quantificar leptospiros (ADLER, 2015).

A técnica é realizada a partir da contagem das bactérias viáveis (móveis) dentro de um espaço da câmara. Caso tenha mais de 100 bactérias na câmara, se recomenda diluir o cultivo em 1:10, 1:100 ou 1:1000 dependendo da necessidade. A diluição ajuda a otimizar a contagem já uma alta densidade celular dificulta ou até mesmo impossibilita a técnica. As diluições são feitas em meio de cultivo EMJH comercial visando manter as condições em que as células se encontravam, previamente.

Para determinar a concentração final de microrganismos por mililitro se faz: média das contagens X taxa de diluição X 50000. A última multiplicação é feita por causa do fator da câmara, em que se considera cada uma bactéria contada igual a 50000 em 1 ml do cultivo.

4.4 Teste de inibição de crescimento

Apesar dos experimentos terem diferenças em seus desenhos e objetivos, todos possuem alguns aspectos em comum. Foram realizados com 100 µl de cultivo e as bactérias cresceram em meio EMJH comercial à 28 °C em microtubos de 1,5 ml. Todos os grupos dos experimentos foram feitos em triplicata.

O protocolo inicia no dia 0 com a contagem de uma cultura que estava crescendo. Então é feita a sua diluição até chegar na concentração de 10^7 leptospiros por ml (lp/ml). Após isso em um novo tubo é adicionado 80 µl de meio EMJH comercial, mais 10 µl de 10^7 lp/ml, mais 10 µl de soro, totalizando 100 µl de cultivo. Então este é incubado a 28 °C e nos dias seguintes a amostra é quantificada.

Assim a concentração inicial dos tubos do experimento é igual 10^6 lp/ml. Este valor foi escolhido visto que na câmara isto equivale a 20 bactérias no campo. Deste modo há um maior espaço de detecção para observar como se comporta a inibição do crescimento.

4.5 Piloto 01

A maior parte dos artigos de testes de inibição de crescimento usavam pelo menos 600 µl de soro para fazer uma triplicata. Seria impossível reproduzi-los visto que os soros disponíveis no laboratório possuíam volumes inferiores a 500 µl. Então foi realizado um piloto com o objetivo de observar a dinâmica da curva de crescimento em culturas de 100 e 250 µl. Deste modo foram feitos 4 grupos, 3 deles sendo: 100 µl 10^6 ; 250 µl $4 \cdot 10^5$; 250 µl 10^5 . O primeiro número se refere ao volume final da cultura e o segundo a concentração inicial de leptospiras. Eles foram contados por 8 dias consecutivos.

O 4º grupo era o D5 100 µl 10^6 . Este tinha como objetivo analisar um potencial problema de cultivos em baixo volume. Visto que a cada contagem se retira 5 µl do tubo e que foram feitas contagens diárias, no final de uma semana uma amostra poderia perder até 35% do seu volume inicial. Ele é semelhante ao 100 µl 10^6 com a única diferença que foi quantificado somente no dia 5 e não durante 8 dias consecutivos. Após isto foi feito um teste T para confirmar se existe diferença entre um cultivo que perdeu 25% de seu volume ao longo de 5 dias e um que só foi quantificado no quinto dia.

4.6 Experimento 01

Todos os próximos experimentos foram realizados como descritos pelo ponto 4.4. O Experimento 01 foi feito de forma mais ampla, com diversos grupos e diluições, para tentar avaliar os possíveis resultados esperados e o desempenho dos controles.

O ensaio contou com 5 grupos: Bacterina, Catalase, Negativo, Controle e Antibiótico. Os três primeiros são referentes aos grupos com soro, o Controle é o grupo em que foi adicionado 10 µl de meio ao invés de soro e o grupo Antibiótico foi adicionado 10 µl de Ampicilina na concentração 150 µg/µl ao invés do soro.

Os grupos dos soros também possuíam três subgrupos: as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. Essas diluições foram feitas para analisar como diferentes concentrações podem influenciar na inibição. Eles foram avaliados por 7 dias.

Foi realizado também um pós-teste, o Experimento 01.1. Devido ao limite de detecção da câmara, é impossível quantificar densidades celulares inferiores a $5 \cdot 10^4$ lp/ml. Deste modo para comprovar que cultivos que não se detectou bactérias estavam realmente com nenhuma bactéria, foi feito um pós-teste. Após o 7º dia, as

culturas das Bacterinas, Controle e Antibiótico foram homogeneizadas e 10 µl foram transferidos para um novo tubo com 90 µl de EMJH++ (caseiro) (Anexo B) (BARBOSA, 2018). Esses novos tubos foram lidos em uma lâmina comum em microscopia de campo escuro 7 dias depois para ver se houve crescimento.

A escolha de se realizar o pós teste com o meio caseiro ao invés do comercial deve-se ao fato de o caseiro ter a capacidade de recuperar cultivos com concentrações de 10^0 , enquanto o comercial possui um limite mais alto, 10^4 (BARBOSA, 2018). Assim proporcionando ao teste um menor limite de detecção.

4.7 Experimento 02

Ao analisar os resultados do Experimento 01 foi feito um novo experimento com o propósito de estudar melhor como funciona a correlação entre a concentração do soro e a taxa de inibição. Desde modo foram feitos dois grupos: Bacterina e Negativo. Dentro desses grupos existiam sete diluições: 1:100; 1:500; 1:1000; 1:2500; 1:5000; 1:10000; 1:100000. As amostras foram lidas nos dias 2, 3, 4 e 7. Foi realizado também o Experimento 02.1, um pós-teste igual ao Experimento 01.1.

4.8 Experimento 03

O experimento 03 serviu para observar como seria o desempenho de soros produzidos a partir de uma vacina de subunidade. Deste modo foram feitos quatro grupos: Proteína A; Proteína B; Catalase e Controle. Os três primeiros grupos também tiveram subgrupos com as seguintes diluições: 1:100; 1:500; 1:1000; 1:2500; 1:5000. As amostras foram lidas no dia 7.

4.9 Taxa de Duplicação, Análises Estatísticas e Gráficos

A taxa de duplicação foi calculada a partir do site *Doubling Time* (ROTH, 2006; disponível em <http://www.doubling-time.com/compute.php>). Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 7. Nos gráficos as duas barras sobre e abaixo de um ponto representam o desvio padrão do dado. Em casos em que não é possível ver as barras de desvio padrão foi devido a taxa de desvio ser baixa e visualmente menor que o próprio ponto do gráfico. Nas análises estatísticas, foi usado o valor de $p < 0,05$ para considerar dois grupos como estatisticamente diferentes.

5 Resultados e Discussão

5.1 Piloto 01

O gráfico da Figura 2 é referente a curva de crescimento de *Leptospiras interrogans* cepa L1-130 em diferentes volumes de meio e concentrações iniciais. O grupo “5 ml 10^5 ” representa uma curva padrão de *L. interrogans* crescida em 5ml de meio num tubo de fundo cônico cujo dados provem de Barbosa (2018).

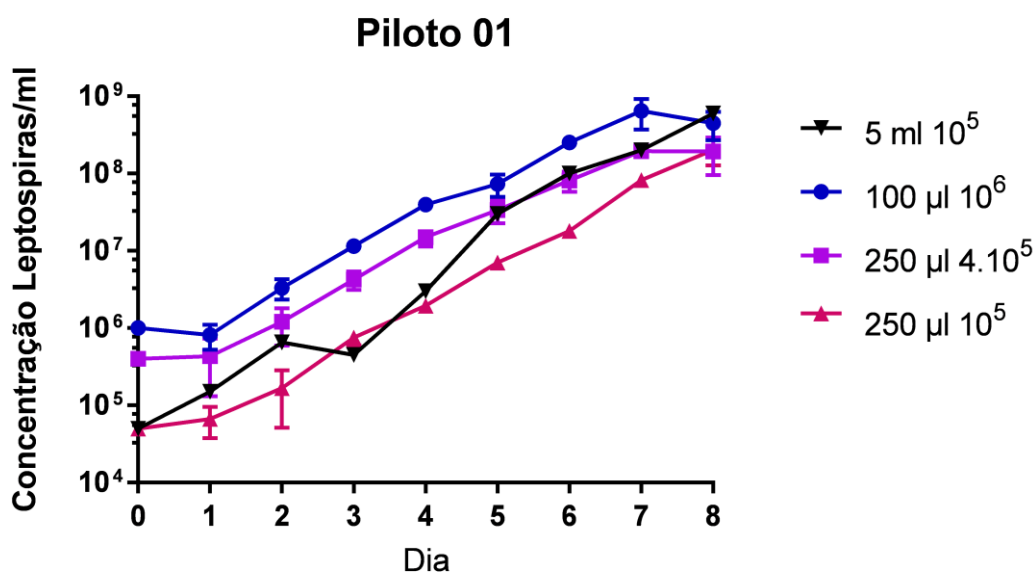


Figura 2. Gráfico da curva de crescimento de diferentes volumes de cultivo. O primeiro valor se refere ao volume de meio e o segundo a concentração do inoculo inicial. É possível observar que apesar das diferenças, os grupos atingem a concentração máxima em tempo semelhante, por volta do sétimo dia. Os dados do grupo 5 ml não foram produzidos neste experimento, mas sim anteriormente por Barbosa (2018).

A partir do software disponível do site *Doubling Time* obteve-se os resultados do tempo de duplicação de cada grupo. A taxa de duplicação dos grupos de 250 μ l foram de aproximadamente 14h, o de 100 μ l foi de 13h enquanto o de 5ml foi de 9h. Apesar de serem diferentes, é possível notar que as curvas possuem uma certa tendência de crescimento. Elas se mantêm em fase log até aproximadamente o sétimo dia e depois entram em fase estacionária. Isto sugere que o volume em que é feito o experimento não deve ter grande influência nos resultados.

Em relação ao grupo “D5 100 μl 10^6 ”, quando comparando com o “100 μl 10^6 ” (Teste T) eles não apresentaram diferença estatística ($p > 0.05$). Isto sugere que a coleta diária de amostras nos primeiros dias não afeta a curva de crescimento (Figura 3).

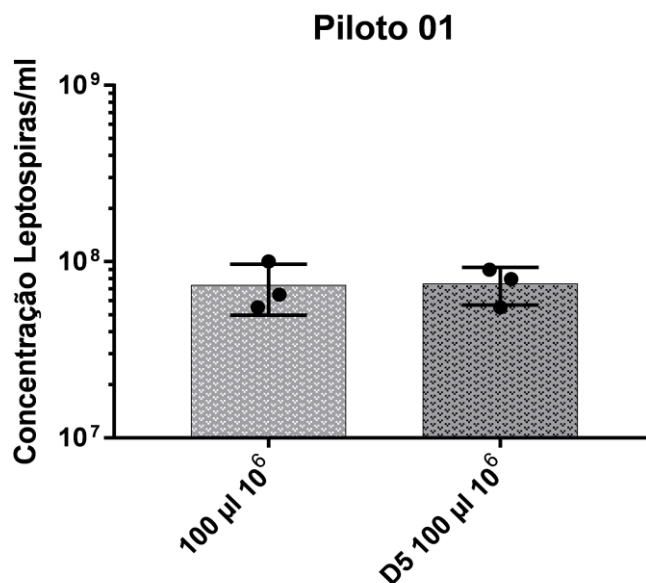


Figura 3. Comparação entre a densidade celular dos grupos 100 μl 10^6 e D5 100 μl 10^6 . O primeiro grupo foi quantificado durante 5 dias, assim no 5º dia possuía 80% do seu volume inicial. O segundo somente foi contado no dia 5. Pelo resultado é possível concluir que a retirada de volume não afeta a curva de crescimento nos primeiros 5 dias.

Apesar de haver variação entre as taxas de duplicação em diferentes volumes, as curvas se comportam de forma semelhante e as coletas de amostra não afetam o desenvolvimento do cultivo. Deste modo, foi selecionado realizar os outros experimentos com 100 μl de cultura já que é o volume que utiliza a menor quantidade de materiais e possui um padrão de crescimento semelhante aos cultivos de 5 ml.

5.2 Experimento 01

Os resultados do Experimento 01 estão representados na Figura 04 como uma curva de crescimento. Foi realizado *Two-way* Anova comparando as amostras ao controle para verificar se existia diferença estatística ($p < 0.05$) ou não entre os grupos. Até o dia 4 do experimento não é possível comprovar diferença estatística entre eles. Nos dias 5 e 6 todas as Bacterinas, o Antibiótico e a Catalase 1:10 apresentaram diferença estatística. No dia 7 tiveram os mesmos resultados do dia 6 com exceção que o Negativo 1:10 também apresentava diferença.

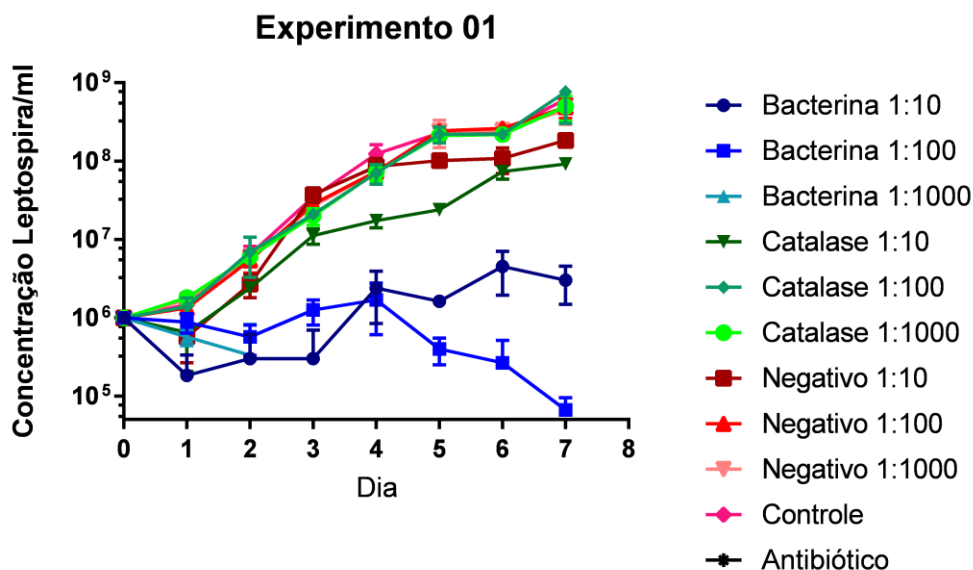


Figura 4. Curva de crescimento do Experimento 01. A primeira palavra é referente ao tipo de soro que foi utilizado o número a diluição do soro. Os grupos Controle e Antibiótico são os controles negativo e positivo, respectivamente. Pontos do grupo Antibiótico e dos dias 3 até 7 da Bacterina 1:1000 não estão presentes no gráfico visto que não foi possível detectar bactérias. É possível observar que as Bacterinas e os grupos Catalase 1:10 e Negativo 1:10 foram capazes de retardar o crescimento das leptospiras.

A partir da análise do gráfico pode-se inferir algumas coisas. Em relação ao antibiótico, visto que não foi detectado em nenhum dia, pode-se afirmar que foi possível criar uma condição que inibam por completo a multiplicação dos microrganismos. Sobre as diluições 1:10 da Catalase e do Negativo, houve um retardo de crescimento. Isto pode ser atribuído a diversos fatores. Pode ter sido causada pelo fato de que nesta diluição 10% do meio é substituído por soro. Ou também por moléculas existentes no soro capazes de inibir o crescimento das leptospiras, como a albumina (RYU; 1965).

Em relação a Bacterina, as diluições foram capazes de inibir a valores ao mínimo 1000 vezes menores que o controle. Isso se explica pelo fato de que o soro da Bacterina foi produzido a partir de uma vacina que gera proteção de 100% contra a doença. Já que a composição é a bactéria inativada, os anticorpos gerados por este preparo são capazes de reconhecer múltiplas moléculas da membrana externa e tem um maior potencial de se ligar e inibir o microrganismo.

Também é importante ressaltar dois pontos do ensaio. Primeiro que devido a performance da diluição 1:10 dos controles negativos Negativo e Catalase, a diluição 1:10 não é ideal visto que seus resultados podem ser causados não pela composição dos soros, mas sim por fatores secundários. Além disso o soro nesta

concentração possui diversas partículas brancas (debris celulares), algo que dificulta a quantificação das culturas

Segundo, o resultado observado no grupo Bacterina pode ser resultado do efeito prozona (SHIMABUKURO, 2013). Era esperado que o nível de inibição de bactérias fosse proporcional a quantidade de soro, assim quanto menor a concentração de soro menor seria a inibição. Entretanto os resultados foram o oposto. A concentração 1:10 foi a que menos inibiu enquanto a 1:1000 foi a que mais inibiu, chegando a ser indetectável a partir do dia 3. Isto levou ao desenvolvimento do Experimento 02 que tinha como função observar melhor como uma maior variedade de diferentes diluições de soro afetam a curva de crescimento da bactéria.

5.3 Experimento 02

Devido aos resultados do Experimento 01, o Experimento 02 foi feito para se ter uma maior compreensão sobre a correlação diluição do soro e taxa de inibição de crescimento. Nos gráficos das figuras 5, 6 e 7 estão os resultados do experimento.

A Figura 5 demonstra os resultados na forma de gráfico de curva de crescimento. Foi feito um *Two-Way* Anova. Os controles negativos não foram estatisticamente diferentes o que demonstra que o soro não inibe o crescimento bacteriano em concentrações menores que 1:100. As Bacterinas foram iguais ao negativo até o dia 4. No dia 7 as Bacterinas de 1:100 até 1:5000 foram iguais entre si e diferentes do Negativo enquanto as diluições 1:10000 e 1:100000 foram iguais ao negativo.

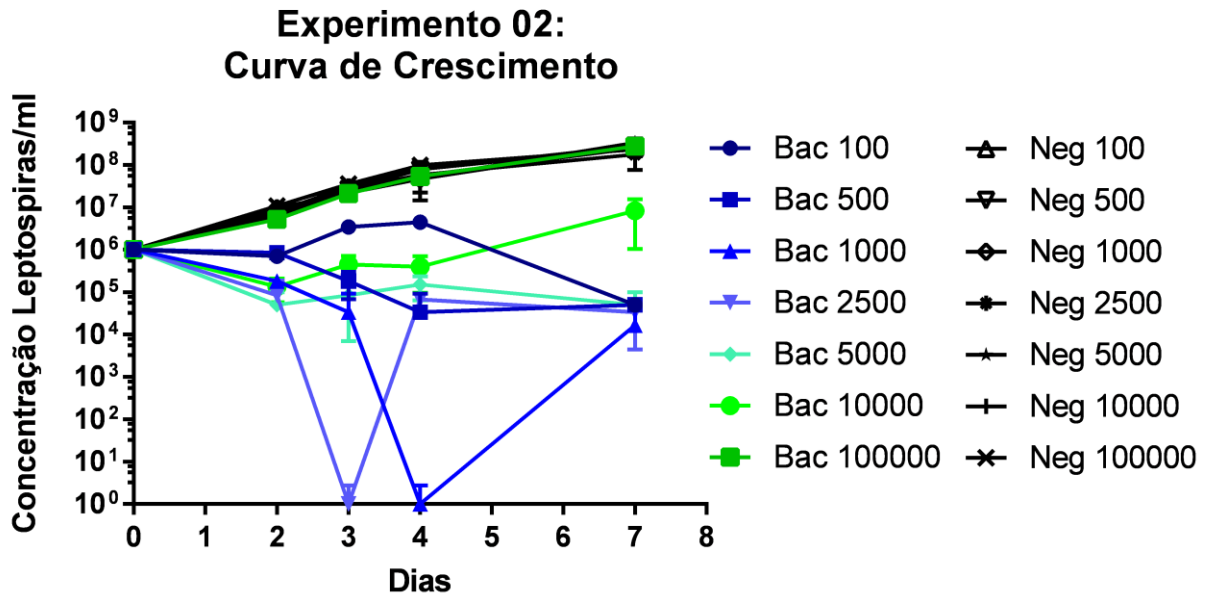


Figura 5. Curva de crescimento do Experimento 02. “Bac” se refere ao soro Bacterina e “Neg” ao Negativo. O valor ao lado é o da diluição do soro. Apesar dos resultados, o único dia que apresentou diferença estatística de forma consistente foi o dia 7. Nele as Bacterinas até a diluição 5000 foram semelhantes entre si e diferentes do restante.

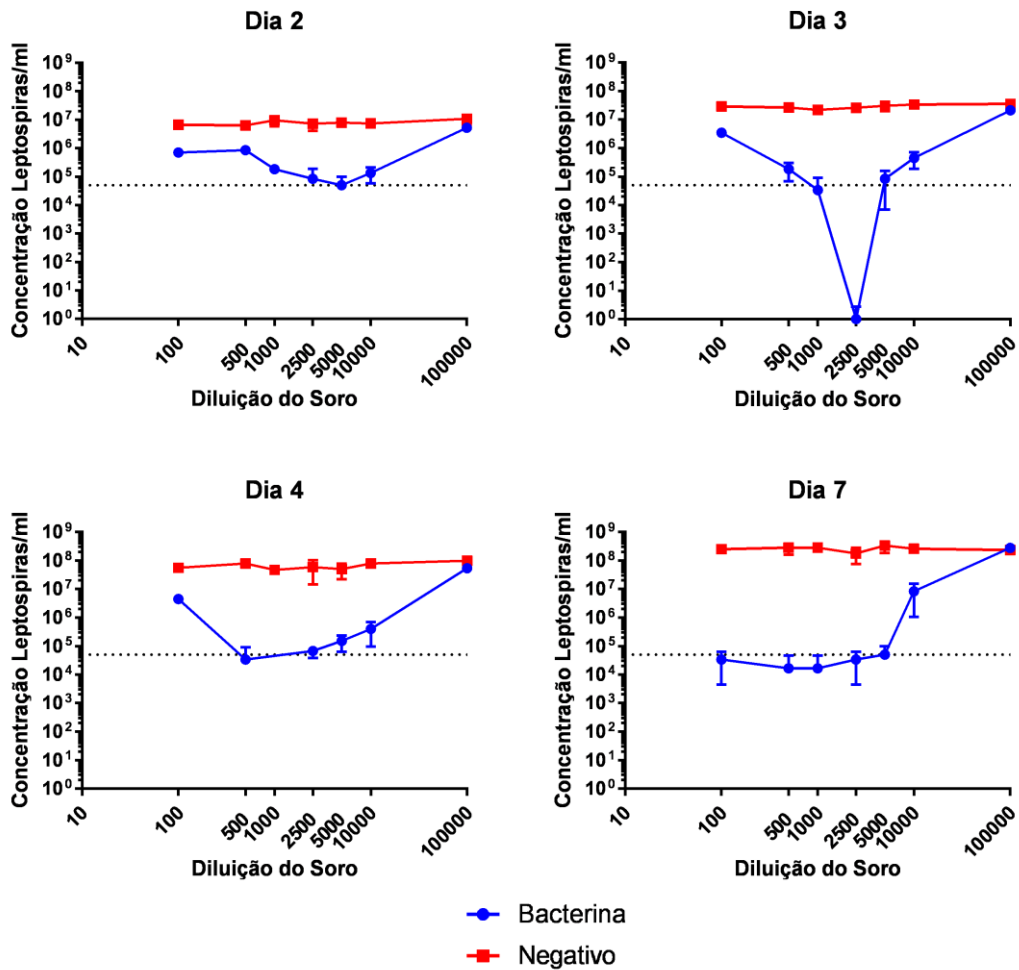


Figura 6. Titulação do Experimento 02. Cada gráfico representa o desempenho dos grupos Bacterina (azul) e Negativo (vermelho) em um dia de experimento. No dia 3 é possível observar com mais detalhe o efeito de prozona.

Na figura 6 são os mesmos resultados, entretanto demonstrados em 4 gráficos de titulação em que podemos visualizar melhor como é o comportamento da inibição de crescimento em relação a diluição do soro em cada dia. No dia 3 é possível notar o efeito de prozona. Este efeito acontece quando há um excesso de anticorpos no cultivo e isto acaba inibindo a interação antígeno-anticorpo e consequentemente impactando a reação de aglutinação (SHIMABUKURO, 2013).

Deste modo, ao invés do gráfico mostrar um padrão em que quanto maior a diluição menor é o efeito de inibição (como o do dia 7), ele mostra um padrão em forma de V em que a diluição 1:2500 possui a melhor correlação entre diluição e eficiência em inibir a multiplicação do cultivo. Isto pode indicar a possibilidade de coletar os dados no dia 3, assim reduzindo o tempo de experimento consideravelmente quando comparado ao de outros como o de Soto (2008) que se tinha um tempo de incubação de 10 dias.

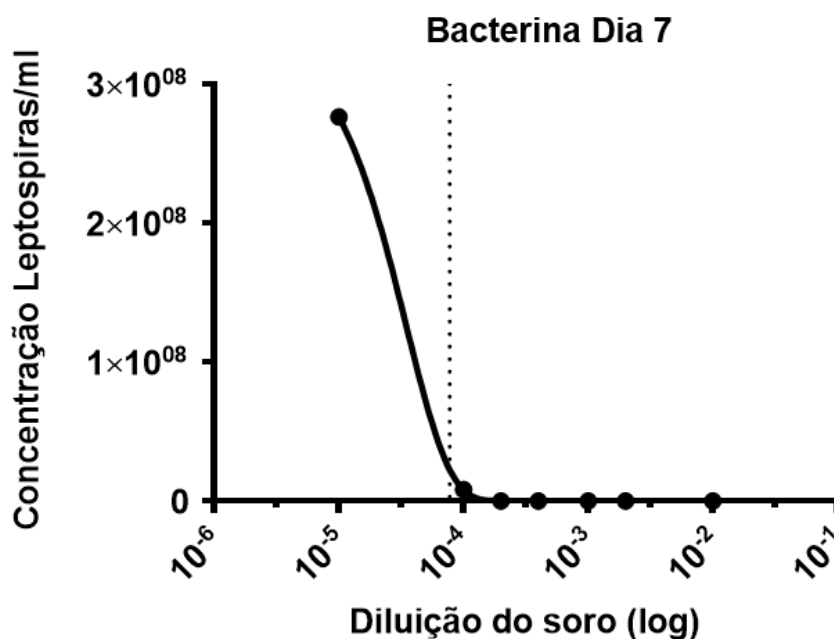


Figura 7. Curva resultante da regressão não-linear do soro Bacterina do Dia 07 ajustado ao modelo de Gompertz. A concentração inibitória mínima (MIC) foi igual a 0,00007785 que é aproximadamente a diluição 1:12800. Entretanto pela quantidade reduzida de dados os resultados são considerados ambíguos.

Devido aos resultados que mostravam um padrão consistente entre a relação diluição-inibição, foi feita uma regressão não-linear ajustada ao modelo de Gompertz com os dados para se obter a concentração mínima inibitória do soro Bacterina (Figura 7). O resultado foi de $\log(0,00007785)$, igual a aproximadamente a diluição

1:12800. Entretanto o resultado é considerado ambíguo devido à falta de um platô após o MIC.

Os resultados do Experimento 02 indicam que o Dia 7 é o mais confiável, visto que é o único que possui diferença estatística entre os soros Bacterina e Negativo. Isto deve-se ao fato de que a inibição de crescimento e a multiplicação das bactérias ocorrem de modo lento, assim sendo necessário um longo tempo de incubação para se obter resultados de boa qualidade.

5.4 Experimento 03

O gráfico abaixo apresenta os resultados do Experimento 03. O experimento foi realizado com o objetivo de verificar como seria o desempenho de soros de vacinas de proteínas da membrana externa da bactéria no teste inibição de multiplicação. Foi realizado um *Two-Way* Anova em que todos os pontos foram comparados contra todos os pontos. Não se observou diferença estatística ($p > 0.05$) em nenhum evento.

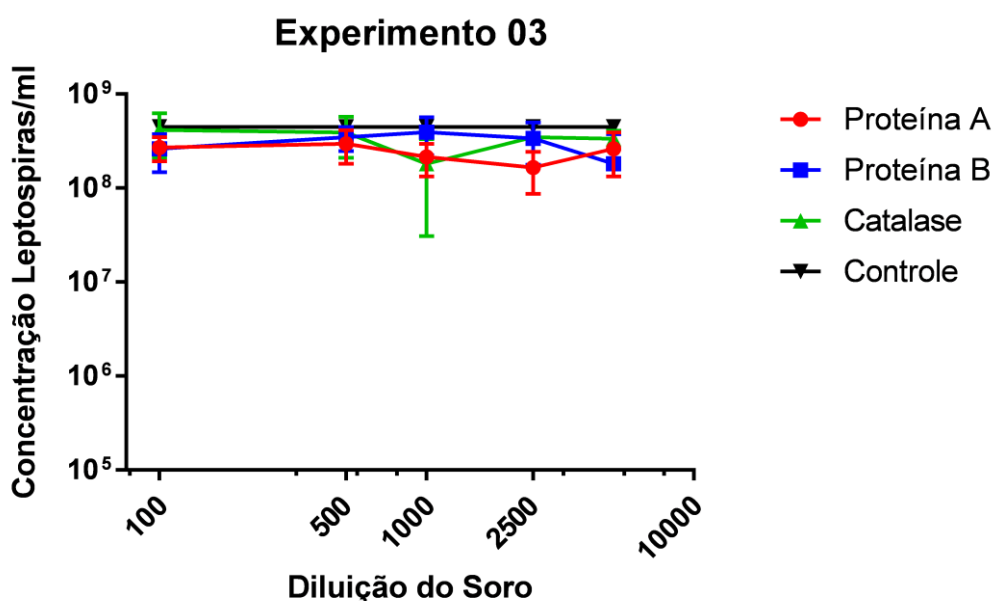


Figura 8. Titulação dos grupos Proteína A, Proteína B e Catalase. O grupo controle está representado pela linha preta que não possui diluições, mas foi estendido no gráfico para facilitar a comparação. Não se obteve diferenças estatísticas entre os grupos.

As Proteínas A e B quando testadas *in vivo* foram capazes de gerar uma taxa de proteção igual a 100% contra a doença (dados não publicados). Entretanto, no teste de inibição de crescimento não foram capazes de inibir a bactéria em nenhuma

das diluições testadas. Isto pode ser explicado pelo fato de a imunidade gerada por uma vacina não necessariamente dependa somente dos anticorpos produzidos pelo organismo, mas também de outros fatores como a imunidade celular. Assim a vacina poderia ter bons resultados quando testada *in vivo* e ter um resultado não satisfatório quando o soro do animal é testado *in vitro*.

5.5 Experimentos 01.1

O pós-ensaio do Experimento 01 foi realizado para confirmar se os grupos que não foram possíveis detectar nenhuma bactéria estavam completamente mortos ou vivos, porém com uma densidade celular menor que o limite de detecção da câmara de Petroff-Hausser. Ao fazer a leitura, não foi possível encontrar nenhum microrganismo do cultivo com antibiótico. Já todos os outros grupos foram capazes de gerar uma cultura ao introduzir uma amostra de 10 µl deles a 90 µl de meio EMJH++ (caseiro) novo.

5.6 Experimento 02.1

No Experimento 02.1 todos os grupos obtiveram resultado positivo para crescimento. Os resultados dos Experimentos 01.1 e 02.1 corroboram com as pesquisas de Tabata (2002), Rodrigues (2013), Soto (2008) entre outros. Em todos, os soros de animais vacinados com a Bacterina não foram capazes de inibir a cultura por completo, só mantiveram a densidade celular em um valor abaixo do limite de detecção da câmara.

6 Conclusão

Devido aos resultados dos experimentos podemos concluir alguns pontos. Primeiro que culturas em volumes de 100 μ l se comportam de forma semelhante as de 5 ml e podem ser usados nos experimentos de inibição de crescimento.

Também podemos concluir que a diluição 1:10 do soro traz resultados que podem ter sido influenciados por fatores secundários e, portanto, é recomendado evitá-la. Tirando essa diluição, podemos afirmar que utilizar o soro de um animal saudável (Negativo) ou de um animal que foi imunizado com uma proteína que não é relacionada a bactéria (Catalase) não faz diferença. Isso mostra que o que causa da inibição não é a condição do roedor ter sido ou não estimulado imunologicamente, mas sim a qualidade do soro.

Em relação aos dias, o Dia 3 mostrou resultados que foram influenciados pelo efeito da prozona. O Dia 7 foi o único que apresentou resultados mais consistentes e com diferença estatística. Por último também podemos observar que as Proteína A e B tiveram resultados negativos mesmo tendo taxa de proteção igual a 100% quando testadas em animais. Apesar deste resultado, deve-se realizar mais experimento com outros soros de outras vacinas, como a LigB_{rep} (CONRAD, 2017), para investigar melhor se este caso foi isolado ou é aplicável a todas as vacinas de subunidade contra a leptospirose.

Referências

ADLER, B. (2015) Leptospirosis in Humans. In: B. (eds) *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 387. Springer, Berlin, Heidelberg

BARBOSA, L. N. (2018). Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para a otimização dos estudos em leptospirose. Dissertação (Dissertação de mestrado em Biotecnologia) – UFPel. Pelotas.

BOSS, Jennifer et al. (2019) Antimicrobial susceptibility testing of *Leptospira* spp. In the Lao People's democratic Republic using disk diffusion. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n. 5, p. 1073–1078.

BRENNER, Don J. et al. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, n. 2, p. 839–858.

CONRAD, Neida L. et al. (2017). LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2017.

CORREIA, Lucas; MARTINS, Gabriel; LILENBAUM, Walter. (2017). Detection of anti-*Leptospira* inhibitory antibodies in horses after vaccination. *Microbial Pathogenesis*, v. 110, p. 494–496. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.038>>.

COSTA, F. et al. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 0–1.

DE NARDI JÚNIOR, Geraldo et al. (2010). An in vitro growth inhibition test for measuring the potency of *Leptospira* spp. Sejroe group vaccine in buffaloes. *Biologicals*, v. 38, n. 4, p. 474–478. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.02.014>>.

ELLINGHAUSEN, H. C., JR. e MCCULLOUGH, W. G. (1965). Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. *Am J Vet Res*, v.26, p. 45-51.

GARBA, Bashiru et al. (2018). Antigenic potential of a recombinant polyvalent DNA vaccine against pathogenic leptospiral infection. *Microbial Pathogenesis*, v. 124, n. March, p. 136–144. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.028>>.

GRASSMANN, André Alex; SOUZA, Jéssica Dias; MCBRIDE, Alan John Alexander. (2017). A universal vaccine against leptospirosis: Are we going in the right direction? *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. MAR, p. 1–8.

GRASSMANN, André et al. (2015). Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira interrogans* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. *Bio-Protocol*, v. 5, n. 14.

HUSNA, Mustafa; NABILAH, Ismail; WAN NOR AMILAH, Wan Abdul Wahab. (2018). Anti-microbial activity of aqueous *Quercus infectoria* gall extract against pathogenic *Leptospira*. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, v. 25, n. 4, p. 42–50.

INADA, Ryokichi et al. (1916). The serum treatment of weil's disease (spirochietosis icterohæmorrhagica). *Journal of Experimental Medicine*, v. 24, n. 5, p. 485–496.

JOHNSON, R. C. e HARRIS, V. G. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol*, v.94, n.1, p. 27-31.

JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. (1964) Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospores With 8-Azaguanine. *Journal of bacteriology*, v. 88, n. 6, p. 1618–1623

KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. (2009) *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2208>>.

MCBRIDE, A. J., et al. (2005). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, v.18, n.5, p. 376-86.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2019) Óbitos por Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019*. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/19/Casos-Lepto-18-07-2019.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2019). Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019*. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/19/Casos-Lepto-18-07-2019.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

RODRIGUES, Angela M.A. et al. (2013). Anticorpos revelados pelo teste de inibição do crescimento de leptospiras in vitro (TICL) contra os sorovares Canicola,

Icterohaemorrhagiae e Copenhageni em cães adultos revacinados anualmente com vacina comercial contendo bacterinas dos sorovares Canicol. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. 5, p. 627–634.

ROTH. (2006). Disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

SANHUEZA, J. M.; HEUER, C.; WEST, D. (2013). Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 112, n. 1–2, p. 90–98.

RYU, E. (1965) Serum fractions inhibitory to the growth of *Leptospira*s. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, v. 29, n. 11, p. 279–282.

SHIMABUKURO, Fabio Hiroto et al. (2013). Prozone effects in microscopic agglutination tests for leptospirosis in the sera of mice infected with the pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 5, p. 668–670.

SOTO, Francisco Rafael Martins et al. (2008). Comparison of agglutinating and neutralizing antibodies to serovar Hardjo in sows immunized with two commercial whole culture polyvalent anti-leptospira bacterins. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 3, p. 484–488.

SOUZA, J. D. (2017). Vacinologia reversa e estrutural: Identificação da localização celular de alvos vacinais contra leptospirose. Dissertação (Dissertação de mestrado em Biotecnologia) – UFPel. Pelotas.

TABATA, Rosana et al. (2002). Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup sejroe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 3, p. 265–268.

VINCENT, Antony T. et al. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5.

WUTHIEKANUN, Vanaporn et al. (2015). Antimicrobial disk susceptibility testing of *leptospira* spp. Using *leptospira* vanaporn wuthiekanun (LVW) agar. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 2, p. 241–243.

YAN, K. T. et al. (1999). Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 173–187.

Anexos

Anexo A – Protocolo de preparação do meio de cultura EMJH comercial

Protocolo para o preparo de meio de cultura EMJH comercial (Difco)

A – Preparação do meio base EMJH Difco

1. Adicionar 2,3g de meio base em 900ml de água ultrapura, agitando lentamente para não formar espuma.
2. Ajustar o pH para 7,4.
3. Autoclavar o meio base por 20min à 121°C.
4. Aguardar o meio base esfriar a temperatura ambiente e, adicionar assepticamente 100ml do suplemento EMJH Difco.
5. Estocar à 4°C.

Anexo B – Protocolo de preparação do meio de cultura caseiro

Protocolo para o preparo de meio de cultura EMJH caseiro (GRASSMANN, 2015)

A. Soluções estoque para o meio EMJH:

Sulfato de Zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) – Sigma cat#Z0251

0.4g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22 μ m e estocar a 4°C.

Cloreto de Cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) – Fisher cat#C-79

1,0g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22 μ m e estocar a 4°C.

Cloreto de Magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) – Fisher cat#BP214

1.0g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22 μ m e estocar a 4°C.

Cloreto de Tiamina – Sigma cat#T1270

0.5g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22 μ m e estocar a 4°C.

Vitamina B12 – Sigma cat#V-6629

0.02g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22 μ m e estocar a 4°C.

Sulfato de Manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$) – Sigma cat#8179

0.36g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22 μ m e estocar a 4°C.

Sulfato de Ferro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) – Sigma cat#F-7002

0.5g em 100ml de água ultrapura autoclavada. Preparar essa solução no dia que o suplemento for preparado. Filtrar com filtro de 0.22 μ m.

Solução de Glicerol 10% – Fisher cat#BP229

10ml em 100ml totais de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Solução de Cloreto de Amônio (NH₃Cl) 25% – Sigma cat#A-5666

25g in 100ml de água ultrapura autoclavada. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Tween 80 – Sigma cat#P-4780

20ml em 180ml de água ultrapura. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C.

Solução estoque de 5-Fluorouracil (5-FU) – Sigma cat#F6627

Dissolver 1g de 5-FU em 80ml de meio basal filtrado (ver abaixo) a 37°C durante pelo menos 1 hora. Ajustar o pH para 7.4 usando HCl 1N (filtrado) e adicionar ao meio basal para um volume final de 100ml. Filtrar com filtro de 0.22µm e estocar a 4°C. A concentração final deverá ser 10µg/ml.

Superóxido dismutase – Sigma cat#S5395-75KU

Dissolver 10mg/ml em PBS. Filtrar com filtro de 0.22µm. Adicionar 100µl (0.001g) para 100ml de suplemento.

B. Preparação do EMJH Suplemento

1. Adicionar 100g Albumina bovina fração V (Millipore Probumin® Universal Grade cat# 810037) lentamente para 500ml de água destilada. Agitar lentamente para evitar a formação de espuma. Alternativamente, adicionar o BSA a água e manter overnight a 4°C. Agitar lentamente enquanto a solução aquece sob temperatura ambiente.

Nota: A qualidade da albumina utilizada para o cultivo de leptospira é crítica. Por favor verifique se a albumina utilizada para implantação de DMC suporta o crescimento de leptospiras virulentas sob o padrão de crescimento em condições in vitro. Outras fontes de BSA foram testadas (por exemplo, Millipore Probumin® Vacina Grau Cat # 840644 e Sigma- Aldrich cat # A-9647) com resultados semelhantes.

2. Quanto a BSA estiver totalmente dissolvida, adicionar lentamente as seguintes soluções estoque, em ordem, enquanto mantém a agitação. Aguardar no mínimo 10min antes de adicionar cada reagente. Continue agitando por uma hora.

Cloreto de Tiamina	10ml
Cloreto de Cálcio	10ml
Cloreto de Magnésio	10ml
Sulfato de Zinco	10ml
Sulfato de Manganês	1ml
Sulfato de Ferro	100ml
Vitamina B12	10ml
Tween 80 (para EMJH)	125ml

3. Ajustar o pH para 7.4 com NaOH 10% (filtrado).
4. Ajustar o volume para 1L.
5. Filtrar através de unidade de filtração com filtro 0.22 μ m (Millipore Stericup[®]) e aliquotar assepticamente em tubes cônicos de 50ml. Estocar a -20°C.

C. Preparação do meio base EMJH

1. Antes de iniciar, autoclavar 1L de água ultrapura em um becker de 2L, com uma barra magnética dentro. Deixar esfriar a temperatura ambiente (pode deixar overnight em cabine de biossegurança).
2. Pesar e adicionar para 1L de água autoclavada:

Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)-Sigma cat#RES20908-A702X	1.0g
Fosfato Monopotássico (KH ₂ PO ₄) – Sigma cat#P5655	0.3g
Cloreto de Sódio (NaCl) - Sigma cat#746398	1.0g

3. Adicionar as seguintes soluções de estoque filtradas:

Glicerol 10%	1.0ml
Cloreto de Amônio 25%	1.0ml

4. Mexer até os ingredientes dissolverem totalmente.
5. Ajustar o pH para 7.4 usando NaOH 10% (filtrado).
6. Se não usar imediatamente, filtrar através de unidade de filtração com filtro 0.22 μ m (Millipore Stericup[®]) e estocar a 4°C. Pode ser usado imediatamente para a preparação do meio completo.

D. Preparação do meio EMJH Completo

1. Autoclavar 1 becker vazio de 200ml com uma barra magnética dentro.
2. Descongelar 100ml de suplemento e 10ml de soro de coelho normal (NRS) para cada 1L final de meio EMJH completo. Transferir o suplemento para o becker autoclavado.

3. Adicionar a seguir:

Lactalbumina hidrolase (BD cat#259962)	1g
Piruvato de Sódio (Sigma cat# P2256)	0.04g
Superóxido dismutase (ou adicionar 100ul da solução de estoque)	0.001g

4. Adicionar 10ml de NRS e 10ml de 5-FU solução de estoque para 100ml de suplemento.
5. Combinar 880ml de meio base EMJH e 120ml totais de suplemento + NRS + 5-FU.
6. Filtrar através de unidade de filtração com filtro 0.22 μ m (Millipore Stericup[®]).
7. Estocar a 4°C.