CRISTINA CORSI DIB

**Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real
para o controle de eficiência de bacterinas anti-leptospirose**

**São Paulo
2011**

‘CRISTINA CORSI DIB

**Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real
para o controle de eficiência de bacterinas anti-leptospirose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

27/7/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2481
FMVZ

Dib, Cristina Corsi

Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real para o controle de
eficiência de bacterinas anti-leptospirose / Cristina Corsi Dib. -- 2011.
115 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

1. Leptospirose. 2. Bacterinas. 3. Hamsters. 4. ELISA. 5. Real Time PCR.
I. Título.

ERRATA

DIB, C. C. Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real para o controle de eficiência de bacterinas anti-leptospirose. [2011. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º	115 f.	114 f.
Resumo	1º	115 f.	114 f.
Abstract	1º	115 f.	114 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real para o controle da eficiência em *bacterinas anti-leptospirose*", protocolado sob o nº1430/2008, utilizando 110 (cento e dez) hamsters, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01 de outubro de 2008.

We certify that the Research "Employment of real time polymerase chain reaction to control the efficiency of *leptospirosis bacterins*", utilizing 110 (one hundred ten), protocol number 1430/2008, under the responsibility Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DIB, Cristina Corsi

Título: Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real para o controle de eficiência de bacterinas anti-leptospirose.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico,

à minha família, por todo apoio e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos pela oportunidade de aprendizado, apoio e confiança nos últimos quatro anos.

À Amane Paldes Gonçalves, Zenaide Maria de Moraes, Gisele Oliveira de Souza, e a todos os demais pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, por todo auxílio, dedicação, aprendizado e convívio. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria acontecido.

Às pesquisadoras Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz e Dra. Ângela Silva Barbosa, e as pós-graduandas Denize e Ludmila do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, por toda a ajuda desde a produção das bacterinas, proteínas recombinantes, anticorpos, cálculos estatísticos e protocolos do ELISA. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao Dr. Paulo Lee Ho e sua equipe do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pela construção da proteína recombinante e sugestões dadas no transcorrer do experimento.

Às pesquisadoras e amigas, Simone Miyashiro e Alessandra Nassar, por todo o auxílio com as técnicas de biologia molecular, sugestões, conselhos e envolvimento em todos os processos de padronização dos ensaios de Real Time PCR e ELISA.

À Dra. Eliana Roxo, por todo apoio, confiança e compreensão durante todo o período, desde a minha chegada ao Laboratório de Tuberculose.

Às queridas Marilu e Bernadete por todo o auxílio no laboratório, pelo excelente convívio e muitas risadas durante os cafés.

À Dra. Josete Bersano e a toda a equipe do Instituto Biológico pelo apoio e pela oportunidade de continuar meu doutorado.

Aos Professores Paulo Eduardo Brandão e Fabio Gregori pelas sugestões dadas neste trabalho.

À Profª Dra. Sônia Regina Pinheiro pela oportunidade de participação e aprendizado em outros projetos.

À pesquisadora Lília Okuda e a equipe do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, por toda ajuda com o uso da máquina de Real Time PCR.

Ao Alexandre e aos pós-graduandos do Laboratório de Virologia e Imunologia Aplicada, pelo auxílio na produção da bacterina experimental.

À Iara, Tatiana, Leslie, Carlos, Cássia, Flavia, Viviane e Renata, pela ajuda, amizade e incentivo.

Ao Tung por todo carinho, incentivo e estímulo nos momentos finais.

Aos funcionários do VPS Sheila, Danival, Virgínia, Cristina, Renato, Carol, Rosana, Bispo e Tânia pelo convívio nos últimos quatro anos.

À equipe de bibliotecárias da FMVZ – USP, por todo auxílio prestado.

Às minhas queridas professoras Akemi e Julia, pelo aprendizado, compreensão e apoio.

À pesquisadora Rita Pires do Instituto de Zootecnia por todo o carinho e amizade.

À FAPESP pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

DIB, C. C. **Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real para o controle de eficiência de bacterinas anti-leptospirose.** [Employment of real time polymerase chain reaction to control the efficiency of leptospirosis bacterins]. 2011. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A estirpe Fromm de *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki foi utilizada para produção de uma bacterina experimental anti-leptospirose. A extração do RNA total utilizado para transcrição reversa e quantificação dos antígenos *LigA* e *LipL32* por PCR em Tempo Real, foi efetuada a partir de alíquotas colhidas das diluições da bacterina antes da sua inativação, as quais foram armazenadas à temperatura de -80°C. O volume restante da bacterina foi inativado em banho-maria à 56°C e mantido à temperatura de -20°C para avaliação da sua potência em hamsters bem como da detecção e quantificação dos antígenos *LigA* e *LipL32* em ensaios de ELISA Indireto e ELISA Sanduíche Indireto. Os resultados do ensaio de potência em hamsters demonstraram que a bacterina foi aprovada de acordo com as exigências dos padrões internacionais de qualidade até a diluição 1/6400, protegendo os hamsters contra a infecção letal frente ao desafio com a diluição 10^{-6} (100 doses infectantes 50%/ 0,2mL). Os resultados das reações de Real Time PCR detectaram $3,2 \times 10^3$ e $2,3 \times 10^1$ cópias do mRNA que codifica a proteína *LigA*, na bacterina pura e diluída a 1:200, respectivamente. Apenas oito cópias do mRNA que codifica a proteína *LipL32* foram detectadas na amostra de bacterina pura. Os ensaios com ELISA Indireto não detectaram a proteína *LigA* na amostra de bacterina inativada, mas demonstraram a detecção da proteína *LipL32* até a diluição 1/1600 da bacterina. Os ensaios de ELISA Sanduíche Indireto apresentaram reações cruzadas nas placas controle, e, portanto seus resultados não puderam ser considerados nas análises. Os resultados da real time PCR não puderam ser correlacionados com o teste de potência em hamsters, mas os ensaios de ELISA Indireto para a proteína *LipL32* demonstraram resultados condizentes com os apresentados pelo teste de potência em hamsters oferecendo uma possível alternativa *in vitro* para avaliação de potência de bacterinas anti-leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose. Bacterinas. Hamsters. ELISA. Real Time PCR.

ABSTRACT

DIB, C. C. **Employment of real time polymerase chain reaction to control the efficiency of leptospirosis bacterins.** [Emprego da reação em cadeia pela polimerase em tempo real para o controle de eficiência de bacterinas anti-leptospirose]. 2011. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Leptospira interrogans serovar Kennewicki strain Fromm was used for the production of a experimental leptospirosis bacterin. The extraction of total RNA used for reverse transcription and quantification of the antigens *LigA* and *LipL32* for Real Time PCR was performed from the aliquots harvested of bacterin dilutions before inactivation that were separated and maintained at -80°C. The remaining volume of bacterin was inactivated at 56°C and maintained at -20°C for the evaluation bacterin potency in hamsters and detection and quantification of *LigA* and *LipL32* antigens by Indirect ELISA assay and Indirect Sandwich ELISA. The results of potency assay in hamsters demonstrated that the bacterin was approved by the international patterns of quality until dilution 1/6400, protecting the hamsters against lethal infection challenge by the dilution 10^{-6} (100 infectious doses 50%/0,2 mL). The results of Real Time PCR detected $3,2 \times 10^3$ e $2,3 \times 10^1$ copies of mRNA that encodes the *LigA* protein, in samples of pure bacterin and diluted 1:200, respectively. Few eight copies of mRNA that encodes *LipL32* protein were detected in pure bacterin samples. Indirect ELISA assays not detected *LigA* protein in inactivated bacterin samples, but demonstrated *LipL32* protein detection until dilution 1:1600 of bacterin. Indirect Sandwich ELISA presented cross-reaction in control plates, so the results cannot be considered in the analysis. The results of real time PCR cannot be correlated with the potency assay in hamsters but Indirect ELISA assay for protein *LipL32* demonstrated that the results were suitable with the results presented by the potency assay in hamsters offering a possible *in vitro* alternative for the evaluation of leptospirosis bacterins potency.

Keywords: Leptospirosis. Bacterins. Hamsters. ELISA. Real Time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Gel de agarose a 1,5%. Visualização de banda de 330 pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostra de suspensão de tecido renal de animais sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm, sorovar Kennewicki, reação efetuada com os <i>primers</i> <i>Lep1</i> e <i>Lep2</i> – São Paulo – 2011.....	57
Figura 2 -	Gráfico das temperaturas de <i>melting</i> das amostras de DNA padrão nas concentrações 10^5 cópias/ μ L, 10^3 cópias/ μ L e 10^1 cópias/ μ L do gene <i>LigA</i> , e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela q-RT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o <i>kit</i> <i>Sybr Green</i> - São Paulo - 2011.....	59
Figura 3 -	Gráfico das temperaturas de <i>melting</i> das amostras de DNA padrão nas concentrações 10^5 cópias/ μ L, 10^3 cópias/ μ L e 10^1 cópias/ μ L do gene <i>LipL32</i> , e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela q-RT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o <i>kit</i> <i>Sybr Green</i> - São Paulo – 2011.....	61
Figura 4 -	Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com concentrações protéicas totais da bacterina experimental de 1, 2, 3 e 4 μ g/100 μ L, controle negativo e controle positivo utilizando-se a proteína recombinante <i>LigA</i> à 0,5 μ g/100 μ L - São Paulo – 2011.....	65
Figura 5 -	Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com concentrações protéicas totais da bacterina experimental de 1, 2, 3 e 4 μ g/100 μ L, controle negativo e controle positivo utilizando a proteína recombinante <i>LipL32</i> à 0,5 μ g/100 μ L - São Paulo – 2011.....	67
Figura 6 -	Valores médios de densidade óptica à 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com as amostras de bacterina experimental pura, e nas diluições 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; 1/3200; 1/6400; 1/12800; 1/25600, controle negativo (PBS) e controle positivo utilizando-se a proteína recombinante <i>LipL32</i> à 0,5 μ g/100 μ L - São Paulo - 2011.....	70
Figura 7 -	Curva padrão de quantificação da <i>LigAC</i> , obtida por meio de análise de regressão dos valores médios de od corrigidos das concentrações da proteína <i>LigAC</i> , em ensaio do tipo ELISA Sanduíche Indireto - São Paulo – 2011.....	72
Figura 8	Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com os controles da reação de ELISA Sanduíche Indireto para a proteína <i>LigA</i> - São Paulo – 2011.....	75
Figura 9	Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com os controles da reação de ELISA Sanduíche Indireto para a proteína <i>LipL32</i> - São Paulo – 2011.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de hamsters desafiados com a estirpe Pomona Fromm de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Kennewicki, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inoculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL ₅₀ de acordo com o método de Reed e Muench – São Paulo - 2011.....	53
Tabela 2 -	Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental (10 ⁹ leptospiras/mL) pura e suas diluições, sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm segundo a diluição da bacterina empregada – São Paulo – 2011.....	54
Tabela 3 -	Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental (10 ⁹ leptospiras/mL) pura e suas diluições, sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm segundo a diluição da bacterina empregada, proporção de sobreviventes ao desafio e os resultados dos ensaios efetuados para investigar a condição de portador renal de leptospiras – São Paulo – 2011.....	55
Tabela 4 -	Média de “ <i>crossing point</i> ” das amostras de DNA padrão nas concentrações 10 ⁵ cópias/μL, 10 ³ cópias/μL e 10 ¹ cópias/μL do gene <i>LigA</i> , e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela qRT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o <i>kit Sybr Green</i> - São Paulo – 2011.....	58
Tabela 5 -	Média de “ <i>crossing point</i> ” das amostras de DNA padrão nas concentrações 10 ⁵ cópias/μL, 10 ³ cópias/μL e 10 ¹ cópias/μL do gene <i>LipL32</i> , e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela qRT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o <i>kit Sybr Green</i> - São Paulo - 2011.....	60
Tabela 6 -	Proporção entre as médias de “ <i>crossing point</i> ” das amostras de bacterina pura e diluição 1/200, obtidas pela qRT-PCR, realizada com o <i>primer LigCon</i> em relação ao gene de referência 16S, pelo método de quantificação relativa básica, com o <i>kit Sybr Green</i> - São Paulo - 2011.....	62
Tabela 7 -	Proporção entre as médias de “ <i>crossing point</i> ” da amostra de bacterina pura obtida pela qRT-PCR, realizada com o <i>primer LipL32</i> em relação ao gene de referência 16S, pelo método de quantificação relativa básica, com o <i>kit Sybr Green</i> - São Paulo - 2011.....	62
Tabela 8 -	Concentração protéica dos antígenos pelo <i>kit Bradford Assay</i> , <i>BIORAD</i> , <i>Protein Assay</i> , utilizados nas reações de ELISA - São Paulo - 2011.....	64
Tabela 9 -	Valores médios de densidade óptica das concentrações de 1, 2, 3 e 4 μg de proteína da bacterina, e 0,5 μg da proteína recombinante <i>LigA</i> em 100 μL por cavidade, em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011.....	64
Tabela 10 -	Valores médios de densidade óptica das concentrações de 1, 2, 3 e 4 μg de proteína da bacterina, e 0,5 μg da proteína recombinante <i>LipL32</i> em 100 μL por cavidade, em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011.....	66

Tabela 11 -	Valores médios de densidade óptica das concentrações da proteína <i>LigAC</i> , em diluições seriadas de razão dois, obtidos com ensaios de ELISA tipo Sanduíche Indireto, para realização da curva de quantificação. Leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011.....	72
Tabela 12 -	Valores médios de densidade óptica dos diferentes controles obtidos com ensaios de ELISA tipo Sanduíche Indireto. Leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011.....	74
Tabela 13 -	Valores médios de densidade óptica dos diferentes controles obtidos com ensaios de ELISA tipo Sanduíche Indireto. Leitura realizada a 492 nm - São Paulo -2011.....	76
Tabela 14 -	Resultados da qRT-PCR, proporção de mortes entre hamsters desafiados e entre os portadores renais e os sobreviventes ao desafio com a estirpe Fromm do sorovar Kenewick no teste de potência, e valores médios de DO em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm, empregando-se amostras de bacterina inativada – São Paulo -2011.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Valores médios de densidade óptica dos diferentes controles obtidos com ensaios de ELISA Indireto para a proteína <i>LipL32</i> , leitura realizada a 492 nm - São Paulo – 2011.....	68
Quadro 2 -	Valores médios de densidade óptica das amostras de bacterina nas diluições de 1:200, 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1: 12800 e 1:25600, bacterina pura, proteína recombinante <i>LipL32</i> (0,5 µg/100 µL) e controle negativo da reação, em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011.....	69
Quadro 3 -	Valores médios de densidade óptica das amostras de bacterina nas diluições de 1:200, 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1: 12800 e 1:25600, bacterina pura, proteína recombinante <i>LipL32</i> (0,5 µg/100 µL) e controle negativo da reação, em ensaios de ELISA Sanduíche Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
CO ₂	gás carbônico
DL ₅₀	dose letal capaz de matar 50% dos animais
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
d.p.i	dias pós infecção
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay quimioluminescent
EMJH	Ellinghausen, McCullough, Jonhson e Harris
g	Grama
SAM	soroaglutinação microscópica
mL	Mililitros
rpm	rotações por minuto
ng	Nanograma
mM	Milimolar
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
μg	Micrograma
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
IgG	imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
PCR	Reação em cadeia pela Polimerase
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP	Universidade de São Paulo
VNTR	variable nucleotide tandem repeat
DO	Densidade óptica
Cp	<i>Crossing point</i>
qRT-PCR	Real Time PCR

SUMÁRIO

		Pág.
1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2	OBJETIVOS.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	PRODUÇÃO DA BACTERINA EXPERIMENTAL.....	31
3.2	HAMSTERS.....	32
3.2.1	Teste de potência da bacterina com desafio em hamsters.....	32
3.2.2	Preparação do inóculo de desafio.....	33
3.2.3	Titulação do inóculo infectante de desafio.....	33
3.2.4	Isolamento de leptospiros para o controle de infecção renal.....	33
3.2.5	Pesquisa do DNA de leptospiros pela técnica de PCR aplicada a suspensão de tecido renal.....	34
3.3	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	35
3.3.1	Diluição das amostras de RNA da bacterina.....	36
3.3.2	Extração de RNA total.....	36
3.3.3	Síntese de cDNA.....	37
3.3.4	Reação em cadeia pela polimerase.....	37
3.3.5	Estabelecimento da curva padrão.....	38
3.3.6	Quantificação absoluta dos genes <i>LigA</i> e <i>LipL32</i> (qRT-PCR).....	40
3.3.7	Quantificação relativa.....	41
3.4	ELISA (<i>Enzyme – linked immunosorbent assay</i>).....	41
3.4.1	Produção das proteínas recombinants <i>LigAC</i> e <i>LipL32</i>	42
3.4.2	Produção do anti-soro <i>LigAC</i> e <i>LipL32</i> em camundongo.....	44
3.4.3	Produção do anti-soro <i>LigAC</i> e <i>LipL32</i> em coelhos.....	44
3.4.4	Reação de ELISA.....	45
3.4.4.1	Placas.....	45
3.4.4.2	Conjugado.....	45
3.4.4.3	Bloqueio dos Ruídos.....	45
3.4.4.4	Preparo dos antígenos para a sensibilização das placas de ELISA.....	46
3.4.5	ELISA Indireto.....	46
3.4.5.1	Condições do Teste.....	47
3.4.5.2	Controles da reação de ELISA.....	47
3.5	ELISA TIPO SANDUÍCHE INDIRETO.....	48
3.5.1	Condições do teste.....	48
3.5.2	Curva padrão de concentração protéica.....	48
3.5.3	ELISA tipo Sanduíche Indireto das amostras de bacterina.....	49
3.5.4	Controles da reação de ELISA.....	50
4	RESULTADOS.....	51
4.1	CÁLCULO DO NÚMERO DE DOSES INFECTANTES EFETIVAMENTE EMPREGADAS NO DESAFIO EM HAMSTERS.....	52
4.2	RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA EM HAMSTERS DA VACINA ANTI-LEPTOSPIROSE.....	54
4.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR qRT-PCR.....	58
4.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR qRT-PCR.....	61

4.5	RESULTADOS DO ELISA.....	63
4.5.1	ELISA Indireto.....	63
4.5.1.1	Dosagem protéica do antígeno concentrado.....	63
4.6	ELISA SANDUÍCHE INDIRETO.....	71
4.6.1	Realização da Curva de quantificação com a proteína <i>LigAC</i>.....	71
5	DISCUSSÃO.....	80
5.1	PRODUÇÃO DA BACTERINA EXPERIMENTAL.....	81
5.2	QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	83
5.3	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA.....	85
5.4	ELISA.....	87
6	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXOS.....	105

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença zoonótica causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, transmitidas direta ou indiretamente dos animais ao homem (AHMED et al., 2009). A leptospirose é uma doença infecciosa emergente (LEVETT, 2001), de importância mundial (BHARTI et al., 2003) embora ocorra com mais frequência em áreas tropicais ou subtropicais devido aos altos índices pluviométricos (AHMED et al., 2009).

Existem mais de 18 diferentes espécies de leptospirosas, incluindo mais de 200 sorovares (STODDARD et al., 2009), que são identificados com base em testes de aglutinação cruzada e teste de absorção de aglutininas (SURUJBALLI; MALLORY, 2004), mas nem todas são patogênicas (STODDARD et al., 2009). Contudo, em uma dada região geográfica, apenas um pequeno número de sorovares são endêmicos, e mantidos por espécies animais consideradas como hospedeiros preferenciais (SURUJBALLI; MALLORY, 2004).

A taxonomia intraespécie das leptospirosas é bem estabelecida e baseada nos determinantes antigênicos. Desde a descrição dos sorovares em 1915, cerca de 80 sorovares foram identificados como *Leptospira interrogans sensu stricto*, entre eles, 60 sorovares são oficialmente descritos. Como cada sorovar é usualmente associado a um hospedeiro em particular, a identificação dos sorovares é essencial para estudos epidemiológicos e estratégias de prevenção (MAJED et al., 2005).

Os suínos são uma das mais importantes fontes de infecção da leptospirose para o homem e outras espécies de animais domésticos. Em geral, o suíno não apresenta sinais de infecção, mas dissemina um grande número de leptospirosas na urina por períodos de tempo superiores a um ano (MIRAGLIA et al., 2008).

No homem, a leptospirose pode ocorrer de forma esporádica ou em surtos epidêmicos. Em geral, os surtos se produzem por exposição a águas contaminadas pela urina de animais infectados. Vários grupos ocupacionais são especialmente expostos, tais como trabalhadores de arrozais, canaviais, minas, matadouros, tratadores de animais e médicos veterinários (ACHA; SZYFRES, 2001).

As leptospirosas invadem o organismo do hospedeiro através da pele lesada e das membranas mucosas. Decorrido um período de incubação variável com o sorovar e dose infectante, as leptospirosas circulam no sangue, e em algumas ocasiões, são observados os sinais clínicos agudos da infecção: febre, icterícia, hemoglobinúria e insuficiência renal. O aparecimento de anticorpos circulantes coincide com o desaparecimento das leptospirosas do

sangue e resolução dos sinais clínicos agudos. Contudo, as leptospiplas podem persistir nos rins, trato reprodutivo, câmara anterior do olho e sistema nervoso e podem ser eliminadas pela urina, sêmen e corrimentos vaginais de animais infectados durante meses a anos. Os animais persistentemente infectados são importantes reservatórios da infecção para outros animais e inclusive para o homem (ALT; BOLIN, 1996).

O suíno é um reservatório muito importante do sorovar Pomona, com uma leptospiplúria abundante e prolongada. Em sua forma clínica, a infecção varia de uma granja a outra (ACHA; SZYFRES, 2001). Estudos sorológicos prévios conduzidos no Brasil identificaram o sorovar Pomona como o mais prevalente em suínos (MIRAGLIA et al., 2008).

A forma crônica da infecção de suínos por leptospiplas é a mais frequente e está associada a desordens reprodutivas, incluindo abortamentos, mortalidade neonatal, nascimentos prematuros e natimortalidade. O aumento nas perdas reprodutivas e no intervalo entre partos ou uma redução no tamanho de leitegadas, também são observados, podendo inclusive ocorrer a infertilidade temporária ou esterilidade permanente das porcas (RAMOS; SOUZA; LILENBAUM, 2006).

Em granjas de suínos recém-infectadas, o número de abortamentos pode chegar a mais de 20%, acometendo usualmente as fêmeas jovens e recém-adquiridas. As fêmeas mais velhas geralmente são imunes. Entretanto, na primeira ocorrência da doença no plantel, todas as faixas etárias podem abortar (SOTO et al., 2007). O abortamento pode ocorrer entre 15 a 30 dias após a infecção. A infecção durante o último terço da prenhez é o fator mais crítico para a ocorrência de abortamento (ACHA; SZYFRES, 2001).

A relação entre fêmeas suínas soropositivas para diversos sorovares de leptospipla com a diminuição de parâmetros reprodutivos tem sido demonstrada. O sorovar Bratislava foi associado à subfertilidade e redução do número de leitões nascidos por leitegadas (BOQVIST et al., 2002). A infertilidade, com a ocorrência de abortamentos e natimortos, é comum em granjas infectadas pelos sorovares Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae (SOTO et al., 2007). Este último também já foi associado ao aumento na incidência de leitões fracos (BOQVIST et al., 2002), enquanto o sorovar Pomona foi associado a perdas dramáticas, incluindo fetos mumificados e natimortos (RAMOS et al., 2006).

O diagnóstico definitivo da leptospirose necessita do suporte laboratorial. O cultivo bacteriológico de rotina de leptospiplas pode consumir até quatro meses, com posterior sorotipificação para a identificação dos microrganismos isolados. O diagnóstico sorológico pelo teste de soroaglutinação microscópica (SAM) é o mais utilizado, porém apresenta algumas desvantagens que incluem: necessidade de culturas vivas de leptospiplas, baixa

sensibilidade nos estágios iniciais da infecção, baixa especificidade para sorovar devido a reações cruzadas (AINSWORTH; LESTER; CAPLEY, 1985) e dificuldades de padronização com subjetividade na interpretação de resultados (SURUJBALLI et al., 1997).

Após o isolamento em meio de cultura apropriado a leptospira deve ser identificada para a determinação de sorogrupo e sorovar. Recentemente um método de tipificação molecular foi desenvolvido e usado para caracterizar os sorovares de estirpes de *Leptospira interrogans*. Este método é baseado na análise por PCR do número variável de repetições em tandem (variable-number tandem repeats, da sigla VNTR). A análise do VNTR é um método altamente discriminatório para o estudo da estrutura populacional bacteriana e para caracterização de isolados de *L. interrogans*, a espécie patogênica de maior importância em saúde pública (FAGUNDES et al., 2008).

A melhor medida preventiva contra a leptospirose suína é a vacinação com bacterinas; suspensões de células bacterianas, polivalentes, compostas pelos sorovares mais frequentes em determinada região ou país (RUBY; CARDELLA; KNUDTSON, 1992; GONÇALES, 2008). Assim, as bacterinas contra leptospirose devem ser formuladas com o menor número de sorovares possível, dando-se especial destaque para aqueles grassantes na região (TABATA, 2002).

Estudos envolvendo a produção de bacterinas e o teste de potência em hamsters recomendam o emprego de concentrações que variam entre 10^8 e 10^9 células/mL (GONZÁLEZ, et al., 2005; SANCHEZ et al., 2007; SILVA et al., 2007; ZEIGLER; JONES; KUBICA, 1976) semelhante ao que ocorre em bacterinas comerciais. Estes valores são estabelecidos com base no processo de produção destas bacterinas que de forma geral, são obtidas por consecutivas centrifugações e lavagens do *pellet* de células totais, minimizando a perda de leptospiros e fazendo com que a concentração final de células no *pellet* se aproxime daquela obtida na fase logarítmica de crescimento no meio, utilizada como padrão para o desenvolvimento de bacterinas.

O hidróxido de alumínio é o adjuvante comumente empregado nas bacterinas comerciais contra leptospirose (TABATA, 2002), uma vez que a imunidade contra a infecção por leptospirose é reconhecida primariamente como humoral (KOIZUMI; WATANABE, 2005). Os antígenos precipitados ou misturados com sais de alumínio ou adsorvidos com compostos de alumínio tem sido amplamente utilizados para aumentar a resposta imune nos animais (WARREN; VOGEL; CHEDID, 1986), pois parecem agir de maneira a manter o antígeno no sítio de deposição, retardando sua adsorção; fazendo com que subsequente o antígeno liberado promova uma resposta imune secundária (VANSELOW, 1987).

As vacinas anti-leptospirose produzidas a partir de células totais inativadas tem sido muito eficazes na proteção contra a infecção letal nos animais imunizados, ainda que esta proteção seja de limitada duração e restrita a uma determinada sorovariedade ou no máximo entre os membros de um mesmo sorogrupo. Contudo, na avaliação da eficácia de uma vacina anti-leptospirose deve ser distinguida a proteção contra a infecção letal (morte) da proteção contra o estabelecimento do estado de portador (infecção de órgãos e leptospirúria). A ausência da doença nos animais imunizados não exclui a possibilidade de que os mesmos sejam portadores assintomáticos e disseminadores do patógeno pela urina (GONZÁLEZ et al., 2005).

Zeigler; Jones; Kubica (1976) compararam a eficiência de vacinas produzidas com células totais e inativadas pelo calor, com as vacinas preparadas com o envelope externo de estirpes virulentas (Canicola Moulton e Pomona HCE) e avirulentas (Canicola Hond Utrecht IV e Pomona S-91) de *Leptospira interrogans* do sorovar Canicola e Pomona. Estes autores verificaram que os dois tipos de bacterinas preparadas com estirpes virulentas protegeram os hamsters, e que não houve colonização renal por leptospiros entre os sobreviventes ao desafio, contudo as bacterinas preparadas com estirpes avirulentas dos mesmos sorovares, a despeito de terem evitado a morte dos animais, não foram capazes de impedir a colonização dos rins dos animais que sobreviveram ao desafio. Concluíram então que a perda de virulência pode estar acompanhada por uma correspondente redução na antigenicidade, fato que foi novamente confirmado em estudos posteriores que empregaram o isolado 375 do sorovar Copenhageni (ZEIGLER; KUBICA; JONES, 1978).

Embora as leptospiros disseminem-se por vários órgãos, os tecidos do fígado e dos rins são os alvos primários da infecção. O fígado é altamente infectado durante o estágio inicial da disseminação hematogênica. A infecção persistente ocorre primariamente nos rins de animais que sobrevivem à doença aguda (HAAKE, 2006). A colonização por leptospiros dos túbulos renais proximais de longa duração das espécies mamíferas hospedeiras cria uma fonte de infecção persistente pois as leptospiros passam a ser eliminadas pela urina dos animais cronicamente infectados (FAINE, 1994; PICARDEAU et al., 2008).

Na leptospirose crônica há um equilíbrio biológico entre o hospedeiro e o parasita (MONAHAN et al., 2009). Nestas situações os hospedeiros são clinicamente assintomáticos e as leptospiros conseguem evadir-se da resposta imune do hospedeiro, colonizam os túbulos renais e são eliminadas pela urina. Em hospedeiros acidentais, pode haver uma grande variedade de sintomas clínicos, e em adição, a leptospirose aguda pode se resolver e progredir para uma infecção crônica com leptospirúria persistente. Em infecções experimentais no

Rattus norvegicus com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, durante os primeiros estágios da infecção houve extensiva disseminação para quase todos os tecidos (ATHANAZIO et al., 2008). Neste estágio de bacteremia, após terem alcançado os tecidos alvos do organismo do hospedeiro, as leptospiros virulentas podem colonizar os sítios de privilégio imunológico onde o sistema imune é menos eficiente, como é o caso dos túbulos renais (MERIEN et al., 1997). A eliminação das leptospiros dos tecidos parece ser consequência da circulação de imunoglobulinas (IgM e IgG) que podem ser detectadas nos ratos por volta de sete dias após a infecção, contribuindo para o argumento de que os rins são de alguma maneira privilegiados do ponto de vista imune, facilitando desta forma, a colonização dos túbulos renais por leptospiros (MONAHAN et al., 2009). As leptospiros avirulentas são eliminadas rapidamente, após poucos minutos depois de sua entrada no hospedeiro, por fagocitose reticuloendotelial (MERIEN et al., 1997).

A primeira classe de anticorpo detectada no soro de um animal infectado por leptospiros é a IgM. As IgGs aparecem usualmente alguns dias após e à medida que sua concentração aumenta, a concentração de IgM diminui (NEGI; MYERS; SEGRE, 1971.). A resposta de IgG embora mais lenta, persiste por períodos extensos garantindo a proteção dos animais (HANSON; TRIPATHY; KILLINGER, 1972).

A avaliação da eficiência de vacinas anti-leptospirose animal têm sido investigada (NEGI; MYERS; SEGRE, 1971.; HANSON; TRIPATHY; KILLINGER, 1972; GLOSSER et al., 1974; DOBSON; DAVOS, 1975; HUHN; BALDWIN; CARDELLA, 1975; YAN et al., 1999; GONZÁLEZ et al., 2005). Em geral, a SAM não é aceita como um bom método para a avaliação da habilidade da proteção conferida por vacinas anti-leptospirose, pois as mesmas estimulam respostas mínimas de IgM que aparecem em baixos títulos e por curtos períodos de tempo, usualmente menores que três meses (HANSON; TRIPATHY; KILLINGER, 1972; DOBSON; DAVOS, 1975). Deste modo a ausência, ou presença de baixos títulos de anticorpos aglutinantes não implica em falta de proteção, assim como a ocorrência de altos títulos não garante necessariamente resistência à infecção (NEGI; MYERS; SEGRE, 1971.).

O controle de qualidade de bacterinas anti-leptospirose requer a avaliação de potência em hamsters, que implica na vacinação destes animais com uma diluição específica da bacterina. Duas semanas após a vacinação, os hamsters são desafiados com leptospiros patogênicas e a percentagem de sobreviventes é calculada. O grande número de hamsters requeridos para os testes destes produtos e o aumento da preocupação com o bem estar animal e a saúde humana tem suscitado a busca de ensaios *in vitro* que dispensam o uso de animais (RUBY; CARDELLA; KNUDTSON, 1992).

Os testes de potência de bacterina anti-leptospirose utilizam hamsters Golden Syrian e culturas de leptospiras virulentas. O hamster Golden Syrian é o modelo animal de escolha para o estudo da leptospirose devido à sua susceptibilidade e reprodutibilidade dos resultados. A infecção disseminada e fulminante observada em hamsters é típica do padrão de hospedeiro da doença, e assim este animal passou a ser o modelo apropriado para a forma severa da doença (HAAKE, 2006).

A criação de organizações como a *Europe Convention for the Protection of vertebrates Animals and other Scientific Purposes – ETS nº123*, atualmente envolvendo 46 países e a Diretiva 86/609 da União Européia (*Council Directive 86/609/EEC*), em 1986, visa instituir políticas de controle em experimentação animal. A Convenção ETS nº123 estabelece como objetivo principal a redução do número de experimentos que utilizem animais, assim como o número de animais utilizados para esses propósitos. Estipula ainda que os países não devam realizar experimentos em animais, exceto se não existirem alternativas e que toda pesquisa sobre métodos alternativos deve ser estimulada. Da mesma forma a Diretiva 86/609 da União Européia, que conta com 25 países membros, visa reduzir o número de animais utilizados em pesquisas, bem como estimular o desenvolvimento e validação de métodos alternativos (PAIXÃO, 2007).

Ruby; Cardella; Knudtson (1992), com o objetivo de padronizar um teste de eficiência “in vitro” de bacterinas contra leptospirose, desenvolveram um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado no uso de anticorpos monoclonais sorovar específicos. Apesar de gerar resultados satisfatórios, a produção de anticorpos monoclonais é onerosa, demorada, e não exclui o uso de animais, gerando um aumento considerável no custo do teste e dificultando sua aplicação como rotina nos laboratórios, especialmente em países em desenvolvimento.

As técnicas de biologia molecular estão ocupando lacunas de sensibilidade e praticidade das outras provas utilizadas nas pesquisas com microrganismos (SOTO et al., 2007). Entre estas técnicas, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de doenças infecciosas causadas por microrganismos de crescimento lento ou fastidioso (JOUGLARD et al., 2006).

Muitos ensaios de PCR foram desenvolvidos para detectar leptospiras em espécimes provenientes de animais e de seres humanos. Em cada ensaio, diferentes métodos de preparo das amostras, *primers* e condições de amplificação têm sido utilizados. Tentativas de desenhar *primers* de PCR específicos para *Leptospira* spp têm sido efetuadas (JOUGLARD et al., 2006).

A PCR em Tempo Real (Real Time) é o último avanço na tecnologia da PCR (Polymerase Chain Reaction). Todos os testes de diagnóstico que envolvem um método molecular de amplificação, como a PCR, compreendem as etapas de extração de ácidos nucleicos de amostras biológicas, seguida de amplificação de um segmento selecionado mediante a reação em cadeia pela polimerase e de detecção dos fragmentos amplificados durante o processo. A PCR em Tempo Real associa a metodologia de PCR a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. A metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações, sendo possível o monitoramento do processo durante a reação, da quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e da quantificação deste produto durante a sua fase ótima de formação (PEREIRA; MACIEL, 2004).

Os equipamentos, destinados à realização da PCR em Tempo Real, associam um termociclador a um leitor de fluorescência que mede a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utiliza os mesmos reagentes de uma PCR convencional acrescidos de fluorocromos, intercalados em cadeia de DNA (metodologia Sybr Green). Na presença de produto amplificado, os fluorocromos, excitados por uma fonte de luz (laser), emitem um sinal proporcional à quantidade inicial de sequências-alvo presentes na reação de amplificação (PEREIRA; MACIEL, 2004).

A membrana externa e as proteínas de superfície das bactérias são as estruturas que estabelecem a interação primária com as células do hospedeiro, e, portanto muitos esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de vacinas recombinantes baseados em tais proteínas. As proteínas de membrana externa das leptospiros são de especial interesse porque as leptospiros sobrevivem fora (em água ou solo contaminado) assim como dentro do hospedeiro, e a expressão de algumas destas proteínas é regulada pela temperatura (HAAKE et al., 2006).

As bacterinas anti-leptospirose animal promovem imunidade de curta duração e há pouca proteção cruzada entre sorovares distintos. Assim a identificação de antígenos de leptospiros expressos apenas durante a infecção talvez possa ser útil tanto para o desenvolvimento de uma vacina ideal como também para o esclarecimento de importantes informações relacionadas à patogenia da infecção (HAAKE et al., 2006).

A membrana externa das leptospiros contém lipopolissacarídeos (LPS) e uma série de lipoproteínas (HAAKE et al., 2000; HAUKE et al., 2005). A *LipL32* é a principal lipoproteína de membrana, presente apenas em sorovares patogênicos. É expressa em infecções agudas e

crônicas, e é considerada um provável fator de virulência. Sua abundância, conservação, presença única nas espécies patogênicas e alta imunogenicidade são consistentes com um importante papel na patogenia e tem gerado grande interesse como um potencial reagente diagnóstico na PCR e ELISA (LEVETT et al., 2005; JOUGLARD et al., 2006).

Jougard et al. (2006), utilizando o gene *lipL32* na técnica de Nested PCR detectaram 40 cópias de genoma por reação em amostras de urina ou salina artificialmente contaminadas e, apenas dez células bacterianas por mL ou dois genomas por reação quando a técnica de PCR foi aplicada. Levett et al. (2005), também por meio do gene *lipL32*, demonstraram a alta sensibilidade analítica e especificidade da técnica de PCR em Tempo Real (Real Time PCR).

Os genes de proteínas denominados *Lig* (*leptospiral immunoglobulin-like*) são considerados um fator de virulência único para as leptospirosas patogênicas já que estão ausentes nas leptospirosas não patogênicas (PALANIAPPAN et al., 2005).

As proteínas *LigA* contêm um domínio do tipo imunoglobulina como os encontrados na intimina da *Escherichia coli* e na invasina da *Yersinia* spp (PALANIAPPAN et al., 2002). Contudo, o papel das proteínas *Lig* como adesinas ainda precisa ser caracterizado. Uma vez que a ligação das bactérias às células do hospedeiro estimula vários genes de virulência, é possível que o uso de proteínas como as *Lig* em vacinas possa oferecer um mecanismo que previna a ligação e anule a colonização das células do hospedeiro pelo microrganismo.

As proteínas *Lig* estão parcialmente associadas à superfície e podem servir de alvo para as respostas bactericidas. Recentemente, foi demonstrada a sua ligação com a fibronectina indicando que podem servir como adesinas. A imunização com as proteínas *Lig* pode possivelmente induzir a respostas de bloqueio à patogênese. Silva et al. (2007) demonstraram a capacidade protetora de um fragmento de *LigA* em hamsters desafiados com uma estirpe altamente virulenta de *L.interrogans* cuja região única carboxi-terminal de *LigA*, correspondente aos últimos seis domínios de repetição tipo imunoglobulina, continham o domínio imunoprotetor.

A descoberta do gene *LigA*, que codifica a proteína de mesmo nome presente apenas nas espécies patogênicas de leptospirosas, tem impulsionado o diagnóstico e a pesquisa de vacinas contra a leptospirose.

Muitos ensaios do tipo ELISA já foram utilizados para diagnóstico e avaliação da resposta imune em animais vacinados contra leptospirose. Palaniappan et al. (2004) empregaram as regiões conservadas e variáveis das proteínas *LigA* e *LigB* para o desenvolvimento de proteínas recombinantes, e avaliaram seu potencial diagnóstico em um ELISA cinético, utilizando soro de cães vacinados e positivos na soroaglutinação

microscópica. Os resultados demonstraram que a região conservada da proteína *LigA* e *LigB* foi capaz de identificar os animais infectados, mas não os animais vacinados, demonstrando que, as proteínas *LigA* tem a sua expressão induzida durante a infecção, não sendo possível o encontro de anticorpos contra os antígenos recombinantes nos animais vacinados.

A necessidade de vacinas anti-leptospirose que induzam uma resposta imune duradoura tem estimulado a utilização de investigações com isolamento de estirpes de leptospiras locais que possam promover uma resposta imune humoral e celular. Aliado a isto há um estímulo crescente para o desenvolvimento de técnicas alternativas ao uso de animais de laboratório, como o teste de potência utilizado para o controle de qualidade de bacterinas anti-leptospirose.

2 OBJETIVOS

- produzir uma bacterina experimental anti-leptospirose com a estirpe Fromm de *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki;
- avaliar a eficiência da bacterina experimental pelo teste de potência em hamsters;
- padronizar as técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) e ELISA para quantificação dos antígenos *LigA* e *LipL32* da bacterina experimental contra a leptospirose;
- correlacionar os resultados da qRT-PCR e dos ensaios de ELISA com os resultados do teste de proteção em hamsters.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; Laboratório de Tuberculose e Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo. O desenvolvimento das proteínas recombinantes *LipL32* e *LigAC* e a produção dos respectivos anti-soros foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

A primeira etapa do experimento consistiu na produção de uma bacterina experimental com o emprego da estirpe Pomona Fromm de *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki. A necessidade da produção de bacterinas experimentais foi constatada após a verificação de que o processo de inativação empregado nas bacterinas comerciais, que vinham sendo utilizadas até então promovia a degradação do RNA, e inviabilizava verificação da expressão das proteínas *LigA* e *LipL32*.

Após a produção da bacterina experimental, foi realizado o teste de potência da mesma em hamsters como preconizado pela Organização Internacional de Epizootias e o “Code Federal Regulation – CFR 113.101” (UNITED STATES OF AMERICA, 2006).

Concomitante à realização do teste de potência da bacterina em hamsters, alíquotas da bacterina experimental não inativadas e nas mesmas diluições que as empregadas no teste de potência, foram utilizadas para a verificação da expressão das proteínas imunogênicas *LigA* e *LipL32* por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Para quantificação das proteínas *LigA* e *LipL32*, as alíquotas de bacterina inativada foram também empregadas na realização do teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

3.1 PRODUÇÃO DA BACTERINA EXPERIMENTAL

O cultivo do antígeno vacinal *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF) virulenta foi realizado em meio líquido EMJH¹, com sete dias de crescimento a 28°C, sendo a manutenção da virulência estabilizada por passagens sucessivas em hamsters. Este antígeno foi obtido da suspensão de tecido hepático de um hamster experimentalmente infectado com a estirpe Pomona Fromm submetido à eutanásia na fase agônica da doença, cinco dias após a infecção. O fígado do animal foi colhido assepticamente e macerado na proporção de 1g de tecido hepático para 9,0mL de solução salina tamponada de Sorensen², resultando na diluição 10⁻¹. O antígeno vacinal final foi preparado a partir da diluição 10⁻². A concentração foi determinada pela contagem direta em câmara de Petroff-Hausser, para a avaliação do número de leptospiras (células bacterianas) por mL, que multiplicado pelo volume total de cultura, resultou no número de células totais.

Após a contagem a cultura foi centrifugada a 12.800g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o meio EMJH foi avaliado (por microscopia) quanto à presença de leptospiras e, constatando-se a ausência de células, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em solução salina tamponada de Sorensen (mesmo volume de cultivo) e em seguida a suspensão foi centrifugada. Ao final das três lavagens o sedimento foi ressuspensionado em solução salina tamponada de Sorensen em um volume correspondente a 10% do volume de cultivo original, resultando na concentração de 10⁹ leptospiras por mL da vacina, a seguir a suspensão foi inativada em banho maria a 56°C por 20 minutos, alíquotada e congelada a -20°C.

As amostras utilizadas para reação em cadeia da polimerase em tempo real foram retiradas do volume total das bacterinas formuladas, previamente à sua inativação.

¹ Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (DIFCO-Detroit, EUA)

² Solução tamponada de Sorensen: KH₂PO₄=1,09g; Na₂HPO₄=8,33g; água destilada=1000mL. pH final=7,6
Solução salina tamponada de Sorensen: Solução salina fisiológica 0,85%=1,840m + Solução tamponada de Sorensen=160mL. pH final=7,5

O controle de esterilidade da vacina foi efetuado no meio TSB, 24 horas de cultivo a 28° C e o controle do processo de inativação em meio de EMJH, por sete dias à 28°C. Uma alíquota da vacina inativada foi reservada em microscópio de campo escuro para o controle de possível motilidade e rompimento celular. A cada dose foi adicionada solução de hidróxido de alumínio (10,16mg Al³⁺/mL) na proporção de 10 % do volume do antígeno.

3.2 HAMSTERS

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos jovens, com 60 a 100 gramas de peso vivo, mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha, recebendo água de rede pública e ração comercial peletizada balanceada à vontade. As caixas com os hamsters foram alojadas no infectório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

3.2.1 Teste de potência da bacterina com desafio em hamsters

A eficácia da bacterina experimental foi avaliada pelo desafio de hamsters com a estirpe Pomona Fromm. Os hamsters foram distribuídos em dez grupos de dez animais: (1) grupo controle não vacinado e desafiado; tratado com uma aplicação de 0,25 mL de solução salina estéril 0,85% via subcutânea; (2) grupo vacinado com bacterina pura; (3) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:200; (4) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:400; (5) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:800; (6) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:1600; (7) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:3200; (8) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:6400; (9) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:12800; (10) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:25600. O volume de bacterina empregado por animal foi de 0,25 mL aplicado em dose única pela via subcutânea.

3.2.2 Preparação do inóculo de desafio

O desafio do teste de potência foi efetuado com a suspensão de tecido hepático colhido de hamsters experimentalmente infectados com a estirpe Pomona Fromm, comprovadamente patogênica para estes animais (TABATA, 2002; DELBEM, 2004; SOTO, 2006) a eutanásia foi realizada na fase agônica da doença. Este tecido foi macerado na proporção 1,0 g de tecido para 9,0 mL de meio líquido de EMJH modificado, resultando na diluição 10^{-1} , a partir da qual foram efetuadas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-5} até 10^{-12}). A diluição escolhida para o desafio foi a 10^{-6} esta diluição foi a correspondente a três diluições superiores a maior diluição onde foi possível a contagem de 10 a 20 leptospiras por campo microscópico, microscopia de campo escuro em aumento de 100 vezes.

3.2.3 Titulação do inóculo infectante de desafio

O cálculo do número de doses letais (DL_{50}) efetivamente empregadas no desafio foi efetuado com uma curva de titulação de dose em paralelo ao ensaio de desafio. Grupos de cinco animais foram inoculados com 0,2 mL/hamster via intraperitonal das diluições em escala geométrica de razão dez (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} e 10^{-12}) do inóculo infeccioso. Os animais foram observados diariamente durante 21 dias com retirada dos mortos por leptospirose. O cálculo da DL_{50} empregou o método de Reed e Muench (1938).

3.2.4 Isolamento de leptospiras para o controle de infecção renal

Aos 21 dias pós-infecção por leptospiras, os hamsters sobreviventes foram anestesiados em câmara de CO_2 . Os animais foram necropsiados e os seus rins foram colhidos

aspticamente em placas de Petri estéreis, pesados em balança analítica de precisão e macerados em Stomacher 80³, adicionando-se quantidade suficiente de solução salina tamponada de Sorensen para a obtenção da diluição inicial a 10^{-1} , a partir da qual foram preparadas duas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-2} e 10^{-3}). Cem microlitros por diluição foram semeados em tubos com tampa de baquelite contendo 5,0 mL de meio semi-sólido de Fletcher, dois tubos por diluição, os quais foram incubados em estufa 28-30°C por seis semanas, com observações semanais (FAVERO et al., 1997) para à verificação da formação do anel de crescimento sub-superficial (Zona de Dinger) de leptospiras (MYERS, 1985), o qual foi confirmado pela constatação efetiva da presença de leptospiras por exame em microscopia de campo escuro.

3.2.5 Pesquisa do DNA de leptospiras pela técnica de PCR aplicada a suspensões de tecido renal

Os hamsters que sobreviveram ao desafio foram eutanasiados em câmaras de CO₂ 21 dias após infecção por leptospiras. Os seus rins foram colhidos aspticamente, macerados em um homogeneizador de órgãos em 20% de peso vivo em TE (10mM de Tris HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) e as suspensões de tecido foram aliquotadas em microtubos de 2000 µL e armazenadas à -20°C até o momento da extração do ácido nucléico.

A extração do DNA bacteriano foi efetuada com a suspensão de 20% do peso vivo do rim utilizando-se isotiocionato de guanidina onde, 200µL da amostra foram adicionados a 450µL de isotiocianato de guanidina em um microtubo de 1500µL. As amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex e incubadas a temperatura ambiente por dez minutos, após esse período foi adicionado 100 µL de clorofórmio. Cada amostra foi centrifugada a 4°C a 12.000g durante cinco minutos. A fase aquosa, resultante da fase anterior, foi transferida para outro microtubo de 1500 µL, misturada com 200µL de propanol, homogeneizada por inversão e incubada por um período mínimo de duas horas a -20°C. Após

³ Biomaster –SEWARD, Lab System³

esse período, o material foi centrifugado a 4°C a 12.000g durante 30 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento resultante foi lavado com 900 µL de etanol 70%, centrifugado a 4°C a 12.000g durante dez minutos e o sobrenadante foi novamente descartado por inversão. O sedimento foi seco em placa aquecida sem agitação a 56°C por dez minutos, suspensos em 30µL de TE e novamente incubado em placa aquecida a 56°C por dez minutos. O DNA bacteriano foi mantido a -20°C até o momento do uso.

A amplificação do DNA para *Leptospira* spp foi realizada com o emprego dos *primers* *Lep1* (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e *Lep2* (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') descritos por Mérien et al. (1992), que amplificam uma região de 330pb do gene 16S rDNA. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos e extensão final 72°C por cinco minutos, realizada em termociclador. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045 M Tris-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0) . O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta com o emprego de transiluminador (320 nm) pelo sistema de foto-documentação e analisado com software 1D ImageAnalysis (Kodak Digital Science).

3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

As reações em cadeia da polimerase foram precedidas da extração do RNA total das amostras de bacterina não inativadas e diluídas conforme descrito anteriormente, seguida da reação de transcrição reversa para produção de DNA complementar (cDNA).

3.3.1 Diluição das amostras de RNA da bacterina

Foram realizadas as mesmas diluições da bacterina empregada no teste de potência, com alíquotas da bacterina não inativada, para extração do RNA total com o TRIZOL[®] LS Reagent. A partir de uma alíquota da bacterina pura, foram realizadas as demais diluições descritas no item 3.2.1.

3.3.2 Extração de RNA total

Após o processamento de diluição da amostra da vacina, foi utilizada uma alíquota de um mL por diluição para a extração de RNA total. Inicialmente, cada amostra foi submetida à centrifugação por 13000 g, na temperatura de 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o “*pellet*” ressuscitado em um mL de TRIZOL. Após a adição do TRIZOL foi adicionado 200 µL de clorofórmio, considerando-se a proporção estabelecida no protocolo de extração de cultura de 200 µL para cada um mL de TRIZOL. Os tubos foram homogeneizados em aparelho tipo Vortex por 30 segundos, e após um período de descanso de cinco minutos à temperatura ambiente, foram submetidos a mais uma etapa de centrifugação por 12000 g, à 4°C, por 15 minutos. Um volume de 400 µL da fase aquosa formada após o processo de centrifugação foi transferido para novos microtubos onde foi adicionado um volume de 0,5 mL de isopropanol, considerando-se a proporção estabelecida no protocolo de cultura de 0,5 mL de isopropanol para cada um mL de TRIZOL utilizado na etapa inicial. Os tubos foram submetidos a uma etapa de incubação por dez minutos à temperatura ambiente, seguida de mais uma etapa de centrifugação na velocidade de 12000 g, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com um mL de álcool 75%. Após mais uma etapa de centrifugação por 12000 g, a 4°C por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o depósito permaneceu em repouso por cinco a dez minutos, e a seguir, os *pellets* resultantes foram ressuscitados em 35 µL de água livre de nucleases por alíquota e armazenados à temperatura de -80°C, para preservar o RNA.

Para remoção de DNA genômico, o *pellet* de RNA total foi ressuspenso em 35 µL de água livre de nuclease e, posteriormente, foi realizada a digestão com a enzima DNase I (Fermentas) com duas unidades da enzima, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.3 Síntese de cDNA

Para síntese da fita complementar de DNA (cDNA) foi aplicado o mesmo volume (cinco µL) do RNA extraído por diluição em um total de 20 µL, sendo dois µL de *primers* randômicos a 100 ng/ µL (Invitrogen), quatro µL de dNTP a dez mM, dois µL de DTT 0,1 M e um µL de M-MLV *reverse transcriptase* (Invitrogen).

Para a reação de transcrição reversa foi fixado o volume por amostra de RNA total (cinco µL), pois as diluições utilizadas para a extração de RNA extraído foram provenientes da mesma origem (bacterina), não sendo viável a padronização da concentração das mesmas para a avaliação da curva da expressão gênica.

O ciclo de temperaturas adotado foi: inicial de dez minutos a 25°C, seguidos de uma etapa de 50 minutos à 37°C, e uma terceira etapa de 15 minutos à 70°C, após o qual o cDNA permaneceu à 4°C, até que fosse retirado do aparelho.

3.3.4 Reação em cadeia da polimerase

A Reação em Cadeia pela Polimerase foi realizada com os *primers* *LigConF/LigConR* que amplificam fragmentos de 230 pares de bases (pb) referentes ao gene da proteína *LigA* (PALANIAPPAN et al., 2005) e com os *primers* *LipL32-270F/LipL32-270R*, (LEVETT et al., 2005), que amplificam fragmentos de 423 pares de bases referentes aos genes da proteína *LipL32*.

A reação foi efetuada com o cDNA formado a partir da bacterina pura (amostra “P”), e das demais diluições. A reação foi realizada para um volume total de 50 µl, com 200 µM de cada dNTP, 5 µl de tampão 1X, 2,5 mM MgCl₂, 30 pmol por *primer* (tanto para os *primers LigConF* e *LigConR* quanto para os *primers LipL32-270F* e *LipL32-270R*), 0,5 µl de Taq polimerase e 10 µl de cDNA.

Para os *primers LigConF/LigConR*, anteriormente ao ciclo de temperaturas, foi realizada desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos e, ao final, extensão a 72°C por sete minutos. Os 30 ciclos de amplificação consistiram de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

As reações efetuadas com os *primers LipL32-270F/LipL32-270R* iniciaram com uma desnaturação à 94°C por cinco minutos, e ao final, extensão por 72°C por sete minutos. Os 35 ciclos de amplificação consistiram de desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridação à 65°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos.

Todas as reações foram realizadas em uma máquina termocicladora PTC-100 *Programmable Therma lControler (MJ Research)* e a análise dos produtos amplificados foi efetuada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,01% de brometo de etídio, com tampão de corrida TAE 1X, e visualizados sob luz ultravioleta, fotografados com o auxílio de um fotodocumentador.

3.3.5 Estabelecimento da curva padrão

Clonagem gênica para curva padrão

Foram produzidos plasmídeos recombinantes com os fragmentos dos genes *LigA* e *LipL32* para estabelecimento das curvas padrão utilizadas como referência para as reações de qRT-PCR.

Genes *LigA* e *LipL32*

O produto amplificado pelos primers *LigCon* e *LipL32* produzido pela PCR foi purificado (*QIAquick PCR purification kit protocol*) para posterior clonagem em plasmídeo pGEM-T (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após a confirmação da clonagem por sequenciamento, foi realizada a *miniprep* para purificação do plasmídeo (*WizardMinipreps DNA purification systems* - Promega).

Uma vez purificado, foi realizada a quantificação da concentração do DNA pelo espectrofotômetro *Eppendorf Biophotometer Plus*.

O cálculo do número de cópias dos genes *LigA* ou *LipL32* foi realizado seguindo-se a fórmula de Gordones et al. (2007):

$$\text{Cópias de plasmídeo}/\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração do plasmídeo recombinante em g}/\mu\text{L} \times (6,023 \times 10^{23})}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660}$$

A partir dos valores da concentração de cópias, foram realizadas diluições seriadas de razão dez para a obtenção da reta da curva padrão.

3.3.6 Quantificação absoluta dos genes *LigA* e *LipL32* (qRT-PCR)

As análises por PCR quantitativo (qRT-PCR) foram realizadas no aparelho *Light Cycler 480 Instrument* (Roche), utilizando-se o sistema *Sybr Green*, com comprovação da especificidade da reação através da análise das curvas de *melting* e eletroforese em gel de agarose 1,5% para observação da especificidade dos fragmentos amplificados.

Para as reações de qRT-PCR foram utilizados dois μL por amostra de cDNA anteriormente descrito. Foram acrescentados à reação nove μL de água livre de nuclease e 12,5 μL de *Sybr Green 2x* e 0,75 μL por *primer* a 10 μM . Cada amostra foi analisada em triplicata.

Os padrões nas concentrações 10^5 cópias/ μL , 10^3 cópias/ μL e 10^1 cópias/ μL foram utilizados em cada ciclo de reação para o traçado da reta de referência utilizada para o cálculo das concentrações dos genes expressos em cada amostra. O protocolo de reagentes seguiu o citado anteriormente, porém foi utilizado um μL por padrão e dez μL de água livre de nuclease, igualmente em triplicata.

Os ciclos de amplificação utilizados para os genes *LigA* e *LipL32* consistiram de:

- Pré-incubação: 1 ciclo

- 95° por cinco minutos

- Amplificação: 45 ciclos

- 95°C por 20 segundos
- 52°C por 20 segundos (primer *LigCon*)
- 57°C por 20 segundos (*LipL32*)
- 72°C por 20 segundos

- Temperatura de *melting*: um ciclo

- 95°C por cinco segundos

- 65°C por um minuto
 - 95°C
- Resfriamento: um ciclo
- 40°C por 30 segundos

3.3.7 Quantificação relativa

As análises de expressão gênica por PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes *LipL32* e *LigA*, foram realizadas no mesmo aparelho, com o mesmo *kit* e protocolo de amplificação descritos para a quantificação absoluta. A avaliação da quantificação relativa das amostras foi realizada empregando-se o gene 16S rRNA como gene de referência (CARRILLO-CASAS, et al., 2008). A realização dos cálculos de quantificação relativa foi efetuada com o *Software Version 1.5, LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual*, Roche.

As curvas de *melting* foram geradas pelo programa para averiguar a presença de *primer dimer* e DNA contaminante.

3.4 ELISA (*Enzyme – linked immunosorbent assay*)

Alíquotas da bacterina inativada nas mesmas diluições utilizadas no teste de potência em hamsters foram empregadas para realização do teste de ELISA Indireto, para avaliação da presença das proteínas *LigA* e *LipL32*, e estabelecimento de um ponto de corte entre as diluições, comparável ao resultado obtido no teste de potência de bacterina efetuado nos hamsters.

Para a padronização do ELISA foram produzidas as proteínas recombinantes *LigAC* e *LipL32*, posteriormente empregadas na inoculação de camundongos para a produção dos soros anti-*LigAC* e anti-*LipL32*, utilizados no ELISA. O protocolo de produção das proteínas recombinantes e seus respectivos anti-soros estão descritos nos tópicos a seguir.

3.4.1 Produção das proteínas recombinantes *LigAC* e *LipL32*

A construção pAE-*LipL32* foi efetuada com o apoio do Dr. Paulo Lee Ho do Centro de Biotecnologia e a pAE-*LigAC* pela Dra. Ângela Silva Barbosa do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Para purificação das proteínas recombinantes, colônias isoladas das transformações com as construções em pAE foram inoculadas em meio LB⁴ suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas, sob agitação de 250 rpm. O pré-inóculo foi transferido para meio fresco contendo ampicilina, na diluição 1:20. A cultura foi incubada novamente sob agitação até densidade óptica (DO) 600 nm 0,6-0,8. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de um mM de IPTG⁵ por mais três horas nas mesmas condições anteriores. As células foram colhidas por centrifugação (2.057x g por 15 minutos a 4 °C), e o sedimento bacteriano foi armazenado a -80 °C até o momento do uso.

Posteriormente, o sedimento bacteriano foi ressuspendido em cinco volumes (p/v) de tampão 20mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 8,0. A seguir, a suspensão bacteriana foi acrescida de um mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) e lisada por passagem pelo *French Pressure Cell Press* (SLM Aminco).

A suspensão resultante da lise foi centrifugada a 12.857x g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (fração solúvel) foi colhido e mantido a quatro °C até o momento da purificação. O sedimento (corpúsculos de inclusão - fração insolúvel) foi lavado duas vezes

⁴ Meio de Luria-Bertani

⁵ Isopropiltiogalactosídeo

com tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0). Amostras da fração solúvel, fração insolúvel e das lavagens foram analisadas em gel SDS-PAGE com 15% de acrilamida.

A proteína recombinante *LipL32* foi purificada da fração solúvel, com o emprego de resina de afinidade a metal (*Fast Flow Chelating Sepharose*TM, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) carregada com cinco volumes de 100 mM NiSO₄ e equilibrada com três volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM imidazol, pH 7,9). A seguir, a fração solúvel foi adsorvida à resina com fluxo 0,5 mL/min. Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada com dez volumes do tampão de ligação e 20 volumes do tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 60 mM de imidazol, pH 7,9). As proteínas recombinantes foram eluídas com seis volumes do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 1 M imidazol, pH 7,9). As proteínas purificadas foram dialisadas progressivamente contra: (i) 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, 0,1% glicina e pH 7,9; (ii) 10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1% glicina e pH 7,9; (iii) PBS com 0,1% glicina e pH 7,4.

A proteína recombinante *LigAC* foi purificada da fração insolúvel utilizando cromatografia de afinidade a metal (*Fast Flow Chelating Sepharose*TM, GE Healthcare). Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão foi ressuspenso em dez volumes (p/v) de tampão de solubilização (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 0,1% de Triton (v/v), 8 M uréia e pH 7,9) e mantido a temperatura ambiente por duas horas com agitação. Posteriormente, o solubilizado foi diluído cem vezes em 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 7,9 lentamente. Esta solução foi adsorvida (fluxo 1 mL/min) à coluna de afinidade a metal, previamente carregada com cinco volumes de 100 mM NiSO₄ e equilibrada com três volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 7,9). Para eliminação das proteínas recombinantes, eluição e diálise, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente para as proteínas purificadas a partir da fração solúvel.

O acompanhamento das etapas de purificação foi efetuado com o método microanalítico do reagente de Bradford (*Pierce Protein Research Products*, Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA). Para cada dez µL de amostra utilizavam-se 100 µL de reagente de Bradford diluído cinco vezes em PBS, numa placa de microdiluição. Como controles foram adicionados dez µL de uma solução contendo albumina numa concentração conhecida e 100 µL do tampão em que a amostra se encontrava. A concentração da proteína foi

determinada pela leitura da absorbância a 595 nm e dessa maneira as amostras foram selecionadas para análises em gel de SDS-PAGE.

As frações de todas as etapas da purificação foram colhidas e analisadas em gel SDS-PAGE com 15% acrilamida.

3.4.2 Produção do anti-soro *LigAC* e *LipL32* em camundongos

Para a produção de soro hiperimune, camundongos BALB/c fêmeas (20 a 23 g) foram imunizados subcutaneamente com 10 µg da proteína recombinante purificada, com dois reforços em intervalos de 15 dias.

Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital antes das imunizações como controle do soro (sangria zero) e após as imunizações. O sangue foi mantido a 37 °C por 30 minutos e posteriormente, o coágulo foi deslocado da parede do tubo com auxílio de um palito de madeira e centrifugado a 800 g por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi armazenado a – 20 °C.

3.4.3 Produção do anti-soro *LigAC* e *LipL32* em coelhos

Coelhos fêmeas com dois quilos de peso vivo receberam três imunizações pela via endovenosa na via marginal da orelha, com intervalo de 15 dias, de 250 µg de proteína por dose e hidróxido de alumínio como adjuvante. A sangria foi realizada 15 dias após da última imunização.

3.4.4 Reação de ELISA

3.4.4.1 Placas

Para a realização dos ensaios imunoenzimáticos, foram empregadas placas de poliestireno COSTAR[®], Corning Incorporated, NY 14831.

3.4.4.2 Conjugado

Foi empregado o anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em ovino, conjugado à peroxidase⁶, diluído na proporção de 1:5000 em tampão de diluição (MONARIS, 2011).

3.4.4.3 Bloqueio dos Ruídos

Para o bloqueio dos ruídos do teste de ELISA, foi empregado leite em pó desnatado diluído a 10% (p/v) em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 contendo 0,05% Tween 20 (ANEXO H), incubando-se a 4°C por uma hora, em volume de 200 µL por cavidade. O leite em pó desnatado também foi utilizado como componente nos tampões de diluição de anticorpos anti-*LigA* e anti-*LipL32*, anticorpo revelador (anti - IgG de camundongo) conjugado a peroxidase em concentração de 5% (p/v). Para diluição dos anticorpos anti-*LigAC* e anti-*LipL32*, e anticorpo revelador conjugado com peroxidase foi padronizada a diluição 1:5000.

⁶ Sigma-Aldrich A6782

3.4.4.4 Preparo dos antígenos para a sensibilização das placas de ELISA

Foram utilizados 0,5 µg/100 µL de proteínas recombinantes. A sensibilização das cavidades com a proteína recombinante foi utilizada como controle positivo das placas (MONARIS, 2011).

Para a padronização da concentração padrão de antígeno proveniente da bacterina, foi realizada a quantificação da concentração total de proteína em uma amostra de bacterina inativada, por meio do *kit Bradford Assay*, *BIORAD*, *Protein Assay*. A amostra foi quantificada em triplicata, e a leitura de absorbância realizada em um filtro de 595 nm. Os resultados foram utilizados para a construção de um gráfico de curva padrão. Estes resultados foram então comparados com os resultados obtidos por meio da leitura realizada com uma proteína padrão, neste caso a albumina sérica bovina, de concentração conhecida.

A padronização da concentração de antígeno da bacterina utilizada para sensibilizar as placas, foi iniciada em 0,5 µg/100 µL e aumentou gradualmente para um µg, dois µg, três µg e quatro µg/100 µL.

As reações foram lidas em aparelho leitor de microplacas modelo Readwell Plate *ELISA Plate Analyser*, *Robonik*, em um filtro de 492 nm. Os valores de absorbância foram expressos pela média aritmética de oito repetições por amostra.

3.4.5 ELISA Indireto

Nos tópicos a seguir são descritas as etapas de realização dos ensaios qualitativos.

3.4.5.1 Condições do Teste

As placas foram sensibilizadas com antígeno proveniente da diluição da bacterina ou da proteína recombinante, empregada como controle positivo da reação, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6, por 18 horas à 4°C (Anexo B). Após o bloqueio com leite desnatado, foram adicionados os soros anti-*LigA* e anti-*LipL32*, em cada placa, respectivamente, diluídos à 1:5000 em tampão de diluição, PBS 10X pH 7,4/0,01% Tween 20/1% de leite em pó desnatado (Anexo E), em volume de 100 µL por cavidade, em oito repetições de cada amostra. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora. O anticorpo revelador conjugado à peroxidase foi diluído no mesmo tampão e utilizado na mesma proporção e volume utilizados para os anticorpos anti-*LigA* e anti-*LipL32*. Como solução cromógena foi empregada a ortofenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato pH 5,0 (Anexo A), acrescida de 0,05% de peróxido de hidrogênio H₂O₂ 30% (Anexo F). Decorridos dez minutos da adição do substrato, foi adicionada a solução de bloqueio H₂SO₄ 8 N (Anexo G) em volume de 50 µL. Entre cada fase da reação, as placas foram lavadas em lavador automático de placas *Washwell Plate ELISA Washer, Robonik*[®], com 200 µL de tampão de lavagem (Anexo D) por cavidade.

3.4.5.2 Controles da reação de ELISA

Na etapa de padronização os controles da reação de ELISA incluíram: 1) controle do agente de bloqueio, que consistiu na adição da solução bloqueadora (Anexo H), e no decorrer da prova foi adicionado o anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído em 1:5000; 2) um segundo controle do agente de bloqueio, em que no decorrer da prova foi adicionado apenas o anticorpo produzido em camundongo contra a proteína de interesse, diluído em 1:5000; 3) controle de reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos em camundongos e o anticorpo revelador conjugado à peroxidase, ambos diluídos a 1:5000, que utilizou apenas o diluente para sensibilização das placas; 4) controle do conjugado que utilizou a bacterina como antígeno de sensibilização para avaliar a reatividade cruzada entre os antígenos

presentes na bacterina e os anticorpos produzidos contra as proteínas *LigA* e *LipL32*; 5) controle positivo da reação utilizou a proteína recombinante *LigA* ou *LipL32* como antígeno para sensibilização diluída à 0,5 µg/100 µL; 6) segundo controle positivo, empregou a bacterina como *coating*; e 7) controle negativo, utilizou como sensibilizante apenas o diluente para sensibilização.

Na ausência de algum reagente, foi adicionado apenas o tampão no qual este seria diluído. Os tempos de incubação e as lavagens foram mantidos.

3.5 ELISA TIPO SANDUÍCHE INDIRETO

Nos tópicos abaixo são descritas as etapas para padronização do ELISA quantitativo.

3.5.1 Condições do teste

A execução da reação de ELISA nas placas com as amostras de bacterina pura e nas diluições anteriormente citadas foi precedida do estabelecimento de uma curva padrão de quantificação, utilizando a proteína recombinante *LigAC*.

3.5.2 Curva padrão de concentração protéica

As placas foram sensibilizadas com anticorpo proveniente da imunização de coelho com a proteína recombinante *LigAC* diluindo-se as amostras de anti-*LigAC* de coelho na razão de 1/2000 escolhida em ensaio inicial de titulação, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M

pH 9,6, por 18 horas à 4°C (Anexo B). Após o bloqueio com leite desnatado, foram adicionados os antígenos constituídos pela proteína recombinante em diluições seriadas de razão dois, a partir da concentração bruta da proteína de 0,2 µg/µL, de modo a serem obtidas as concentrações de 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0 µg/µL. Após a incubação em estufa à 37°C por uma hora, e lavagem em tampão apropriado, foram adicionados o soro anti-*LigAC* em cada placa, diluído à 1:5000 em tampão de diluição, PBS 10X pH 7,4/0,01% Tween 20/1% de leite em pó desnatado (Anexo E), em volume de 100 µL por cavidade, em oito repetições de cada amostra. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora. O anticorpo revelador conjugado à peroxidase foi diluído no mesmo tampão e utilizado na mesma proporção e volume utilizados para o anticorpo anti-*LigAC*. Como solução cromógena foi empregada a ortofenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato pH 5,0 (Anexo A), acrescida de 0,05% de peróxido de hidrogênio H₂O₂ 30% (Anexo F). Decorridos dez minutos da adição do substrato, foi adicionada a solução de bloqueio H₂SO₄ 8 N (Anexo G) em volume de 50 µL. Entre cada uma das fases da reação, as placas foram lavadas em lavador automático de placas *Washwell Plate ELISA Washer, Robonik®*, com 200 µL de tampão de lavagem (Anexo D) por cavidade.

3.5.3 ELISA tipo Sanduíche Indireto das amostras de bacterina

As placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-*LigAC* de coelho, diluído na razão de 1/2000, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6, por 18 horas à 4°C (Anexo B). Após o bloqueio com leite desnatado, foram adicionados os antígenos constituídos pela bacterina pura e nas diluições anteriormente citadas, e pela proteína recombinante em cada caso, utilizada como controle positivo da reação. As etapas subseqüentes foram concluídas como descrito no tópico anterior.

3.5.4 Controles da reação de ELISA

Os controles da reação de ELISA quantitativo contaram com: 1) controle do conjugado, que consistiu da sensibilização das placas com anticorpo anti-*LigAC* produzido em coelho ou anti-*LipL32* de hamster, adição da proteína recombinante *LigAC* ou *LipL32* e o conjugado; 2) um segundo controle realizado nas mesmas condições do anterior, mas que utilizou a bacterina experimental como antígeno ao invés da proteína recombinante; 3) um terceiro controle realizado da mesma maneira que os anteriores, mas que ao invés dos antígenos, utilizou PBS; 4) controle da reatividade cruzada do anticorpo anti-*LigAC* de coelho ou anti-*LipL32* de hamster com os anticorpos anti-*LigAC* ou anti-*LipL32* produzidos em camundongo, em cada caso, e anticorpo revelador conjugado à peroxidase; 5) controle do agente de bloqueio que consistiu da adição da solução bloqueadora e, no decorrer da prova, foi adicionado o anticorpo anti-*LigAC* de camundongo ou o anticorpo anti-*LipL32* de hamster e o anticorpo revelador conjugado à peroxidase; 6) controle positivo que consistiu da sensibilização com anti-*LigAC* de coelho ou anti-*LipL32* de hamster, proteína *LigAC* ou *LipL32* recombinante, anti-*LigAC* ou anti-*LipL32* de camundongo e anticorpo revelador conjugado à peroxidase; 7) um último controle realizado da mesma forma que o anterior mas que utilizou a bacterina no lugar da proteína recombinante.

Na ausência de algum reagente foi adicionado tampão no qual o reagente seria diluído. Os tempos de incubação e as lavagens foram mantidos.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada são descritos nos tópicos abaixo:

4.1 CÁLCULO DO NÚMERO DE DOSES INFECTANTES EFETIVAMENTE EMPREGADAS NO DESAFIO EM HAMSTERS

A tabela 1 apresenta o número de hamsters desafiados com a estirpe Pomona Fromm de *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL₅₀ de acordo com o método de Reed e Muench (1938).

Tabela 1 – Número de hamsters desafiados com a estirpe Pomona Fromm de *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inoculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL₅₀ de acordo com o método de Reed e Muench – São Paulo - 2011

D *	S **	M ***	FREQÜÊNCIAS ACUMULADAS			c/(b+c)
			S (b)	M(c)	TOTAL (b+c)	(% cumulativa de mortes)
10 ⁻⁵	2	3	2	15	17	15/17 (88,23%)
10 ⁻⁶	1	4	3	12	15	12/15 (80%)
10 ⁻⁷	2	3	5	8	13	8/13 (61,53%)
10 ⁻⁸	0	5	5	5	10	5/10 (50%)
10 ⁻⁹	5	0	10	0	10	0/10 (0%)
10 ⁻¹⁰	5	0	15	0	15	0/15 (0%)
10 ⁻¹¹	5	0	20	0	20	0/20(0%)
10 ⁻¹²	5	0	25	0	25	0/25 (0%)

*D: diluição do inóculo infectante de desafio com a estirpe Pomona Fromm do sorovar Kennewicki

**S: número de animais sobreviventes à infecção por leptospiros

***M: número de mortes ocorridas em decorrência de leptospirose

Os resultados apresentados na tabela 1 demonstram que a diluição 10⁻⁸ apresentou uma proporção acumulada de mortes de 5/10 o que corresponde, portanto, ao valor de uma DL₅₀. Como a diluição empregada para o desafio foi a 10⁻⁶ o número de DL₅₀ efetivamente empregado corresponde a 100 (10⁻⁸/10⁻⁶ = 10⁻²; antilog 10⁻² = 100) o que atende as exigências do CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) (10 a 10000 DL₅₀)

4.2 RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA EM HAMSTERS DA VACINA ANTI-LEPTOSPIROSE

Na tabela 2 são apresentados os resultados do teste de potência da vacina experimental anti-leptospirose padronizada para a concentração de 10^9 leptospiras/ mL segundo a diluição da vacina utilizada na imunização.

Tabela 2- Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental (10^9 leptospiras/mL) pura e suas diluições, sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm segundo a diluição da bacterina empregada – São Paulo – 2011

Diluição da bacterina	Proporção de sobreviventes ao desafio
Pura	10/10*
1:200	10/10
1:400	10/10
1:800**	10/10
1:1600	08/10
1:3200	09/10
1:6400	09/10
1:12800	06/10
1:25600	06/10
Controle salina 0,85%	02/10

*Número de sobreviventes/ número de animais desafiados

** Diluição considerada como padrão para a aprovação de bacterina do sorovar Pomona para uso em suínos e bovinos CFR 113.101(UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

A bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiras por mL impediu a ocorrência da leptospirose em 100% dos grupos de hamsters imunizados com a vacina pura e nas diluições de 1:200 a 1:800. No grupo controle não vacinado houve a morte por leptospirose de oito dentre dez animais desafiados. Com estes parâmetros a vacina foi aprovada segundo os critérios internacionais de controle de qualidade de vacinas anti-leptospirose produzidas com o sorovar Pomona e destinadas à imunização de suínos e bovinos. Destaque-se ainda que mesmo nas diluições de 1:1600 a 1:6400, o número de sobreviventes ainda esteve dentro dos critérios mínimos exigidos para aprovação (8/10). Foi só a partir da diluição de 1:12800 que o número de sobreviventes passou a ser inferior ao limiar estabelecido (8/10).

A vacina avaliada, pura e nas diluições ensaiadas, em todas as concentrações utilizadas, foi inócua aos animais, pois não induziu reações locais ou sistêmicas, como perda de apetite, prostração ou choque anafilático e a sua inativação por calor foi eficaz.

Tabela 3- Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental (10^9 leptospiras/mL) pura e suas diluições, sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm segundo a diluição da bacterina empregada, proporção de sobreviventes ao desafio e os resultados dos ensaios efetuados para investigar a condição de portador renal de leptospiras – São Paulo – 2011

Diluição da bacterina	Proporção de sobreviventes ao desafio	Proporção de cultivos renais de sobreviventes ao desafio	Proporção de PCR do tecido renal dos sobreviventes ao desafio
Pura	10/10*	0/10	0/10
1:200	10/10	0/10	0/10
1:400	10/10	0/10	1/10
1:800**	10/10	0/10	2/10
1:1600	08/10	0/08	1/08
1:3200	09/10	0/09	0/09
1:6400	09/10	0/09	1/09
1:12800	06/10	0/04	0/04
1:25600	06/10	0/04	0/04
Salina 0,85%	02/10	0/02	0/02

*Número de sobreviventes/ número de animais desafiados

** Diluição considerada como padrão para a aprovação de bacterina do sorovar Pomona para uso em suínos e bovinos CFR 113.101(UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

A tabela 3 apresenta os resultados dos exames efetuados em animais sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm segundo a diluição da bacterina empregada. Dos animais sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm e submetidos a eutanásia para a remoção dos rins e avaliação da condição de portador renal, não foram isoladas leptospiros em nenhum dos grupos vacinados. Contudo, os resultados da PCR demonstraram a presença do DNA de leptospiros em um animal vacinado com a diluição 1:400, em dois animais vacinados com a diluição 1:800, nos quais a proporção de sobreviventes foi de 10/10, e em um animal vacinado com a diluição 1:6400, no qual a proporção de mortes foi de 09/10, sendo que todos estes grupos foram considerados aprovados segundo os critérios internacionais.

A figura 1 representa a amplificação do segmento de DNA de leptospira, com os primers *Lep1* e *Lep2*, em uma amostra de suspensão de tecido renal de hamster sobrevivente ao desafio com a estirpe Pomona Fromm sorovar Kennewicki.

Figura 1- Gel de agarose a 1,5%. Visualização de banda de 330 pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostra de suspensão de tecido renal de animais sobreviventes ao desafio com a estirpe Pomona Fromm, sorovar Kennewicki, reação efetuada com os *primers* *Lep1* e *Lep2* – São Paulo -2011

4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR qRT-PCR

Gene *LigA*

As médias de Cp (“*crossing point*”) das triplicatas obtidas na reação de qRT-PCR com os primers *LigConF/LigConR*, que amplificam o gene da proteína *LigA* são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Média de “*crossing point*” das amostras de DNA padrão nas concentrações 10^5 cópias/ μ L, 10^3 cópias/ μ L e 10^1 cópias/ μ L do gene *LigA*, e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela qRT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o kit *Sybr Green* - São Paulo - 2011

<i>LigA</i>			
	Amostra	Média Cp	Quantificação
Padrões	Padrão 10^5	25,55	10^5
	Padrão 10^3	31,62	10^3
	Padrão 10^1	39,23	10^1
	Pura	30,59	$3,2 \times 10^3$
Bacterina	1:200	38,33	$2,3 \times 10^1$
	1:400	> 40	não aplicável
	1:800	> 40	não aplicável
	1:1600	> 40	não aplicável

A análise dos resultados obtidos mostra que a detecção de mRNA do gene *LigA* foi aplicável apenas até a diluição 1:200 da bacterina anti-leptospirose, na qual foram obtidas 23 unidades do cDNA correspondente. Nas demais diluições não foi possível a quantificação do referido mRNA pois até o número de ciclos aplicado não foi verificada a geração de curva de amplificação.

A análise das temperaturas de *melting* mostrou um leve desvio comparando-se os padrões e as amostras (figura 2), entretanto, a eletroforese em gel de agarose a 1,5% confirmou a especificidade do sinal gerado nas amostras.

Figura 2 - Gráfico das temperaturas de *melting* das amostras de DNA padrão nas concentrações 10^5 cópias/ μ L, 10^3 cópias/ μ L e 10^1 cópias/ μ L do gene *LigA*, e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela q-RT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o kit *Sybr Green* - São Paulo - 2011

Gene *LipL32*

As médias de C_p ("crossing point") das triplicatas obtidas na reação de qRT-PCR, com os *primers* *LipL32F/LipL32R* que amplificam o gene da proteína *LipL32* são apresentadas na tabela 5:

Tabela 5 – Média de “*crossing point*” das amostras de DNA padrão nas concentrações 10^5 cópias/ μ L, 10^3 cópias/ μ L e 10^1 cópias/ μ L do gene *LipL32*, e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela qRT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o kit *Sybr Green* - São Paulo - 2011

<i>LipL32</i>			
	Amostra	Média Cp	Quantificação
Padrões	Padrão 10^5	21,89	10^5
	Padrão 10^3	30,85	10^3
	Padrão 10^1	37,49	10^1
	Pura	38,19	$8,66 \times 10^0$
Bacterina	1:200	>40	não aplicável
	1:400	> 40	não aplicável
	1:800	> 40	não aplicável
	1:1600	> 40	não aplicável

A análise dos resultados obtidos revela que a detecção de mRNA do gene *LipL32* foi aplicável apenas na amostra de bacterina pura, na qual foram obtidas oito unidades do cDNA correspondente. Nas demais diluições da bacterina testada não foi possível a quantificação do referido mRNA pois até o número de ciclos aplicado não foi verificada a geração de curva de amplificação.

A análise das temperaturas de *melting* mostrou um leve desvio comparando-se os padrões e as amostras (figura 3), entretanto, a eletroforese em gel de agarose a 1,5% confirmou a especificidade do sinal gerado nas amostras.

Figura 3 - Gráfico das temperaturas de *melting* das amostras de DNA padrão nas concentrações 10^5 cópias/ μ L, 10^3 cópias/ μ L e 10^1 cópias/ μ L do gene *LipL32*, e das amostras de bacterina pura, e nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, obtidas pela q-RT-PCR pelo método de quantificação absoluta, com o kit *Sybr Green* - São Paulo - 2011

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR qRT-PCR

Na tabela 6 são apresentados os resultados da quantificação relativa por q-RT-PCR, expressos em valores brutos para cada *primer* empregado e em forma de proporção entre as médias de “*crossing point*” das amostras de bacterina pura e na diluição 1/200, realizada com os *primers LigCon* que codifica a proteína *LigA* e o *primer* 16S utilizado como gene de referência.

Tabela 6 – Proporção entre as médias de “crossing point” das amostras de bacterina pura e diluição 1/200, obtidas pela qRT-PCR, realizada com o *primer LigCon* em relação ao gene de referência 16S, pelo método de quantificação relativa básica com o *kit Sybr Green* - São Paulo - 2011

Diluição da bacterina antileptospirose	Média Cp <i>LigA</i>	Média Cp 16S	Proporção média de Cp <i>LigA</i>/16S
Pura	28,07	19,41	$2,45 \times 10^{-3}$
1:200	36,79	23,37	$9,17 \times 10^{-5}$

Os valores da média de Cp do gene *LigA* em relação ao gene 16S, para a amostra de bacterina pura demonstraram que o gene da proteína *LigA* apresentou regulação descendente, tendo apresentado uma proporção mil vezes menor em relação ao gene de referência 16S. Na diluição 1/200, como esperado, esta proporção diferiu ainda mais, apresentando uma proporção de cem mil vezes em relação ao gene 16S.

Na tabela 7 são apresentados os resultados da quantificação relativa do gene *LipL32* em relação ao gene de referência 16S, na amostra de bacterina pura.

Tabela 7 – Proporção entre as médias de “crossing point” da amostra de bacterina pura, obtida pela q-RT-PCR, realizada com o *primer LipL32* em relação ao gene de referência 16S, pelo método de quantificação relativa básica, com o *kit Sybr Green* - São Paulo – 2011

Bacterina antileptospirose	Média Cp <i>LipL32</i>	Média Cp 16S	Proporção média de Cp <i>LipL32</i>/16S
Pura	30,77	19,41	$3,79 \times 10^{-4}$

Os valores brutos das médias de Cp e a proporção entre as médias de Cp dos genes *LipL32* e 16S, da amostra de bacterina pura constantes da tabela 7, indicam que o gene da proteína *LipL32* apresentou inibição da sua expressão na bacterina avaliada, tendo apresentado uma proporção dez mil vezes menor em relação ao gene de referência 16S.

4.5 RESULTADOS DO ELISA

Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA Indireto e ELISA Sanduíche Indireto segundo a metodologia empregada são descritos nos tópicos a seguir.

4.5.1 ELISA Indireto

Para a realização do ELISA Indireto, primeiramente foi realizada a quantificação protéica por antígeno empregado com o *kit Bradford Assay, BIORAD, Protein Assay*.

4.5.1.1 Dosagem protéica do antígeno concentrado

As concentrações das amostras de proteína utilizadas como antígenos de sensibilização das placas na reação de ELISA são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Concentração protéica dos antígenos pelo *kit Bradford Assay*, *BIORAD*, *Protein Assay*, utilizados nas reações de ELISA - São Paulo - 2011

Antígeno	Concentração protéica (µg/µL)
Proteína recombinante <i>LipL32</i>	0,5
Proteína recombinante <i>LigAC</i>	0,2
Bacterina Experimental	0,180

Para padronização da concentração de proteínas utilizada para sensibilização das placas de ELISA partiu-se da concentração um µg, seguindo-se para as concentrações dois µg; três µg e quatro µg diluídas para 100µL de *coating buffer* (Anexo B) por cavidade. Os resultados das leituras de densidade óptica (DO) são apresentados na tabelas 9 e 10 e representados em gráficos de colunas nas figuras 4 e 5.

Tabela 9 – Valores médios de densidade óptica das concentrações de 1, 2, 3 e 4 µg de proteína da bacterina, e 0,5 µg da proteína recombinante *LigA* em 100 µL por cavidade, em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm- São Paulo - 2011

Concentração de proteína µg/100 µL	DO
1	0,190
2	0,149
3	0,142
4	0,134
0 (Controle Negativo)	0,136
<i>LigA</i> 0,5 (Controle Positivo)	1,720

Figura 4 – Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com concentrações protéicas totais da bacterina experimental de 1, 2, 3 e 4 µg/100 µL, controle negativo e controle positivo utilizando-se a proteína recombinante *LigA* à 0,5 µg/100 µL - São Paulo - 2011

Os resultados apresentados na tabela 10, demonstraram que não foi possível a detecção da presença da *LigA* em nenhuma das concentrações da bacterina utilizadas. Na figura 4 o gráfico de colunas representa os valores médios de densidade óptica, a 492 nm, citados na tabela 10, demonstrando a diferença entre as concentrações protéicas totais da bacterina, utilizadas para sensibilização da placa de ELISA, em relação à proteína *LigAC* recombinante, utilizada como controle positivo, e ao PBS utilizado como controle negativo da reação. As colunas que representam as concentrações protéicas da bacterina não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo da reação, sendo confirmadas pelo teste *t* (GRAPHPAD SOFTWARE, 2005). Quando comparadas à *LigAC* recombinante utilizada como controle positivo da reação, foi possível a visualização de uma diferença desta com os demais grupos, confirmada como estatisticamente diferente pelo teste *t*. Desta forma conclui-se que a presença da proteína *LigA* não pode ser detectada em níveis significantes na bacterina, não sendo necessária a sua utilização para a realização de outros ensaios do ELISA Indireto.

Tabela 10 – Valores médios de densidade óptica das concentrações de 1, 2, 3 e 4 µg de proteína da bacterina, e 0,5 µg da proteína recombinante *LipL32* em 100 µL por cavidade, em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011

Concentração de proteína µg/100 µL	DO
1	1,246
2	1,345
3	1,264
4	1,228
0 (Controle Negativo)	0,130
<i>LipL32</i> 0,5 (Controle Positivo)	1,522

Os resultados apresentados na tabela 10 indicaram a presença da *LipL32* na menor diluição do antígeno empregada para sensibilização das placas (0,5 µg/100 µL). Desta forma, esta foi a concentração escolhida para realização dos demais ensaios para detecção desta proteína.

Figura 5 – Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com concentrações protéicas totais da bacterina experimental de 1, 2, 3 e 4 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, controle negativo e controle positivo utilizando a proteína recombinante *LipL32* à 0,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ - São Paulo - 2011

No quadro 1 estão expostos os resultados obtidos com os ensaios realizados com os controles da reação.

Quadro 1 – Valores médios de densidade óptica (DO) dos diferentes controles obtidos com ensaios de ELISA Indireto para a proteína *LipL32*, leitura realizada a 492 nm -São Paulo - 2011

Controle	Valor médio de absorbância
Sensibilização com a proteína <i>LipL32</i> na concentração 0,5µg/100 µL; anticorpo anti- <i>LipL32</i> diluído 1:5000; anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído 1:5000	2,036
Sensibilização com o diluente <i>coating buffer</i> ; anticorpo anti- <i>LipL32</i> diluído a 1:5000; anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído a 1:5000	0,063
Sensibilização com a bacterina na concentração 1µg/100 µL; anticorpo anti- <i>LipL32</i> diluído a 1:5000; anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído 1:5000	1,301
Sensibilização com a proteína de bloqueio a 10%, anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído a 1:5000	0,056
Sensibilização com a proteína de bloqueio a 10%; anticorpo <i>LipL32</i> diluído a 1:5000; anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído a 1:5000	0,059
Sensibilização com a bacterina 1µg/100 µL; anticorpo revelador conjugado à peroxidase diluído a 1:5000	0,057
Sensibilização com a bacterina 1µg/100 µL; anticorpo anti- <i>LipL32</i> diluído a 1:5000	0,055

No quadro 1, os resultados obtidos nas placas controle, demonstraram que os valores médios de densidade óptica apresentados, referentes à presença da *LipL32* na bacterina, confirmaram a sua detecção nas amostras de bacterina, descartando a possibilidade destes valores serem decorrentes de reações inespecíficas, entre os reagentes empregados. Desta

forma, foi possível a realização dos ensaios de ELISA, com as mesmas diluições da bacterina empregadas no teste de potência realizado com os hamsters, com a finalidade do estabelecimento de um ponto de corte da detecção da *LipL32* nas diluições da bacterina que pudessem ser comparáveis aos resultados obtidos no teste de potência de hamsters.

Quadro 2 - Valores médios de densidade óptica das amostras de bacterina nas diluições de 1:200, 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1: 12800 e 1:25600, bacterina pura, proteína recombinante *LipL32* (0,5 µg/100 µL) e controle negativo da reação, em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011

Antígeno	DO
Bacterina Pura	1,243 (S)
Bacterina diluição 1:200	0,375 (S)
Bacterina diluição 1:400	0,161 (S)
Bacterina diluição 1:800	0,132 (S)
Bacterina diluição 1:1600	0,081 (S)
Bacterina diluição 1:3200	0,065 (NS)
Bacterina diluição 1:6400	0,066 (NS)
Bacterina diluição 1:12800	0,071 (NS)
Bacterina diluição 1:25600	0,076 (NS)
Controle Negativo	0,058
Proteína recombinante <i>LipL32</i> (Controle Positivo)	1,976

Figura 6 – Valores médios de densidade óptica à 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com as amostras de bacterina experimental pura, e nas diluições 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; 1/3200; 1/6400; 1/12800; 1/25600, controle negativo (PBS) e controle positivo utilizando-se a proteína recombinante *LipL32* à 0,5 µg/100 µL - São Paulo - 2011

No quadro 2, são apresentadas as médias de densidade óptica (DO) obtidas nos ensaios de ELISA realizados com as amostras de bacterina pura e nas demais diluições empregadas no teste de potência de hamsters. Na figura 6, os mesmos resultados são representados por meio de colunas, sendo possível a visualização da diferença entre o valor médio de DO da proteína *LipL32* recombinante com os demais valores obtidos com as diluições da bacterina experimental. Os desvios padrão de cada grupo foram calculados, para a avaliação das diferenças entre os valores médios de DO em torno da média de DO em cada grupo. Os maiores valores de desvio padrão ocorreram nas amostras controle positivo e bacterina pura. Nas demais amostras, os valores de desvio padrão obtidos não variaram entre si, como esperado em função dos valores médios de DO.

A análise das médias de DO das diluições pelo teste *t* demonstraram diferença estatística significativa entre as amostras de *LipL32* recombinante, amostra de bacterina pura, e das diluições 1/200 a 1/1600, em relação à amostra controle negativo (PBS). A partir da diluição 1/3200 até a diluição 1/25600, não houve diferença significativa entre os valores obtidos entre as amostras e o grupo controle negativo. O teste *t* quando aplicado entre a amostra controle positivo e amostra de bacterina pura; bacterina pura e diluição 1/200;

diluição 1/200 e 1/400; 1/400 e 1/800; 1/800 e 1/1600; revelaram a existência de diferença significativa ($p < 0,05$) entre os todos os grupos. A partir da diluição 1/1600 as análises realizadas pelo *teste t* entre os grupos de diluição 1/1600 e 1/3200; 1/3200 e 1/6400; 1/6400 e 1/12800; 1/12800 e 1/25600 não foram consideradas estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

4.6 ELISA SANDUÍCHE INDIRETO

A realização dos ensaios de ELISA Sanduíche Indireto foram realizadas para quantificação da proteína *LigA* e na bacterina experimental. Inicialmente, foi realizada a titulação do anticorpo anti-*LigA* de coelho, sensibilizando-se as cavidades da placa com as diluições 1/100; 1/1000; 1/2000. Os resultados obtidos na titulação do anticorpo anti-*LigA* de coelho demonstraram que a maior diluição (1/2000), apresentou as maiores médias de OD, sendo, portanto escolhida para a realização dos ensaios.

4.6.1 Realização da Curva de quantificação com a proteína *LigAC*

Os resultados das médias de OD obtidos na curva de quantificação são apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Valores médios de densidade óptica das concentrações da proteína *LigAC*, em diluições seriadas de razão dois, obtidos com ensaios de ELISA tipo Sanduíche Indireto, para realização da curva de quantificação. Leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011

Concentração da proteína <i>LigAC</i> (µg/µL)	Valor médio de absorbância	Valor médio de absorbância corrigido
0,2	0,660	0,543
0,1	0,605	0,488
0,05	0,553	0,436
0,025	0,508	0,391
0,0125	0,416	0,299
0,00625	0,469	0,352
0,003125	0,449	0,332
0	0,117	0

Os valores médios de DO corrigidos foram utilizados para a construção da curva padrão de quantificação de *LigAC* expostos na figura 7 a seguir.

Figura 7 – Curva padrão de quantificação da *LigAC*, obtida por meio de análise de regressão dos valores médios de densidade óptica corrigidos das concentrações da proteína *LigAC*, em ensaio do tipo ELISA Sanduíche Indireto - São Paulo - 2011

Apesar da linearidade apresentada entre as concentrações da proteína *LigA* e os valores médios de densidade óptica, o valor de R^2 de 0,472 foi considerado baixo, indicando que apenas 47,2% da variabilidade encontrada para os valores médios de OD podem ser explicados pela concentração da proteína *LigA*, indicando uma relação linear fraca entre as variáveis estudadas.

Quadro 3 - Valores médios de densidade óptica das amostras de bacterina nas diluições de 1:200, 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1: 12800 e 1:25600, bacterina pura, proteína recombinante *LipL32* (0,5 µg/100 µL) e controle negativo da reação, em ensaios de ELISA Sanduíche Indireto, leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011

Antígeno	Valor médio de densidade óptica
Bacterina diluição 1:200	0,084
Bacterina diluição 1:400	0,084
Bacterina diluição 1:800	0,080
Bacterina diluição 1:1600	0,084
Bacterina diluição 1:3200	0,083
Bacterina diluição 1:6400	0,089
Bacterina diluição 1:12800	0,094
Bacterina diluição 1:25600	0,101
Bacterina Pura	0,095
Controle Negativo	0,093
Proteína recombinante <i>LipL32</i> (Controle Positivo)	0,455

No quadro 3 foram apresentados os valores médios de DO, quando realizado ensaio de ELISA Sanduíche Indireto com as amostras de bacterina pura e diluídas. Os valores obtidos revelam que nas amostras de bacterina empregadas os valores de DO foram muito próximos ao obtido na amostra do controle negativo.

Tabela 12 – Valores médios de densidade óptica dos diferentes controles obtidos com ensaios de ELISA tipo Sanduíche Indireto. Leitura realizada a 492 nm - São Paulo - 2011

Controle	Valor médio de od
Anti- <i>LigAC</i> de coelho diluído a 1:2000; <i>LigAC</i> recombinante a 0,5 µg/100µL; conjugado diluído a 1:5000	0,661
Anti- <i>LigAC</i> de coelho diluído a 1:2000; PBS diluído em dilute buffer; conjugado diluído a 1:5000	0,099
Anti- <i>LigAC</i> de coelho diluído a 1:2000; bacterina a 1µg/100µL; conjugado diluído a 1:5000	0,096
Anti- <i>LigAC</i> de coelho diluído a 1:2000; anti- <i>LigAC</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,100
Sensibilização da placa com proteína de bloqueio a 10%; anti- <i>LigAC</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,086
Anti- <i>LigAC</i> de coelho diluído a 1:2000; <i>LigAC</i> recombinante a 0,5µg/100µL; anti- <i>LigAC</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,624
Anti- <i>LigAC</i> de coelho diluído a 1:2000; bacterina a 1µg/100µL; anti- <i>LigAC</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,098

A tabela 12 apresenta a média dos resultados obtidos com os controles, em oito repetições cada. Os resultados dos poços sensibilizados com anti-*LigAC* de coelho diluído a 1:2000, *LigAC* recombinante a 0,5 µg/100µL e conjugado diluído a 1:5000, apresentaram valor médio de DO de 0,661, valor próximo ao obtido quando acrescentou-se à reação, o anti-*LigAC* de camundongo, considerado como controle positivo da reação. A figura 8 representa as médias dos valores de DO em todos os controles e seus respectivos desvios padrão.

Figura 8 – Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com os controles da reação - São Paulo - 2011

Os resultados apresentados na tabela 12 e representados pela figura 8 foram utilizados para realização do teste *t*, demonstrando que a adição do anticorpo anti-*LigAC* de camundongo não gerou diferença estatística significativa ($p=0,1098$) entre os controles onde foram empregados anti-*LigAC* de coelho, para sensibilização, *LigAC* como antígeno, e anticorpo revelador conjugado à peroxidase. Este resultado, inviabilizou a realização do ensaio de ELISA Sanduíche Indireto para a proteína *LigA*.

Os ensaios de ELISA Sanduíche Indireto para a proteína *LipL32* foram realizados com anticorpo anti-*LipL32* produzido em hamsters, resultantes da segunda imunização com a proteína. O resultado dos valores de DO obtidos com as placas de titulação, do anticorpo diluído a 1/100; 1/1000; 1/2000 e 1/5000, demonstraram que assim como obtido para a proteína *LigA*, a diluição 1/2000, apresentou os melhores resultados sendo então escolhida para realização demais ensaios.

Na tabela a seguir são representados os valores médios de DO, provenientes das oito repetições realizadas para cada amostra, obtidos nos ensaios com os controles de ELISA Sanduíche Indireto para quantificação da proteína *LipL32*.

Tabela 13 – Valores médios de densidade óptica dos diferentes controles obtidos com ensaios de ELISA tipo Sanduíche Indireto. Leitura realizada a 492 nm - São Paulo- 2011

Controle	Valor médio de absorbância
Anti- <i>LipL32</i> de hamster diluído a 1:2000; <i>LipL32</i> recombinante a 0,5 µg/100µL; conjugado diluído a 1:5000	0,686
Anti- <i>LipL32</i> de hamster diluído a 1:2000; PBS diluído em dilute buffer; conjugado diluído a 1:5000	0,691
Anti- <i>LipL32</i> de hamster diluído a 1:2000; bacterina a 1µg/100µL; conjugado diluído a 1:5000	0,679
Anti- <i>LipL32</i> de hamster diluído a 1:2000; anti- <i>LipL32</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,746
Sensibilização da placa com proteína de bloqueio a 10%; anti- <i>LipL32</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,175
Anti- <i>LipL32</i> de hamster diluído a 1:2000; <i>LipL32</i> recombinante a 0,5µg/100µL; anti- <i>LipL32</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,784
Anti- <i>LipL32</i> de hamster diluído a 1:2000; bacterina a 1µg/100µL; anti- <i>LipL32</i> de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000	0,832

Os valores médios das densidades ópticas obtidos com os diferentes controles apresentados na tabela 13 e representados na figura 9 a seguir, foram submetidos à análise estatística pelo teste *t*, e só foi verificada diferença estatística significativa quando a amostra de controle do bloqueio (sensibilização da placa com proteína de bloqueio a 10%; anti-*LipL32* de camundongo diluído a 1:5000; conjugado diluído a 1:5000) foi comparada com as demais amostras. Desta forma, a realização dos demais ensaios tornou-se inviável e desnecessária.

Figura 10 – Valores médios de densidade óptica a 492 nm, com a sensibilização das cavidades da placa com os controles da reação - São Paulo - 2011

Na tabela 14 são apresentados os resultados da quantificação absoluta por qRT-PCR, os resultados do teste de potência realizado em hamsters e os resultados dos valores médios de DO em ensaios de ELISA Indireto.

Tabela 14 – Resultados da qRT-PCR, proporção de mortes entre hamsters desafiados e entre os portadores renais e os sobreviventes ao desafio com a estirpe Fromm do sorovar Kenewick no teste de potência, e valores médios de densidade óptica em ensaios de ELISA Indireto, leitura realizada a 492 nm, empregando-se amostras de bacterina inativada – São Paulo - 2011

Concentrações da bacterina antileptospirose	RT-PCR		Desafio em hamsters	Proporção de PCR do tecido renal dos sobreviventes ao desafio	ELISA <i>LipL32</i> Média de valores de od
	<i>LigA</i>	<i>LipL32</i>			
Pura	3,2 x 10 ³	8,66 x 10 ⁰	10/10 [*]	0/10 ^{**}	1,243
1/200	2,3 x 10 ¹	Não aplicável	10/10	0/10	0,375
1/400	Não aplicável	Não aplicável	10/10	1/10	0,161
1/800^{***}	Não aplicável	Não aplicável	10/10	2/10	0,132
1/1600	Não aplicável	Não aplicável	08/10	1/08	0,081
1/3200	-----	-----	09/10	0/09	0,065
1/6400	-----	-----	09/10	0/09	0,066
1/12800	-----	-----	06/10	0/06	0,071
1/25600	-----	-----	02/10	0/02	0,076

* Número de sobreviventes/número de animais desafiados

** Número portadores renais entre os animais sobreviventes ao desafio com *Leptospira* sorovar Pomona estirpe Kennewick

*** Diluição considerada como padrão para a aprovação de bacterina do sorovar Pomona para uso em suínos e bovinos CFR 113.101(UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

----- amostras não submetidas à técnica de RT-PCR

Na tabela 14 foram apresentados os resultados referentes ao número de cópias dos genes *LigA* e *LipL32* obtidos na PCR em Tempo Real, a proporção de animais sobreviventes ao desafio com a estirpe Fromm do sorovar Kennewick e positivos na PCR da suspensão de tecido renal, e os valores médios de DO nos ensaios de ELISA obtidos na leitura de 492 nm, neste caso referentes à proteína *LipL32*.

Os valores apresentados na tabela 14 revelaram que o DNA de leptospiros foi encontrado nas amostras de suspensão renal dos animais vacinados com as diluições 1/400; 1/800 e 1/1600, todas aprovadas segundo os critérios internacionais, embora em nenhuma destas amostras tenha sido possível a quantificação do fragmento de DNA, relativo aos genes *LigA* e *LipL32* quando submetidas à PCR em Tempo Real. Os resultados do ELISA Indireto demonstraram que as médias de DO das amostras de bacterina pura e das diluições 1/200 a 1/1600, foram estatisticamente significantes em relação à amostra controle negativo (PBS), concordando com os resultados apresentados pelo teste de potência realizado em hamsters, sendo consideradas aprovadas pelos critérios internacionais.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DA BACTERINA EXPERIMENTAL

A produção da bacterina empregou estirpe cultivada em meio líquido EMJH, proveniente do macerado do fígado de hamster inoculado com a estirpe Pomona Fromm, e eutanasiado na fase agônica da leptospirose. Para ser produzida uma bacterina aceitável de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Agricultura dos EUA, reconhecido internacionalmente como padrão de referência para o teste de potência de bacterinas comerciais, é necessário que a estirpe empregada seja patogênica e virulenta. A ausência de letalidade da infecção por leptospira em hamsters inoculados com estirpes de *Leptospira interrogans* proveniente de amostras de alta passagem em meios de cultura, ou de estirpes de culturas atenuadas, já foi associada à perda da expressão das proteínas *LigA* e *LigB* (PALANIAPPAN et al., 2006). Na fase logarítmica de crescimento, o meio foi centrifugado e lavado, para a obtenção de um maior número de células totais por mililitro de meio, e manutenção das características determinantes de virulência da estirpe (ZEIGLER; JONES; KUBICA, 1976).

Pesquisas envolvendo a avaliação de bacterinas anti-leptospirose, preconizam que a contagem do número de leptospiros esteja entre 10^6 (ZEIGLER; KUBICA; JONES, 1976) e 10^9 células por mililitro de meio (ZEIGLER; JONES; KUBICA, 1976; GONZÁLEZ et al., 2005). A concentração de células 10^9 foi empregada para a realização do teste de potência em hamsters; a partir da qual foram realizadas as diluições de 1/200 a 1/25600.

O teste de potência em hamsters, empregando as amostras de bacterina pura, e nas diluições 1/200; 1/400; 1/800; 1/6400; 1/12800 e 1/25600, demonstrou que na concentração de 10^9 leptospiros por mL, a bacterina experimental impediu a ocorrência de leptospirose em 100% dos grupos de hamsters imunizados com a vacina pura e nas diluições de 1:200 a 1:800, e que nas diluições de 1:1600 a 1:6400 o número de sobreviventes ainda esteve dentro dos critérios mínimos exigidos para a aprovação (8/10), sendo considerada portanto, aprovada segundo os critérios internacionais de controle de qualidade de vacinas anti-leptospirose.

Destaque-se ainda que a diluição do inóculo de desafio (10^{-6}) correspondeu a 100 DL₅₀, o que também atendeu as exigências do CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), que preconiza que a dose empregada para o desafio deva conter de 10 a 10000 DL₅₀. Estes resultados demonstraram que a virulência da amostra e o método de desafio foram apropriados para a realização da curva de titulação, corroborando com o resultado do desafio do grupo controle, onde a proporção de mortes foi de 08/10.

A infecção por leptospiros é seguida de uma extensiva disseminação para quase todos os tecidos que ocorre nos estágios iniciais da infecção. Posteriormente, ocorre a eliminação das leptospiros da maior parte dos tecidos, com exceção dos rins, que são o alvo primário das leptospiros tanto durante a infecção aguda quanto na infecção crônica, onde as condições nos túbulos renais favorecem a sobrevivência e a proliferação das leptospiros. A colonização dos rins pelas leptospiros é seguida da leptospiúria, onde ocorre a disseminação do organismo infeccioso na urina, a partir do sétimo dia da infecção, considerado como modo primário de transmissão da doença (HAAKE, 2006; MONAHAN et al., 2009). Portanto, o teste de potência em hamsters para avaliação da bacterina experimental anti-leptospirose incluiu a avaliação da condição de portador renal, realizada por isolamento e PCR, nas suspensões do tecido renal em hamsters sobreviventes ao desafio.

Os resultados da avaliação da condição de portador renal pelas técnicas de isolamento em meio de Fletcher e PCR revelaram que embora não tenham sido isoladas leptospiros nas suspensões de tecido renal de nenhum dos grupos de hamsters sobreviventes ao desafio, os resultados da PCR, demonstraram que a presença de DNA de leptospiros em um animal do grupo vacinado com a diluição 1/400, dois animais vacinados com diluição 1/800 (considerada como padrão para a aprovação de bacterina do sorovar Pomona para uso em suínos e bovinos) e um animal vacinado com a diluição 1/6400. De fato, a técnica de PCR vem sendo utilizada como técnica complementar ao isolamento, devido à alta sensibilidade e por ser uma alternativa rápida em comparação ao isolamento, para a detecção direta de leptospiros no tecido. Além disso, as leptospiros tem um longo período de geração e nem sempre são capazes de crescer nos meios de cultura artificiais (BAL et al., 1994), tornando recomendável o uso de técnicas complementares. Monahan et al. (2009) referiram que os rins são considerados imunologicamente favoráveis à colonização por leptospiros, possivelmente devido a ausência do fator complemento, que torna as imonoglobulinas anti-leptospiros presentes nos túbulos e na bexiga, incapazes de matar a bactéria. Apesar disto, um resultado

positivo na PCR, como o obtido no presente estudo é apenas uma evidência da presença de DNA de leptospiros, que pode ter sido originado de bactérias viáveis ou mortas em uma amostra (BAL et al, 1994). Portanto, no presente trabalho, a presença do DNA de leptospiros, embora seja indicativa da passagem das leptospiros pelos túbulos renais, não pode ser considerada como conclusiva da condição do estado de portador renal.

5.2 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Os principais fatores avaliados em estudos que envolvem reações de qRT-PCR são a eficiência de amplificação, valores médios de *crossing point* e análise da curva de *melting*, principalmente quando se utiliza como corante, *kits* contendo *SYBR Green* (BUSTIN; NOLAN, 2004; WONG; MEDRANO, 2005).

Muitas variáveis podem afetar a eficiência da PCR (BUSTIN; NOLAN, 2004; WONG; MEDRANO, 2005). Estes fatores incluem a extensão do fragmento de DNA, a estrutura secundária e a qualidade do *primer*. No presente estudo, os resultados da expressão gênica por quantificação absoluta dos genes *LigA* e *LipL32*, demonstraram que a eficiência das reações, foi considerada alta (1,89 para o gene *LigA* e 1,87, para o gene *LipL32*). Wong et al. (2005) referiram que os resultados de amplificação devem estar próximos do ideal, considerado como valor dois pelo programa de análise utilizado (*LightCycler® 480 Software 1.5*, Roche), o que significa que a concentração do produto de PCR dobra a cada ciclo, na fase exponencial da reação.

Entretanto, o fator mais importante a ser avaliado na quantificação por qRT-PCR, é o valor de *crossing point* (Cp). Quanto maior a quantidade inicial de DNA genômico, mais rápida será a detecção do acúmulo do produto pelo processo da PCR, e menor será o valor de Cp. Assim, valores de Cp iguais ou maiores do que 40 significam que não houve amplificação do fragmento e, portanto, estes valores são excluídos dos cálculos (DORAK, 2011). Desta forma, análise dos resultados só pode ser considerada para a amostra de bactéria pura e diluição 1/200, para o gene *LigA*, e apenas na amostra de bactéria pura para o gene *LipL32*, excluindo-se as demais diluições.

Os resultados da quantificação absoluta de expressão gênica dos genes estudados na amostra de bacterina pura, demonstraram uma amplitude de transcrição 400 vezes maior do gene *LigA* ($3,2 \times 10^3$ cópias) comparado ao gene *LipL32* (oito cópias). Neste caso, foi possível a detecção da presença de mRNA do gene *LigA* até a diluição 1:200 (23 cópias). Palaniappan et al. (2005) referem que a faixa de detecção desta reação é de $10-10^7$ cópias, portanto, conclui-se que a partir da diluição 1:400 existiria uma quantidade inferior a dez cópias de mRNA do gene *LigA*.

As reações de real-time PCR da bacterina apresentaram uma alta sensibilidade analítica detectando pelo menos até 23 cópias do gene *LigA* e até oito cópias do gene *LipL32*. É possível que o volume inicial de um mL por amostra para extração de RNA total, tenha sido insuficiente para a obtenção de níveis detectáveis dos genes estudados nas maiores diluições; para tanto, seria necessário a produção de um volume muito maior do cultivo de leptospiros para obtenção da bacterina total necessária para os experimentos, o que seria economicamente inviável.

A análise da curva de *melting* foi realizada devido à utilização do *kit* contendo *Sybr Green*. É considerado ideal em uma reação, que as amostras experimentais possam produzir um pico nítido na temperatura de dissociação do fragmento. Este resultado indica que o produto é específico e que a fluorescência do *Sybr Green* é uma medida direta do acúmulo do produto de interesse. Quando a curva de dissociação tem uma série de picos, não há discriminação suficiente entre produtos de reação específicos e não-específicos (WONG, 2005). Neste caso, a análise das curvas de *melting*, demonstrou uma pequena variação entre curva que representa as amostras e a curva gerada pelas amostras de DNA padrão, em ambos os genes avaliados. Assim, tornou-se necessária a realização da eletroforese em gel de agar, para confirmação do tamanho do produto amplificado. A visualização das bandas de DNA, e a ausência de amplificação de bandas nas amostras controle negativas, vieram a confirmar a especificidade das reações.

5.3 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

A quantificação relativa da q-RT-PCR é baseada na expressão relativa de um gene alvo em relação a um gene de referência. Os genes de referência também chamados *housekeeping genes*, estão presentes em todos os tipos de células, pois são necessários para a sobrevivência básica da célula. A síntese de mRNA a partir destes genes é considerada estável e segura em vários tecidos mesmo sob condições experimentais de tratamento (PFAFFL, 2001), portanto, os níveis de mRNA de um gene de interesse são “normalizados” em relação a um gene de referência, pois não é esperado que a expressão destes últimos possa variar nas amostras sob estudo. Os RNAs ribossomais demonstraram estar presentes como uma fração consistente do RNA total, e, portanto podem ser considerados melhores como genes de referência padrão (ROTH, 2002). Carrillo-Casas et al. (2008) demonstraram que o gene 16S rRNA ribossomal, gene altamente conservado, foi o melhor candidato a controle interno, em um experimento com o objetivo de selecionar um gene de referência para estudos de quantificação da expressão gênica de *Leptospiras interrogans*, sendo portanto escolhido como o gene de referência no presente estudo.

A quantificação relativa dos genes *LipL32* e *LigA* em relação ao gene *16S rRNA* foi realizada com o mesmo protocolo de amplificação utilizado para a quantificação absoluta das amostras e apresentou resultados coerentes com os já apresentados para a quantificação absoluta, de maneira que as análises só puderam ser realizadas nas amostras de bacterina pura e diluída a 1:200 para o gene *LigA* e apenas na amostra de bacterina pura, quando avaliado o gene *LipL32*. As demais diluições apresentaram valores de Cp maiores que 40 e foram desconsideradas das análises.

Os resultados apresentados na tabela 6 revelaram que na amostra de bacterina pura, a razão de “Cp” entre o gene *LigA* e o gene *16S RrNA* apresentou uma relação mil vezes menor da expressão do gene *LigA* em relação ao gene de referência, sendo que na amostra diluída a 1:200, esta relação foi de cem mil vezes. Semelhante ao resultado obtido na realização da quantificação absoluta, na amostra de bacterina pura o gene *LipL32* apresentou uma relação de expressão cem mil vezes menor, demonstrando que tanto o gene *LigA* quanto o gene *LipL32* foram genes que apresentavam condições de inibição de sua expressão na bacterina experimental avaliada.

A técnica de qRT-PCR tem sido aplicada ao diagnóstico de leptospirose (LEVETT et al., 2005; MERIEN et al. 2005; PALANIAPPAN et al. 2005; FEARNLEY et al., 2008; ROCZEK et al., 2008;; STODDARD et al., 2009). Merien et al. (2005), com o emprego do corante *Sybr Green I* e dos *primers LFB1-F* e *LFB1-R* desenhados a partir de *Leptospira interrogans* sorovar Lai, a sensibilidade observada da ordem de 50 leptospirose/mL, correspondeu a uma ou apenas duas cópias do genoma em amostras de DNA extraído de soro de pacientes humanos, permitiu a diferenciação das espécies patogênicas das espécies saprofíticas, e a distinção das espécies de leptospira pela análise da curva de *melting*. Levett et al. (2005) utilizaram os *primers LipL32-270F/LipL32-270R*, os mesmos utilizados no presente estudo, e obtiveram a mesma especificidade dos ensaios com os *primers LFB1*, quando utilizaram o corante *Sybr Green I*, obtendo uma sensibilidade analítica de apenas três genomas em amostras de sangue e dez genomas em amostra de urina. Stoddard et al. (2008), empregaram a tecnologia Taq Man, os *primers LipL32-45F* e *LipL32-286R* e a sonda *LipL32-189P*, para detecção de leptospirose patogênicas em amostras clínicas submetidas à contaminação experimental, e encontraram um limite de detecção de até 20 genomas. Fearnley et al. (2008), utilizaram os *primers PFA/PRA* e *SFA/SRA* desenhados de regiões conservadas do gene 16S rRNA e as sondas *Lepto1* e *2* marcadas com LC Red 640 para diferenciar espécies patogênicas de saprofíticas. O limite de detecção encontrado foi de cerca de uma célula e dez moléculas de *L. inadai*, utilizado como controle positivo da reação.

Ressalte-se, contudo, que nos estudos citados a quantificação por qRT-PCR foi utilizada para fins de diagnóstico, e que para isto, foi utilizado o DNA extraído das amostras avaliadas em cada caso. No presente estudo, foi empregado o RNA total extraído da bacterina pura e das suas diluições, a partir da qual foram produzidas as amostras de cDNA, por transcrição reversa, submetidas à técnica de qRT-PCR, de modo a ser quantificada a expressão das proteínas *LigA* e *LipL32*, tomando-se por base o mRNA, presente no transcriptoma. Apesar da sensibilidade analítica no presente estudo estar em concordância com outras investigações citadas, os resultados aqui apresentados demonstraram a expressão das proteínas *LigA* e *LipL32* na bacterina experimental avaliada.

Para validar a quantificação relativa da expressão de mRNA das células é importante que todas as reações de PCR ocorram sob condições ótimas e similares. Para isto, é necessária a realização da curva padrão de amplificação, dos genes alvo e do gene de referência, com diluições seriadas de DNA, da mesma forma como realizada na quantificação absoluta, que

será utilizada para o cálculo de eficiência das reações. Neste caso, devido à impossibilidade de realização da curva para o gene 16S rRNA, os valores apresentados nas Tabelas 6 e 7, foram automaticamente gerados pelo *LightCycler[®] 480 Software 1.5*, Roche, considerando-se uma eficiência ideal de valor dois em todas as reações de quantificação relativa, o que pode ter alterado os resultados apresentados. No entanto, devido aos valores de eficiência das reações estarem próximos do valor dois (1,89 para o gene *LigA* e 1,87 para o gene *LipL32*), quando realizada a quantificação absoluta, e terem sido realizadas nas mesmas condições, decidiu-se por não inviabilizar os resultados.

No presente estudo, a técnica de qRT-PCR foi utilizada para a quantificação da expressão das proteínas *LigA* e *LipL32* em amostras de bacterina experimental não inativadas, pura e nas mesmas diluições utilizadas no teste de potência efetuado em hamsters. As condições de produção da bacterina foram estabelecidas de modo a conservar ao máximo as características de virulência e patogenicidade da estirpe Fromm com a finalidade de se obter uma vacina eficaz, considerando-se os padrões estabelecidos pelo teste de potência em hamsters, de acordo com as exigências do CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) e para quantificação da expressão dos antígenos *LigA* e *LipL32* pela técnica de qRT-PCR. É preciso considerar, no entanto, que as alíquotas da bacterina não inativada foram mantidas em freezer – 80°C para extração do RNA total, por tempo prolongado, necessário para a padronização da técnica de extração, transcrição reversa e as reações de qRT-PCR. É possível que devido à molécula de RNA ser menos estável a longo prazo, quando comparada à molécula de DNA, possa ter ocorrido degradação do RNA, interferindo com os resultados obtidos na qRT-PCR.

5.4 ELISA

A padronização das reações de ELISA para as proteínas *LigA* e *LipL32*, baseou-se na produção das proteínas recombinantes *LigAC* e *LipL32* (MONARIS, 2011) utilizadas para produção dos seus respectivos anticorpos em camundongos e coelhos fêmeas, e como controle positivo das reações.

Os resultados do ELISA Indireto para detecção de *LigA* apresentados na tabela 9 e representados pela figura 4 demonstraram que os valores médios de DO apresentados pelas concentrações protéicas totais de 1, 2, 3 e 4 µg de bacterina experimental não apresentaram diferença significativa em relação ao valor médio de DO obtido no controle negativo da reação. Estes resultados demonstraram que não foi possível a detecção da proteína *LigA* na bacterina experimental avaliada mesmo na maior concentração utilizada (4µg/100µL). As mesmas concentrações protéicas quando empregadas no ELISA Indireto para detecção da proteína *LipL32*, demonstraram a sua detecção na menor concentração empregada, de 1µg/100µL, corroborando com a concentração protéica utilizada por Monaris (2011), e com a hipótese de que o aumento da concentração protéica total para valores superiores a 4µg/100µL, quando da avaliação da *LigA* pode não resultar em aumento dos valores médios de densidade óptica.

Os ensaios de ELISA Indireto realizados com as amostras de bacterina pura e demais diluições, para detecção da proteína *LipL32*, revelaram que os valores médios de OD da amostra de bacterina pura e nas diluições 1/200 a 1/1600, apresentaram diferença significativa em relação à amostra controle negativo, demonstrando que até a diluição 1/1600, foi possível a detecção da *LipL32* na bacterina experimental. A comparação destes resultados com os obtidos no teste de potência em hamsters demonstrou que os ensaios de ELISA Indireto, embora não tenham detectado a proteína *LipL32* em todos os grupos aprovados pelo CFR113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), apresentaram diferença estatística no valor de diluição de 1/800, considerado padrão para hamsters, e na diluição superior (1/1600), demonstrando que o ensaio de ELISA Indireto padronizado pode ser utilizado para avaliação de potência de bacterinas anti-leptospirose.

A realização dos ensaios de ELISA Sanduíche Indireto para quantificação das proteínas *LigA* e *LipL32* não apresentou resultados que pudessem ser comparados aos apresentados pelo teste de potência em hamsters, uma vez que quando realizados os ensaios com os controles visando a verificação da ocorrência de reação cruzada, os resultados dos poços sensibilizados com anti-*LigAC* de coelho, *LigAC* recombinante e conjugado, ficaram próximos aos valores obtidos quando foi adicionado o anti-*LigAC* de camundongo, considerado controle positivo da reação, e revelaram uma possível existência de reação cruzada entre o anticorpo revelador conjugado à peroxidase e a proteína recombinante, invalidando a realização dos ensaios quantitativos para a proteína *LigA*.

Os resultados apresentados na placa contendo os controles da reação para a proteína *LipL32*, apresentaram reação cruzada em todos os controles empregados, com a exceção do controle do bloqueio, indicando a existência de reação cruzada do anti-*LipL32* de hamster com o anticorpo revelador conjugado à peroxidase, o que inviabilizou a padronização do ELISA Sanduíche Indireto para a proteína *LipL32*.

Matsunaga et al. (2003) referiram que as proteínas *Lig* não foram encontradas em estirpes de cultura atenuada e culturas de alta passagem de leptospiros, e que seria importante a inclusão desta classe de proteínas no preparo de vacinas. Os ensaios de qRT-PCR detectaram a presença de 3×10^3 cópias do mRNA que codifica a proteína *LigA* na amostra de bacterina pura, e apenas oito cópias do mRNA que codifica a proteína *LipL32*. Apesar disto, quando realizados os ensaios de ELISA Indireto, a proteína *LigA* não foi detectada na amostra de bacterina pura, ao contrário da proteína *LipL32*, que pode ser detectada até a diluição 1/1600.

A expressão gênica envolve a análise das regiões do DNA (genes) que são ativadas para a produção de proteínas, e os mecanismos que controlam a quantidade de proteína a ser produzida. A expressão do gene ocorre quando o mRNA sintetizado serve como molde para a produção de proteína correspondente. Nos procariotos, devido à falta do envoltório, a transcrição ocorre no mesmo lugar da tradução, tão logo o RNA comece a ser formado, a tradução já se inicia, o que faz com que a transcrição e a tradução nos procariotos sejam ditas como acopladas (LODISH et al., 1999). Este aspecto poderia explicar os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que apesar da quantificação da proteína *LipL32* ter sido baixa quando da análise por qRT-PCR, a detecção desta proteína pode ser realizada até a diluição 1/1600 pelo ensaio de ELISA Indireto, o que poderia ter ocorrido devido à velocidade de tradução da proteína *LipL32* ser mais alta em relação à *LigA*, que apesar de apresentar um valor mais alto de quantificação, não pode ser detectada em nenhuma concentração da bacterina pelo ensaio de ELISA Indireto.

As células fazem regulação da expressão gênica por muitas razões como economia de energia, não fazendo produtos desnecessários em determinadas fases de crescimento, ou não produzindo proteínas usadas em processos específicos (LODISH et al., 1999). A regulação negativa ocorre quando a expressão de determinado gene está reduzida, como demonstrado neste estudo, pelas proteínas *LigA* e *LipL32* em relação ao gene de referência 16S rRNA.

Palaniappan et al. (2002) demonstraram que a *LigA* não é expressa ou termorregulada sob condições de cultura *in vitro*, sendo expressa apenas *in vivo*. Contudo, em outro estudo, a *LigA* foi detectada apenas em nível transcrito, o que corrobora com os dados apresentados no presente estudo, e sugere que a *LigA* pode tanto ser expressa em níveis extremamente baixos sob condições *in vitro*, como pode ser uma proteína muito instável após a sua expressão, uma vez que não foi detectada em amostras de baixa passagem em meio de cultura (PALANIAPPAN et al., 2004).

Haake et al. (2000) referiram que os níveis de expressão da proteína *LipL32* podem sofrer variações de acordo com a estirpe de *Leptospira* empregada. Hoke et al. (2008) constataram que a expressão da *LipL32* é alta em condições de cultivo em laboratório osmoticamente similares às condições de manutenção no ambiente. A estirpe Fromm empregada no desenvolvimento da bacterina experimental avaliada vem sendo utilizada durante muitos anos em experimentos de avaliação de potência de bacterinas, pois apresenta patogenicidade regular para hamsters. Desta forma, considera-se que as condições de cultivo empregadas no desenvolvimento da bacterina não tenham causado alterações significativas em seu metabolismo, de forma a influenciar os padrões de expressão das proteínas avaliadas. Porém, como anteriormente citado, a bacterina inativada permaneceu à temperatura de -80°C até a padronização dos ensaios necessários, o que pode ter contribuído para inibição de sua expressão no momento da avaliação por qRT-PCR, e que ambas proteínas avaliadas parecem ter sua expressão induzida por fatores desencadeados pela interação com às células do hospedeiro (PALANIAPPAN et al., 2004).

Palaniappan et al. (2004) empregaram as regiões conservadas e variáveis das proteínas *LigA* e *LigB* para o desenvolvimento de proteínas recombinantes, e avaliaram seu potencial diagnóstico em um ELISA cinético, utilizando soro de cães vacinados e positivos na soroaglutinação microscópica. Os resultados obtidos demonstraram que a região conservada da proteína *LigA* e *LigB* foi capaz de identificar os animais infectados, mas não de detectar os animais vacinados, demonstrando que, assim como apresentado no presente estudo, as proteínas *LigA* tem sua expressão induzida durante a infecção, não sendo possível o encontro de anticorpos contra os antígenos recombinantes nos animais vacinados.

Na atualidade a melhor medida preventiva contra a leptospirose ainda é a vacinação com bacterinas, formuladas a partir de células totais de leptospiros quimicamente inativadas. O licenciamento de bacterinas anti-leptospirose por órgãos de referência internacional como o

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos requer um ensaio de potência realizado em hamsters. O grande número de hamsters requeridos para o teste destes produtos torna o procedimento muito caro e aumenta as preocupações com o bem estar animal e a saúde humana, tornando necessário o desenvolvimento de ensaios *in vitro* para esta finalidade (RUBY; CARDELLA; KNUDTSON, 1992).

Poucos ensaios têm sido desenvolvidos no sentido de desenvolver alternativas *in vitro* para o teste de potência de bacterinas em hamsters. Ruby; Cardella; Knudtson (1992), empregaram anticorpos monoclonais em um ensaio do tipo ELISA para quantificação do antígeno de leptospira em bacterinas contendo *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. Apesar de apresentar resultados satisfatórios, a produção de anticorpos monoclonais ainda consiste em uma técnica trabalhosa, cara e envolve o uso de um grande número de animais. Gonçalves (2008) comparou os resultados obtidos no teste de potência em hamsters com os obtidos pelo teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* de duas bacterinas comerciais, e estabeleceu o título de anticorpos neutralizantes igual ou superior a $1,0 \log_{10}$ como correspondente ao nível de aprovação de bacterinas no teste de potência.

A análise comparativa dos resultados do teste *in vivo*, do qRT-PCR e do ELISA Indireto realizado com a proteína *LipL32* confirmam a complexidade de fatores envolvidos na indução da resposta protetora vacinal, e que nenhum dos fatores de virulência estudados apresentou níveis elevados de expressão gênica compatíveis com os resultados apresentados com as diluições protetoras. É possível que apesar de já consagradas como fatores de virulência e indutores de proteção contra a infecção (LEVETT et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2005; JOUGLARD et al., 2006; SILVA et al., 2007), por leptospirose, as proteínas *LigA* e *LipL32*, e outros fatores envolvidos com a resposta imune, atuem de maneira sinérgica, dificultando desta forma a avaliação da quantificação da expressão de apenas duas das proteínas sabidamente indutoras de proteção. Além disso, não se pode aferir a participação do hidróxido de alumínio empregado como adjuvante da bacterina. É sabido que o hidróxido de alumínio é o adjuvante comumente empregado nas bacterinas comerciais contra leptospirose (TABATA, 2002), uma vez que a imunidade contra a infecção por leptospirose é reconhecida como primariamente humoral (KOIZUMI; WATANABE, 2005). Os compostos de alumínio parecem agir de maneira a prender o antígeno no sítio de deposição, retardando sua adsorção; fazendo com que subsequente o antígeno liberado produza uma resposta imune secundária (VANSELOW, 1987). Contudo no presente estudo, as análises dos genes *LigA* e

LipL32 foram efetuadas no cultivo antes da inativação e inclusão do adjuvante e o teste de potência em hamsters foi efetuado com o produto final inativado e adsorvido em hidróxido de alumínio.

No presente estudo, não foi possível o estabelecimento de uma correlação entre os resultados da técnica de qRT-PCR com as proteínas *LigA* e *LipL32* e os resultados apresentados no teste de potência em hamsters. O intervalo de tempo prolongado necessário para a padronização dos ensaios, e as condições de manutenção da amostra podem ter causado a degradação do RNA e subestimado os resultados apresentados. Em futuras investigações a extração do RNA e das amostras de bacterina logo após a sua produção, poderão esclarecer esta hipótese. No entanto, os ensaios de ELISA Indireto com a proteína *LipL32* demonstraram resultados próximos aos obtidos no teste de potência em hamsters, apresentando diferenças significativas entre a diluição padrão para aprovação da bacterina (1/800) e o grupo controle negativo. O aperfeiçoamento desta técnica poderá vir a oferecer uma nova alternativa *in vitro* para avaliação de bacterinas que dispense o uso de animais de laboratório, contribuindo para a redução do uso de animais de experimentação.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- a bactéria experimental avaliada foi aprovada no teste de potência em hamsters de acordo com os critérios estabelecidos pelo CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006);
- a técnica de qRT-PCR só detectou cópias do mRNA que codifica a proteína *LigA* nas amostras de bactéria pura e diluída a 1:200 e apenas na amostra de bactéria pura para a proteína *LipL32*, e portanto não pode ser correlacionada aos resultados do teste de potência em hamsters;
- os ensaios de ELISA Indireto para detecção da proteína *LipL32* apresentaram diferença significativa na amostra diluída na concentração padrão para hamsters (1/800), tornando-se uma possível alternativa *in vitro* para avaliação de potência de bactérias anti-leptospirose.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** 3. ed. Washington: O.P.S., 2001. 398 p.

AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F. M.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0007093.

Disponível em:<

<http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007093>>. Acesso em: 07 mai. 2010.

AINSWORTH, A. J.; LESTER, T. L.; CAPLEY, G. Monoclonal antibodies to *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, n. 2, p. 202-204, 1985.

ALT, D. P.; BOLIN, C. A. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* infection in hamsters and swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.1, p.59-62, 1996.

ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; McBRIDE, A. J.; KO, A. I.; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospires in urine by pcr for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.

BHARTI, A. J.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Disease**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BOQVIST, S.; THU, H. T. V.; VAGSHOLM, I.; MAGNUSSON, U. The impact of *Leptospira* seropositivity on reproductive performance in sows in southern Viet Nam. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1327-1335, 2002.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, n. 3, p. 155-166, 2004.

CARRILLO-CASAS, E. M.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; PEÑA-MOCTEZUMA, A. Selection of the internal control gene for real-time quantitative RT-PCR assays in temperature treated *Leptospira*. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 539-546, 2008.

DELBEM, A. C. B. **Purificação, caracterização e avaliação da capacidade imunogênica do lipopolissacarídeo (LPS) de *Leptospira spp* isolada no Brasil associado ao hidróxido de alumínio ou monofosforil lipídio A como adjuvantes.** 2004. 117 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DOBSON, K. J.; DAVOS, D. E. Leptospiral titres in pigs after vaccination. **American Veterinary Journal**, v. 51, n. 9, p. 443-444, 1975.

DORAK, M. T. Real-Time PCR. **Advanced Methods Series**. Oxford: Taylor & Francis, 2006. Disponível em: <<http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; HARTWIG, D.; SILVA, E.; GRASSMANN, A. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Tipificação de isolados de *Leptospira* pela análise de VNTR (número variável de repetições em tandem) através de eletroforese capilar. In:.. CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 17º, ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO 10º, 2008, Pelotas. **Anais...** Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB_01771.pdf>. Acesso em: 05 set. 2009.

FAINE, S. ***Leptospira and Leptospirosis***. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 1994. 353 p.

FAVERO, A. C. M.; MANGERONA, A. C. S.; ALESSI, L. J.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; VASCONCELLOS, S. A. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 45-55, 1997.

FEARNLEY, C.; WAKELEY, P. R.; GALLEGU-BELTRAN, J.; DALLEY, C.; WILLIAMSON, S.; GAUDIE, C.; WOODWARD, M. J. The development of a real time pcr to detect pathogenic *leptospira* species in kidney tissue. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 8-16, 2008.

GLOSSER, J. W.; JOHNSON, R. C.; SULZER, C. R.; AURAN, N. E. Immunogenic properties of a leptospiral outer envelope bacterin in hamsters and foxes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, n. 5, p. 681-684, 1974.

GONÇALES, A. P. **Avaliação de vacinas anti-leptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento *in vitro* e teste de desafio em hamster**. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ, Y.; BATISTA, N.; VALDÉS, Y.; NÚÑEZ, J. F.; MIRABAL, M.; GONZÁLEZ, M. Inmunogenicidad y capacidad protectora en hamsters de vacunas antileptospirósicas monovalentes de células enteras del serogrupo Ballum. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 37, n. 4, p. 169-175, 2005.

GORDONES, C.; LEADER, B. T.; MOLINI, B. J.; CENTURION-LARA, A.; LUKEHART, S. A. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by Real-Time RT – PCR. **Cytokine**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2007.

GRAPHPAD SOFTWARE, 2005. Disponível em:<<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest2.cfm>>. Acesso em: 10 mai. 2011.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer

membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. In: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Current Protocols in Microbiology**. [s.l.]: NIH, 2006. Chap.12: Unit.12.E.2

HANSON, L. E.; TRIPATHY, D. N.; KILLINGER, A. H. Current status of leptospirosis immunization in swine and cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 161, n. 11, p. 1235-1243, 1972.

HAUK, P.; NEGROTTO, S.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E.; WARD, R. J.; SCHATTNER, M.; GOMÉZ, R. M.; HO, P. L. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 4, p. 1341-1347, 2005.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2063-2069, 2008.

HUHN, R. G.; BALDWIN, C. D.; CARDELLA, M. A. Immunity to leptospirosis: bacterins in dogs and hamsters. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 1, p. 71-74, 1975.

JOUGLARD, S. D. D.; SIMIONATTO, S.; SEIXAS, F. K.; NASSI, F. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Nested polymerase chain reaction for the detection of pathogenic leptospires. **Canadian Journal Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 747-752, 2006.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccine: past, present and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p. 210-214, 2005.

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

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; TURNER, D. E.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L.W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2005.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. New York: W.H. Freeman, 2000.

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005.

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

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

MERIEN, F.; PORTNOI, D.; BOURHY, P.; CHARAVAY, F.; BERLIOZ-ARTHAUD, A.; BARANTON, G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 1, p. 139-147, 2005.

MIRAGLIA, F. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo state, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 501-507, 2008.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 792-799, 2009.

MONARIS, D. **Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MYERS, D. M. **Manual de métodos para El diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.

NEGI, S. K.; MYERS, W. L.; SEGRE, D. Antibody response of cattle to *Leptospira Pomona*: response as measured by hemagglutination, microscopic agglutination, and hamster protection tests. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, n. 12, p. 1915-1920, 1971.

PAIXÃO, R. L. A regulamentação da experimentação animal: uma breve revisão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 13, n. 40, p. 59-66, 2007.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T. Q, J.; ROE, B. Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 2, p. 111-117, 2005.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y. F.; HASSAN, F.; MCDONOUGH, S. P.; POUGH, M.; BARR, S. C.; SIMPSON, K. W.; MOHAMMED, H. O; SHIN, S.; MCDONOUGH, P.; ZUERNER, R. L.; QU, J.; ROE, B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 975-984, 2004.

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

PALANIAPPAN, R. U. M; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* sorovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1745-1750, 2006.

PEREIRA, F.; MACIEL, L. **PCR quantitativo em tempo real**. Biologia Molecular. Publicações Weinmann. 2009. Disponível em:
<<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/pcr-quantitativo-em-tempo-real.html>>.
Acesso em: 20 abr. 2011.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2000-2007, 2001.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; McGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMAN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis.(2008). **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, 2008.

doi:10.1371/journal.pone.0001607. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001607>. Acesso em: 05 abr. 2010.

RAMOS, A. C.; SOUZA, G. N.; LILENBAUM, W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 1021-1025, 2006.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal Hygiene**, n. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

ROCZEK, A.; FORSTER, C.; RASCHEL, H.; HÖRMANSDORFER, S.; BOGNER, K.H.; HAFNER-MARX, A.; LEPPER, H.; DOBLER, G.; BÜTTNER, M.; SING, A. Severe course of rat bite-associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, pt. 5, p. 658-663, 2008.

ROTH, C. M. Quantifying gene expression. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 4, n. 3, p. 93-100, 2002.

RUBY, K. W.; CARDELLA, M. A.; KNUDTSON, W. U. Assay for measuring relative potency of leptospiral bacterins containing serovar Pomona. **Biologicals**, v. 20, n. 4, p. 259-266, 1992.

SANCHEZ, E. C.; GUTIÉRREZ, B.; FERNÁNDEZ, C. L.; ARIAS, J. P. Producción y evaluación serológica de una bacterina contra la leptospirosis bovina. **Revista MVZ Córdoba**, v. 12, n. 2, p. 967-977, 2007.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; McBRIDE, A. J. A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRodA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiralimmunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, 2007.

SOTO, F. R. M. **Imunidade ativa e passiva em suínos vacinados contra a leptospirose. Emprego de vacina experimental de subunidades e duas vacinas comerciais de bactérias íntegras**. 2006. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOTO, F. R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, S. R.; BERNARSI, F.; CAMARGO, S. R. Leptospirose suína. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 379-395, 2007.

STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; McCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

SURUJBALLI, O.; HENNING, D.; MARENGER, R.; HOWLETT, C. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type hardjobovis antibodies in bovine sera. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 267-274, 1997.

SURUJBALLI, O.; MALLORY, M. An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 1-6, 2004.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroupsejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 265-268, 2002.

UNITED STATES OF AMERICA. Department of Agriculture .113.10 leptospira Pomona bacterin. In:_____ **Code Federal Regulation**. Animals and animal products , Whasington, Government Printing Office via GPO Acess, 2006. chap.1, pt. 113, sec. E., p 685.

VANSELOW, B. A. The application of adjuvants to veterinary medicine. **Veterinary Bulletin**, v. 57, n. 11, p. 881-896, 1987.

WARREN, H. S.; VOGEL, F. R.; CHEDID, L. A. Current status of immunological adjuvants. **Annual Review of Immunology**, v. 4, p. 369-388, 1986.

WONG, M. L; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

YAN, K. T.; ELLIS, W. A.; MACKIE, D. P.; TAYLOR, M. J.; McDOWELL, S. W.; MONTGOMERY, J. M. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharidae fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 173-187, 1999.

ZEIGLER, J. A.; JONES, R. H.; KUBICA, K. Immunization against leptospirosis: vaccine trials with heat-killed whole cell and outer envelope antigens in hamsters. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v. 10, n. 2, p. 126-130, 1976.

ZEIGLER, J. A.; KUBICA, K. M.; JONES, R. H. Immunization against leptospirosis: continued vaccine trials in hamsters using strains isolated from Barbados. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v. 12, n. 2, p. 130-133, 1978.

ANEXO A

1. Tampão Citrato-Fosfato pH 5,0

Reagente	Quantidade
Citrato de sódio dibásico 0,1 M	29,41g
Fosfato de sódio monobásico 0,2 M	23,99 g
Água-milliQ (qsp)	1000 mL

1.1 Preparo

Solubilizar os reagentes em 800 mL de água, ajustar o pH com HCl 1:1, completar o volume, autoclavar e armazenar a 4°C.

ANEXO B

2. Tampão Carbonato 0,1 M pH 9,6 (*Coating Buffer*)**2.1 Carbonato de sódio 0,2M (Estoque A)**

Reagente	Quantidade
Na ₂ CO ₃ anidro 0,2 M	21,2 g
Água milli-Q	q.s.p 1000 mL

2.2 Bicarbonato de sódio 0,2M (Estoque B)

Reagente	Quantidade
NaHCO ₃ anidro 0,2M	16,8 g
Água milli- Q	q.s.p 1000 mL

2.2.1 Preparo

Reagentes	Quantidade
Carbonato de sódio (Estoque A)	80 mL
Bicarbonato de sódio (Estoque B)	170 mL
Água milli-Q	250 mL

Solubilizar os reagentes em cada solução. Homogeneizar a solução estoque A e B, acrescentar um pouco de água milli-Q, ajustar o pH, completar o volume com água e armazenar a 4°C.

ANEXO C

3. Tampão fosfato-salino 10 X(PBS-Phosphate buffered saline)

Reagente	Quantidade
NaCl 1,37M	64,0 g
KCl 0,027M	1,62 g
Na ₂ HPO ₄ 0,10M	14,2 g
KH ₂ PO ₄ 0,017M	1,85 g
Água Milli-Q	q.s.p 800 mL

3.1 Preparo

Solubilizar os reagentes em água, acertar o pH com HCl 1:1, autoclavar e armazenar a temperatura ambiente. Obs: verificar sempre o peso molecular do reagente e o número de moléculas de água.

ANEXO D

4. Tampão Fosfato-salino acrescido de Tween 20 0,05% (*Wash Buffer*)

Reagentes	Quantidade
PBS 10 X	100 mL
Tween 20	0,5 mL
Água milli -Q	q.s.p 900 mL

ANEXO E

5. Preparo do tampão para diluição dos anticorpos (*Dilute buffer*)

Reagente	Quantidade
Tampão fosfato salino 10 x pH7,4	5 mL
Tween 20 (0,01%)	5 µL
Leite em pó desnatado	0,5 g
Água milli-Q	q.s.p 50 mL

ANEXO F

6. Preparo da solução cromógena – ortofenilenodiamina – OPD

Reagente	Quantidade
Ortofenilenodiamina (OPD)	8 mg
Tampão citrato-fosfato	20 mL
Peróxido de Hidrogênio H ₂ O ₂ 30%	10 µL

6.1 Preparo

Homogeneizar os reagentes em um frasco de vidro fosco, ou envolto por papel alumínio. Obs: Preparar imediatamente antes do uso.

ANEXO G

7. Solução de bloqueio

Reagentes	Quantidade
Ácido sulfúrico – H_2SO_4 (95 a 97%)	22,4 mL
Água milli-Q	q.s.p 100 mL

7.1 Preparo da solução de bloqueio

Adicionar lentamente o ácido sulfúrico ao volume de água milli-Q, monitorando a liberação de calor da reação.

ANEXO H

8. Solução bloqueadora

Reagentes	Quantidade
Tampão Fosfato-salino acrescido de Tween 20 0,05% (<i>Wash Buffer</i>)	50 mL
Leite em pó desnatado	5 g

8.1 Preparo

Pesar 5 g de leite em pó desnatado e adicionar tampão fosfato-salino acrescido de Tween 20 0,05% (*Wash Buffer*) até completar o volume de 50 mL.