TATIANA BARRIONUEVO GOTTI

Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal

São Paulo

2015

TATIANA BARRIONUEVO GOTTI

Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal

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

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:
Profª. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3177
FMVZ

Gotti, Tatiana Barrionuevo
Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal / Tatiana Barrionuevo Gotti. -- 2015.
148 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz.

1. Leptospira. 2. Diagnóstico. 3. Proteínas recombinantes. 4. LipL32. 5. Teste imunocromatográfico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de um teste dipstick para o diagnóstico da leptospirose animal", protocolado sob o nº2382/2011, utilizando 2.000 (duas mil) amostras de soro, sob a responsabilidade da Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia seis de fevereiro de 2013.

We certify that the Research "Development of a dipstick test for the diagnosis of leptospirosis in animals", protocol number 2382/2011, utilizing 2.000 (two thousand) serum samples, under the responsibility Dra. Patricia Antonia Estima Abreu de Aniz, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved at the meeting on 6 February of two thousand and thirteen.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GOTTI, Tatiana

Título: **Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal**

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Ao meu bebê, que mesmo antes de ter chegado, me fortalece todos os dias para continuar a caminhada...

Ao meu querido esposo, por todo companheirismo, amor, cumplicidade e dedicação incondicional em todos os momentos....

Aos meus pais João Gotti e Angela B. Gotti por todo amor, confiança e incentivo em todos os momentos...

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e a querida Danielle que estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

"É capaz quem pensa que é capaz".

(Buda)

Á Deus que me concedeu a oportunidade de vivenciar momentos tão únicos e especiais em minha vida. Gratidão!!

De uma maneira muito carinhosa, agradeço minha orientadora *Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz*, que desde o início acreditou em mim, me acolheu com muito carinho, paciência e dedicação. Uma profissional na qual me espelho, tenho muita admiração e respeito. Uma pessoa humana. Muito Obrigada!

À *Dra. Roxane Maria Fontes Piazza e a Dra Letícia Rocha* pelos ensinamentos científicos, atenção, força, paciência em todos os momentos desta pesquisa.

À *Dra. Angela Silva Barbosa*, na qual me recebeu muito bem no laboratório e pelo apoio.

Ao *Dr. Waldir Elias* pela recepção no laboratório e apoio.

À Dra. Margareth Élide Genovez que acreditou em mim desde o início e me incentivou a retomar meu grande sonho.

Às amigas Vanessa Castro, Simone Miyashiro e todas as pesquisadoras do laboratório de doença bacterianas da reprodução, por todo o carinho de sempre, que mesmo distantes estiveram sempre presentes nesta minha jornada.

Aos meus amigos do laboratório, Denize, Demetria, Ligia, Larissa, Joana, Ludmila, Lídia, Natalia, Adriana, Claudia, Camila, Franciely, Afonso, Fernando, Fernanda, Adriana, Roberto, Thais, Bruna, Camila, Bruno e a todos os amigos do laboratório que me recepcionaram sempre com muito carinho, pelo apoio, ensinamentos em diversos momentos. Agradeço por deixarem meus dias mais leves. Cada um fez a diferença em minha vida.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia: alunos e funcionários pela amizade e colaboração.

À amiga-imã Sheila e toda sua família, por estarem sempre em minha vida. E a amiga Renata por estar sempre ao meu lado.

Aos amigos Rafaela, Rodrigo, Luiz, Alberto e Kátia pelo momentos de reflexão e amizade.

Ao *Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, Zenaide, e a Gisele* do Laboratório de Epidemiologia e Zoonoses Bacterianas (FMVZ-USP), que cederam os soros de animais.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses (FMVZ-USP) por toda a ajuda, ensinamento e trabalho prestado, sou muito grata.

À FAPESP – *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo,* pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste projeto (FAPESP 2011/179656) e a *Pró-Reitoria de Pós-Graduação* da USP pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“Ser feliz é encontrar força no perdão, esperanças nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. É agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.
Fernando Pessoa

“Ninguém muda ninguém; ninguém muda sozinho; nós mudamos nos encontros”.
Roberto Crema

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

GOTTI, T. B. **Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal.** [Development of a dipstick test for the diagnosis of animal leptospirosis]. 2015. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A leptospirose é uma doença bacteriana infectocontagiosa, de curso agudo ou crônico, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, de caráter zoonótico e cosmopolita que acomete o homem e os animais domésticos e silvestres. Pode ser transmitida de forma direta pelo contato com os fluidos contendo leptospiras, através das vias transplacentária e hematogênica, genital e o ato de mamar; ou de forma indireta pelo contato com ambiente contaminado com leptospiras. O conhecimento da gravidade da infecção, da distribuição geográfica, dos fatores de risco e das estirpes circulantes é de extrema importância para o estabelecimento da epidemiologia e o aprimoramento de medidas preventivas e diagnósticas. Neste estudo, avaliou-se a utilização de proteínas recombinantes de *Leptospira* spp. como antígenos no desenvolvimento de um teste rápido baseado em ensaio imunocromatográfico do tipo *dipstick*, como método diagnóstico da leptospirose animal. Foram selecionadas 11 proteínas recombinantes como candidatos a antígenos. As proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas na detecção de anticorpos específicos por *Western-blotting e* ELISA. Somente a LipL32 apresentou reatividade com os soros positivos para leptospirose. Dois testes imunocromatográficos, utilizando a proteína LipL32, foram desenvolvidos. Um teste tipo I utilizando a proteína LipL32 conjugada ao ouro coloidal e outro tipo III com o ouro coloidal conjugado a proteína A e a LipL32 na linha teste. Em ambos as linhas teste e controle reagiram, demonstrando que os testes estão funcionando. O teste tipo I realizado manualmente mostrou resultados satisfatórios para os soros bovinos e soro hiperimune de coelho. O tipo III mostrou reatividade para as amostras de soro bovino, equino, coelho e cão. Quando se aplicou este dois testes em máquinas automatizadas não foi possível detectar a linha teste, provavelmente devido a necessidade de nova padronização de todos os parâmetros do método.

Palavras-chave: Leptospira. Diagnóstico. Proteínas recombinantes. LipL32. Teste imunocromatográfico.

ABSTRACT

GOTTI, T. B. **Development of a dipstick test for the diagnosis of animal leptospirosis.** [Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal]. 2015. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Leptospirosis is an infectious bacterial disease of acute or chronic course, caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, with zoonotic and cosmopolitan character, which affects humans, wild and domestic animals. It can be transmitted directly by contact with fluids containing leptospires through placental, hematogenous and genital routes and through the act of breastfeeding; or indirectly by contact with an environment contaminated with leptospires. Acquiring knowledge about the infection severity, the geographical distribution, the risk factors, and the circulating strains is of utmost importance to stablish the epidemiology and to improve preventive and diagnostic measures. In this study, recombinant proteins of *Leptospira* spp. were evaluated as antigens in the development of a rapid immunochromatographic assay based on the type dipsticks a method of diagnosing animal leptospirosis. 11 recombinant proteins were selected as candidate antigens. The purified recombinant proteins were evaluated in the detection of specific antibodies by *Western blotting* and ELISA. Only the LipL32 protein showed reactivity with positive sera for leptospirosis. Two immunochromatographic tests, using LipL32 protein, have been developed: a type I test using the LipL32 protein conjugated to colloidal gold and another, type III with colloidal gold conjugated to protein A and LipL32 in the test line. In both assays the test lines and the control lines reacted, showing that the methods are working. The type I test performed manually showed satisfactory results for bovine and hyperimmune rabbit sera. The type III test showed reactivity for bovine, horse, rabbit and dog sera. When these two tests were applied in automated machinery, it has not been possible to detect the line test, probably due to the need for further standardization of all method parameters.

Keywords: Leptospira. Diagnosis. Recombinant proteins. LipL32. Immunoassay test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de montagem do teste imunocromatográfico 42
Figura 2 - Interpretação do teste imunocromatográfico 43
Figura 3 - Teste imunocromatográfico tipo I 46
Figura 4 - Teste imunocromatográfico tipo II 46
Figura 5 - Teste imunocromatográfico tipo III 47
Figura 6 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno 48
Figura 7 – Plataforma diagnóstica 50
Figura 8 - Fluxograma do processo de expressão e purificação de proteínas recombinantes 54
Figura 9 - Análise da purificação das proteínas recombinantes. Gel SDS-PAGE (15%) corado com Coomassie Brilliant Blue 56
Figura 10 - *Western blotting* das proteínas recombinantes purificadas, utilizando pool de soros reagentes para leptospirose 60
Figura 11 - *Western blotting* das proteínas recombinantes purificadas, utilizando pool de soros não reagentes para leptospirose 61
Figura 12 - *Western blotting* da proteína recombinante LipL32 purificada, utilizando amostras de soros individuais reagentes para leptospirose 62
Figura 13 - *Western blotting* da proteína recombinante LipL32 purificada, utilizando amostras de soros individuais não reagentes para leptospirose 62
Figura 14 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros reagentes (+) e não reagentes (-) de amostras individuais 64
Figura 15 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros reagentes (+) e não reagentes (-) de amostras individuais 65
Figura 16 - ELISA utilizando soros reagentes e não reagentes de amostras individuais. Os gráficos foram construídos a partir da média das absorbâncias das triplicatas com os respectivos desvios-padrão 66
Figura 17 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soro de coelhos pré-imune, antes e depois da precipitação com ácido caprílico 67
Figura 18 - Análise da purificação do anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho. Gel SDS-PAGE (12%) corado com *Coomassie Brilliant* Blue 68

Figura 19 - Curvas de titulação de anti IgG bovino obtidas por ELISA utilizando soro de coelho pré-imune e depois da purificação em coluna de afinidade HiTrap Protein G 68
Figura 20 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro hiperimune de coelho com anticorpo dialisado na linha teste e 5% sacarose 70
Figura 21 - Concentração de proteína recombinante necessária para estabilizar o ouro coloidal 71
Figura 22 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm em tampão citrato com a proteína recombinante LipL32 72
Figura 23 - Teste imunocromatográfico modelo tipo I 73
Figura 24 - Fitas de *dipstick* montadas após tratamento dos papéis 73
Figura 25 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico com soro Bovino 74
Figura 26 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico com soro bovino 74
Figura 27 - Curvas de titulação de IgG e IgM total obtidas por ELISA utilizando soros não reagentes (-) de amostras individuais de bovinos 75
Figura 28 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico com soro bovino purificados 76
Figura 29 - Teste imunocromatográfico com soro de Hamster 77
Figura 30 - Teste imunocromatográfico com soro de coelho 78
Figura 31 - Teste imunocromatográfico com soro de coelho 78
Figura 32 - Limiar de detecção do teste imunocromatográfico com soro de coelho positivo 79
Figura 33 - Limiar de detecção do teste imunocromatográfico com soro de coelho negativo 79
Figura 34 - Teste imunocromatográfico com soro de coelho 80
Figura 35 - *Western blotting* da proteína recombinante LipL32 purificada, utilizando amostras de soros individuais reagentes para leptospirose de cães e equinos 82
Figura 36 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros não reagentes (-) e reagentes (+) de amostras individuais de cães 83
Figura 37 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros não reagentes (-) e reagentes (+) de amostras individuais de equinos 84
Figura 38 - ..... Teste imunocromatográfico com soro de cão 85
Figura 39 - Teste imunocromatográfico com soro de eqüino 85

Figura 40 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino utilizando anticorpo dialisado na linha teste e 5% sacarose 86
Figura 41- Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino utilizando proteína A dialisado na linha teste e 5% sacarose 87
Figura 42 - Teste imunocromatográfico modelo tipo II 88
Figura 43 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico modelo tipo II 88
Figura 44 - Teste imunocromatográfico modelo tipo III 89
Figura 45 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm em tampão citrato com anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho 90
Figura 46 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm em tampão citrato com proteína A 90
Figura 47 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho, em soro bovino 91
Figura 48 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostra s de animais não reagentes 92
Figura 49 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de bovinos reagentes 93
Figura 50 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de coelhos reagentes 94
Figura 51 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de eqüino reagentes 94
Figura 52 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de cães reagentes 95
Figura 53 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno 96
Figura 54 - Conjugação do ouro coloidal 20nm BBI com anti-LipL32 96
Figura 55 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno 97
Figura 56 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno 98
Figura 57 - Conjugação da microesfera com a proteína LipL32 99
Figura 58 - Fitas de dipstick montadas após tratamento dos papéis, utilizando o conjugado com microesferas mais a proteína recombinante LipL32 99
Figura 59 - Teste imunocromatográfico tipoI com soro bovino utilizando conjugado de microesferas com a proteína recombinante LipL32 100
Figura 60 - Teste imunocromatográfico tipoI com soro bovino utilizando conjugado de microesferas com a proteína recombinante LipL32 101

Figura 61 - Teste imunocromatográfico tipoI com soro bovino e soro de coelho hiperimune utilizando conjugado de microesferas com a proteína recombinante LipL32 102
Figura 62 - Teste imunocromatográfico confeccionado em plataforma diagnóstica 103
Figura 63 - Aplicação do teste imunocromatográfico confeccionado em plataforma diagnóstica em placas de ELISA 103
Figura 64 - Teste imunocromatográfico tipoI com soro bovino em plataforma diagnóstica 104
Figura 65 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro de coelho em plataforma diagnóstica 105
Figura 66 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro bovino em plataforma diagnóstica 106
Figura 67 - Teste imunocromatográfico tipo III com soros equinos em plataforma diagnóstica 106
Figura 68 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro de cães em plataforma diagnóstica 107
Figura 69 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro de coelhos em plataforma diagnóstica 108
Figura 70 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro de hamsters em plataforma diagnóstica 109
Figura 71 - Espectro de absorção da luz visível nas soluções de ouro 110
Figura 72 - Aspecto das partículas de ouro coloidal por microscopia eletrônica de transmissão da solução A: partículas mais homogêneas 111
Figura 73 - Aspecto das partículas de ouro coloidal por microscopia eletrônica de transmissão da solução B: partículas mais heterogêneas 111
Figura 74 - Aspecto das partículas de ouro coloidal comercial da BBI 20nm por microscopia eletrônica de transmissão 111
Figura 75 - Concentração de proteína recombinante necessária para estabilizar o ouro coloidal 112
Figura 76 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm *in house* com a proteína LipL32 113
Figura 77 - Fitas de *dipstick* montada após tratamento dos papéis 114
Figura 78 - Teste imunocromatográfico modelo tipo I com soro de coelho hiperimune utilizando como conjugado o ouro coloidal produzido *in house* 115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Proteínas recombinantes utilizadas neste estudo. 32
Quadro 2 - Papéis utilizados no teste imunocromatográfico e suas características. 42
Quadro 3 - Dados da purificação das proteínas recombinantes. 56
Quadro 4 - Coleção de antígenos de leptospiras de referência utilizadas na SAM. 57
Quadro 5 - Amostras de soros de cães e equinos reagentes para leptospirose selecionadas. 81
Quadro 6 - Resumo dos resultados obtidos neste trabalho. 123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
BSA	Albumina bovina sérica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-ácido
ELISA	*Enzime linked immunossorbent assay*
EMJH	*Ellinghausen McCullough Johnson Harris*
IgG	Imunoglobulina G
LB	Luria Bertani
LB-amp	Luria Bertani suplementado com ampicilina
LIC	*Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni
Lig	*Leptospiral Ig-like protein*
LPS	Lipopolissacarídeo
SAM	Soroaglutinação microscópica
MAT	*Microscopic Agglutination Test*
OPD	O-dihidrocloreto de fenilenodiamina
OMP	*Outer membrane protein*
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PBS-T	Tampão fosfato contendo Tween 20
PCR	*Polimerase Chain Reaction*
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Tris	Hidroxidometil amino-metano
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 OBJETIVOS 33

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

3 MATERIAS E MÉTODOS 34

3.1 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 34

3.2 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE 36

3.3 SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM) 36

3.4 WESTERN-BLOTTING 37

3.5 ELISA 38

3.6 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE LipL32 39

3.7 PRODUÇÃO DO SORO DE COELHO ANTI-IgG BOVINO 40

3.8 DESENVOLVIMENTO DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO 40

3.8.1 **Tratamento dos papéis do teste imunocromatográfico e outros parâmetros do teste** 44

3.8.2 **Modelos de testes imunocromatográficos para detecção de anticorpos** 45

3.8.3 **Modelo de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno** 47

3.8.4 **Uso de microesferas como conjugado para desenvolvimento do teste imuncromatográfico** 49

3.8.5 **Aplicação e validação do teste em amostras clínicas em plataforma diagnóstica** 49

3.9 PRODUÇÃO DO OURO COLOIDAL 51

3.9.1 **Conjugação do ouro coloidal produzido *in house* com a proteína recombinante LipL32** 52

3.9.2 **Teste Imunocromatográfico tipo I com soro de coelho hiperimune utilizando o conjugado com ouro coloidal *in house*** 53

4 RESULTADOS 54

4.1 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 54

4.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS DE ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES PARA LEPTOSPIROSE ATRAVÉS DA SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM) 57

4.3 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM AMOSTRAS DE SOROS POR *WESTERN-BLOTTING* 59
4.4 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO *WESTERN BLOTTING* ATRAVÉS DO ELISA 63
4.5 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL CONTRA LipL32 66
4.6 PRODUÇÃO DO SORO DE COELHO ANTI-IgG BOVINO 67
4.7 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DOS COMPONENTES PARA A CONFEÇÃO DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO (TIC)..... 69
4.7.1 **Tratamento dos papéis do teste imunocromatográfico e outros parâmetros do teste** 69
4.7.2 **Teste imunocromatográfico modelo tipo I** 71
4.7.3 **Teste imunocromatográfico modelo do tipo II** 87
4.7.4 **Teste imunocromatográfico modelo tipo III** 89
4.7.5 **Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno** 95
4.7.6 **Uso de microesferas como conjugado para desenvolvimento do teste imuncromatográfico** 98
4.7.7 **Aplicação e validação do teste em amostras clínicas em plataforma diagnóstica**..... 102
4.8 PRODUÇÃO DO OURO COLOIDAL 109
4.8.1 **Conjugação do ouro coloidal in house com a proteína recombinante LipL32** 112
4.8.2 **Teste Imunocromatográfico modelo tipo I com soro de coelho hiperimune utilizando o conjugado com ouro coloidal *in house*.** 113
5 DISCUSSÃO 116
6 CONCLUSÕES 124
7 ATIVIDADES COMPLEMENTARES..... 126
REFERÊNCIAS 131
APÊNDICES..... 143

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana infectocontagiosa, de curso agudo ou crônico, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, de caráter zoonótico e cosmopolita que acomete o homem, os animais domésticos e silvestres (FAINE et al., 1999). Apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sido evidenciada em mais da metade dos países, sendo particularmente prevalente nas Américas. Ocorre de forma endêmica na América Latina e no Caribe, com impacto na saúde pública e na economia agropecuária (GENOVEZ, 2007).

Até 1988, o gênero *Leptospira* era divido em duas espécies. A espécie *Leptospira interrogans* (senso lato) que compreendia todas as estirpes patogênicas e a espécie *Leptospira biflexa* (senso lato), com as estirpes saprófitas (LEVETT, 2001). Em 1987, o pesquisador brasileiro Yasuda e colaboradores propuseram uma nova classificação baseada em características genotípicas e hibridação por homologia do DNA. Atualmente, o gênero *Leptospira* é dividido em 19 espécies, definidas por homologia de DNA e sequenciamento de genes, normalmente, o 16S rDNA (RAMADASS et al., 1992; WOO et al., 1997). Destas, nove espécies são consideradas patogênicas: *L. interrogans, L. borgpetersenii, L. weilii, L. noguchii, L. santarosai, L. kirschneri, L. alexanderi, L. genospecies* 1 e *L. wolffii.* Seis são saprófitas: *L. biflexa, L. wolbachii, L. meyeri, L. genospecies* 3, 4 e 5. Há, ainda, um grupo intermediário com quatro espécies, a *L. inadai, L. fainei, L. broomii e L. licerasiae* cuja patogenicidade ainda não foi confirmada (YASUDA et al., 1987; BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Estas bactérias também são classificadas em sorovares definidos por reações de aglutinação após absorção dos soros com antígenos homólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são reunidos num mesmo sorogrupo (FAINE et al., 1999). Existem cerca de 300 sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas descritos em 25 sorogrupos. Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS (lipopolissacarídeo). A classificação fenotípica em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação genotípica (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras são bactérias espiraladas, muito finas com aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e comprimento variando de 6 a 20 µm. Apresentam as extremidades em forma de gancho e dois flagelos periplasmáticos responsáveis pela que facilitam na motilidade. Sua

membrana externa envolve completamente os flagelos e o cilindro protoplásmico helicoidal. Nesse cilindro, há o material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e a porção de peptidioglicano da parede celular (QUINN et al., 1994; HAAKE et al., 2000). O LPS é similar aos de outras bactérias Gram-negativas, porém com menor atividade endotoxigênica (SHIMIZU et al., 1987), sendo composto por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, *core*, e antígeno O. O lipídeo A é uma porção lipídica altamente conservada, que ancora o LPS à membrana externa celular. O *core* é uma porção polissacarídica que forma a região intermediária e externamente, encontra-se o antígeno O, que consiste em grupos de polissacarídeos altamente variáveis. Este último é considerado o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias Gram-negativas (FAINE et al., 1999).

Estes patógenos são aeróbios estritos, crescem em temperaturas entre 28 °C e 30 °C (QUINN et al., 1994) e são exigentes no que se refere a meios nutritivos (HANSON; TRIPATY, 1988), com divisão celular em torno de 7 a 12 horas. Uma cultura em meio líquido atinge a fase estacionária de crescimento em média entre 5 a 10 dias. (FAINE et al., 1999). Podem ser visualizados em microscópio de campo escuro ou contraste de fase (FAINE et al., 1999) e apresentam afinidade tintorial por corantes à base de sais de prata, o que possibilita o emprego das técnicas de coloração de Fontana-Tribondeau para esfregaços e a de Levaditi em cortes de tecidos (SANTA ROSA, 1970), além do método de Warthin-Starry (WARTHIN; CHRONISTER, 1920). As leptospiras sobrevivem na água conforme a temperatura, o pH, a salinidade e ao grau de poluição (LEVETT, 2001), mas são pouco resistentes à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos (FAINE et al., 1999).

A leptospirose pode ser transmitida aos animais de forma direta e indireta. A via de transmissão direta ocorre quando fluidos (sangue /urina) contendo leptospiras passam de um animal infectado a outro susceptível, destacando-se as vias transplacentária e hematogênica, genital (monta natural e inseminação artificial) e o ato de mamar. A transmissão indireta ocorre quando o animal adquire leptospirose do ambiente contaminado com leptospiras originárias da urina de animais infectados, doentes ou convalescentes. Animais transitórios em um ambiente contaminado podem carrear infecção para outros ambientes ou animais distantes do original (CÔRTES, 1993).

Em teoria, qualquer sorovar de *Leptospira* spp. pode infectar qualquer espécie animal, porém na prática um número limitado de sorovares é endêmico em uma região ou país em particular. Neste caso, a infecção é determinada pelas espécies animais de contato, pelo(s) sorovar (es) existente (es) na propriedade ou região, pelas condições ambientais e climáticas, e ainda depende do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ et

al., 2006a). Os sorovares Wolffi e Grippotyphosa podem estar presentes em alguns roedores silvestres e espécies marsupiais. Roedores sinantrópicos, suínos e cães são, respectivamente, considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona e Canicola (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999; RADOSTITS et al., 2000).

As leptospiras se mantêm circulando na população de hospedeiros primários, usualmente roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinantrópicos e/ou domésticos. Estes são os hospedeiros secundários, que ao invadir o ambiente silvestre entram em contato com espécies silvestres. O ser humano é considerado um hospedeiro acidental, que se infecta quando em contato direto ou indireto com os animais.

A doença tem forte associação com a atividade profissional. O trabalho diário em terrenos alagadiços frequentados por populações de roedores é um fator importante na transmissão da doença para colhedores de arroz e cana de açúcar (CÔRTES, 1993). Em alguns países, a leptospirose é considerada doença ocupacional para magarefes, fazendeiros e veterinários (FAINE et al., 1999).

A concentração de grandes efetivos de animais domésticos, como os rebanhos bovinos, pode ter como consequência à criação de amplas cadeias infecciosas, que contribuem para a disseminação do agente no ambiente e atuam como fator de risco para o homem (CÔRTES, 1993). Dentre os animais domésticos que podem atuar como portadores da doença, disseminando o organismo no ambiente, destacam-se os bovinos, suínos, caprinos, ovinos, equinos e em e especial os caninos, que mantêm um convívio muito próximo ao homem. Entre as espécies silvestres destacam-se carnívoros, roedores e marsupiais (CORREA et al., 1982).

Os roedores das espécies *Mus musculus* (camundongo), *Rattus* (rato de telhado) e principalmente o *Rattus norvergicus* (rato de esgoto) estão envolvidos na epidemiologia da leptospirose por eliminarem leptospiras pela urina por períodos prolongados, sendo o principal reservatório da doença em áreas urbanas (LEVETT, 2001).

As portas de entrada para a leptospira invadir o organismo do hospedeiro são a pele íntegra ou com abrasões e membranas mucosas conjuntiva, oral, nasofaríngea e genital. Após a entrada, as leptospiras patogênicas alcançam a corrente sanguínea (leptospiremia) e as vias linfáticas, chegando aos pulmões, baço, rins e fígado, onde se multiplicam dando origem ao estágio febril. Nestes órgãos, ocorrem lesões nas membranas das células endoteliais de pequenos vasos, levando ao extravasamento sanguíneo, cuja consequência imediata é a perda das junções entre as células, permitindo que as leptospiras e fluido migrem para o espaço

extravascular, ocasionando a desestruturação tecidual pela desintegração e morte celular (CASTRO, 2006).

A habilidade em sobreviver e multiplicar-se no hospedeiro é o maior componente de virulência deste grupo de bactéria, contudo a ação dos mecanismos imunes adquiridos pode impedir o estabelecimento da doença. (FAINE, 1982, 1999). Na primo infecção, o período de incubação é de 7 a 14 dias, quando ocorre a septicemia e o aparecimento de imunoglobulinas da classe IgM, que têm atividade de poucos dias, posteriormente acontece a produção anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos ajudarem a combater a bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995).

A leptospirose é caracterizada pelo desenvolvimento de vasculites, dano endotelial e infiltração de células inflamatórias. Nos órgãos, o surgimento de petéquias é comum e pode ser extenso (LEVETT, 2001). A isquemia renal evolui para necrose dos túbulos contorcidos renais. Nas formas mais graves, ocorre nefrite intersticial aguda, contudo, lesões glomerulares são menos presentes. A degeneração pode evoluir para a falência renal e anúria. Lesões também são observadas em pulmões, fígado, cérebro, placenta e coração, onde estas levam a sinais clínicos de hemorragia pulmonar, falência hepática e icterícia, encefalopatia e meningite, miocardites, morte fetal e abortamento (FAINE et al., 1999).

Nos animais que sobrevivem à infecção aguda, as leptospiras persistem em sítios imunologicamente protegidos, como os túbulos proximais, a câmara anterior do olho e trato genital. Nos rins, multiplicam-se ativamente, atingindo o pico máximo em 3 a 4 semanas, sendo eliminadas pela urina. Contudo, há animais portadores que podem manter-se negativos sorologicamente, mas eliminando leptospira para o meio ambiente constituindo-se em fonte de infecção importante. Fetos podem nascer portadores renais e eliminadores de leptospiras (FAINE, 1982, 1994; FAINE et al., 1999). A persistência e a intensidade da leptospirúria variam com o hospedeiro e o sorovar infectante (GONÇALVES, 1995).

A apresentação clínica da leptospirose pode cursar como um processo brando e inaparente, até como forma grave, com sintomas graves que chegam a óbito (LEVETT, 2001). A presença de falência renal aguda, pancreatite, meningite, trombocitopenia e sintomas pulmonares são comuns em humanos.

Nos equinos, o sinal clínico mais comum é a uveíte recorrente, que pode ser considerada uma doença autoimune (PARMA et al., 1987; DAHER et al., 2003).

Nos cães, a leptospirose ocorre principalmente pelos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Canicola, cujo curso pode variar de subclínico, agudo ou crônico. As manifestações clínicas podem incluir ou não a icterícia, dependendo do sorovar infectante. Na

forma aguda, pode ocorrer à morte do animal por insuficiência renal e hepática e aqueles que sobrevivem à infecção tornam-se portadores e eliminadores de leptospiras pela urina de forma assintomática, disseminando a doença para outros cães, outras espécies animais e o homem (FAINE et al., 1999).

Nos ovinos e caprinos, os sintomas são principalmente reprodutivos, semelhantes aos bovinos. Na infecção aguda, ocorre anorexia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, icterícia, urina de cor vermelha escura e febre. Há certa evidência que também os ovinos sejam hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo. Segundo Fernandes (2009), a infecção pelo sorovar Hardjo, nesta espécie, está diretamente envolvida com o pastejo consorciado com bovinos, independentemente da existência de outros fatores de risco. Entretanto, no Brasil, os sorovares mais frequentemente observados no sorodiagnóstico nos ovinos são Icterohaemorrhagiae e Hebdomadis. Na espécie caprina, também o sorovar Icterohaemorrhagiae é mais detectado, seguido de Castellonis e Grippotyphosa (FAINE et al., 1999).

Em bovinos e suínos, o quadro reprodutivo inclui abortamentos, retorno ao cio e infertilidade. A doença leva a perdas na produção de leite decorrentes do aumento do intervalo de partos (FAINE et al., 1999; KAZAMI et al., 2002; BOQVIST et al., 2003). Em bovinos jovens, os sinais clínicos da leptospirose são hemoglobinúria, icterícia, anorexia e uremia. Em vacas prenhes, na maioria das vezes, o único sintoma relaciona-se a esfera reprodutiva, onde ocorre morte fetal com abortamento e infertilidade. No entanto, com o decorrer do tempo, a imunidade se restabelece e abortamentos podem ocorrer somente em novilhas de primeira cria. Natimortos, nascimento de bezerros fracos e com baixo peso que podem não sobreviver também são observados (AMATREDJO; CAMPBELL; PATH, 1975; HANSON, 1977). Achados de leptospiras em rins de fetos apontam que estes animais não sobreviveriam após o nascimento, ou não chegariam a termo para o nascimento (ELLIS et al., 1984).

Os bovinos são infectados, normalmente, pelos sorovares Hardjo, Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae. O sorovar Hardjo tem sido considerado o mais adaptado à espécie bovina e o mais evidenciado em todo o mundo, demonstrando diferentes aspectos de patogenicidade (ELLIS, 1984). A infecção causada por este sorovar é apontada em vários países como causa de infertilidade e falhas reprodutivas.

Em alguns países, a infecção nos bovinos por este sorovar apresenta sinais de infertilidade, abortamentos, natimortos, nascimento de animais prematuros, bezerros fracos ou aparentemente normais, mas infectados e portadores renais. Infertilidade pelo sorovar Hardjo

está geralmente associada à infecção ovariana e uterina, originando aumento do intervalo entre parto-concepção e entre partos, em consequência da morte embrionária (DHALIWAL et al., 1996a,b). Em gado leiteiro, a síndrome mais comum associada à leptospirose aguda é a síndrome da queda do leite, ocasionada pelo sorovar Hardjo, ocorrendo diminuição na produção de leite que dura de 2 a 10 dias, caracterizando-se pelo aparecimento de mastite flácida com agalaxia, com pequena quantidade de sangue no leite, o qual adquire aspecto de colostro, amarelado, com grumos grosseiros e elevada contagem de células somáticas. (FAINE et al., 1999). Uma vez introduzido em um rebanho, este sorovar estabelece níveis variáveis de infecção, podendo persistir por longos períodos (HATHAWAY; BLACKMORE; MARSHALL, 1981). Os bovinos são hospedeiros de manutenção para o sorovar Hardjo, uma vez que são portadores renais adaptados (FERNANDES, 2009).

Dois genótipos do sorovar Hardjo são encontrados nos ruminantes – Hardjobovis e Hardjoprajitno. Hardjobovis ocorre com maior frequência em Nova Zelândia, Austrália e Holanda (FAINE et al., 1999), sendo eliminado em maiores quantidades pela urina, enquanto Hardjoprajitno tem sido relatado no Reino Unido, Nigéria, Índia, Malásia, Brasil, México e nos Estados Unidos (AGUIAR, 2004).

A presença do sorovar Hardjo é endêmica nos países de clima tropical e subtropical (ELLIS, 1984). Em países como Austrália, Nova Zelândia e Holanda, apesar de endêmico, o sorovar Hardjo não causa significantes perdas em rebanhos bovinos (SLEE; McORIST; SKILLBECK, 1983; FAINE et al., 1999). No Brasil, constitui-se em infecção endêmica, cujo impacto sobre as taxas reprodutivas, ainda necessita de maiores estudos principalmente em rebanhos leiteiros (GENOVEZ et al., 2006b). Apesar da elevada soroprevalência desse sorovar nos rebanhos bovinos brasileiros, apenas dois relatos de isolamentos são descritos na literatura, e nestas a tipificação das estirpes não está esclarecida. Moreira (1994) isolou de rebanhos bovinos leiteiros o genótipo Hardjoprajitno (amostra Norma) e Langoni (1999) a partir de fetos bovinos, identificados por antissoros específicos para este sorovar.

Diante destas questões, o isolamento e identificação dos sorovares circulantes nos rebanhos nacionais são necessários para a determinação de seus genótipos, com intuito não somente de avaliar sua adaptação e interação com as condições ambientais do Brasil, mas, sobretudo definir quais estirpes tem impacto na eficiência reprodutiva e decidir a incorporação destes nas vacinas nacionais (GENOVEZ et al., 2006a).

O controle da leptospirose é necessário para prevenir a doença clínica, as perdas econômicas e minimizar o risco de infecção humana. Uma das formas de controle depende da diminuição da prevalência da infecção com sorovares mantidos na população e na diminuição

do grau de associação ecológica das leptospiras mantidas por animais de vida livre (HATHAWAY; BLACKMORE; MARSHALL, 1981).

O objetivo principal do tratamento é o controle da doença e a interrupção da leptospiúria nos animais acometidos. A diidroestreptomicina ou outras tetraciclinas são recomendáveis na dose de 25mg/Kg por um dia, durante três ou cinco dias (RADOSTITS et al., 2000). Como medida preventiva da leptospirose, deve-se vacinar o rebanho e, frente ao diagnóstico, usar a antibioticoterapia para eliminar os portadores. Como a proteção é sorovar-específica, é importante vacinar contra os sorovares prevalentes no rebanho ou na região da criação (ELLIS, 1984).

Além da vacinação e do uso de estreptomicina nos animais, deve-se ainda aplicar estratégias que visem à redução ou eliminação dos fatores de risco. Medidas de prevenção consistem em eliminar o contato de animais sadios com os portadores de leptospiras, da mesma espécie ou espécie diferente, população de roedores e o acesso a águas de superfície onde coabitam animais silvestres.

As vacinas comerciais existentes consistem em preparações de culturas de leptospiras de diferentes sorovares inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas) (HANSON, 1977; LANGONI, 1999). Muitas destas disponíveis no mercado nacional são compostas por cinco a dez sorovares, que atendem as soroprevalências da maioria das regiões do país e sua eficácia é aumentada com a adição de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (HANSON, 1977). Em condições de campo, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção e diminui impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974). Entretanto, as bacterinas promovem proteção somente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

O diagnóstico de leptospirose se baseia em exames laboratoriais diretos, que detectam o agente etiológico, e os indiretos, pela detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro (GENOVEZ, 2006a). Reações antígeno-anticorpo são usadas na identificação de estirpes (ou sorovares) de leptospiras no diagnóstico de infecções recentes e na investigação de anticorpos residuais resultantes de infecções passadas nos indivíduos (TURNER, 1970).

A soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste padrão de referência para diagnóstico sorológico e para classificação de leptospiras em sorovares e sorogrupos como preconiza a Organização Mundial de Saúde. Recomenda-se a realização do teste com os antígenos vivos cuja densidade ideal de crescimento é atingida em culturas de 4 a 14 dias (WHO, 1967) e contendo os sorovares representativos de cada um dos sorogrupos, além de outros de

importância regional (VASCONCELLOS, 1979). Os inconvenientes para este teste são a necessidade de uma infraestrutura laboratorial e a manutenção de repiques das culturas vivas, o que gera a necessidade de mão-de-obra técnica, além de submeter o operador a riscos de contaminação (VASCONCELLOS, 1979; GENOVEZ; YASUDA, 1988).

Outro ponto importante é que embora a SAM consiga estabelecer certo grau de especificidade sorogrupo/sorovar envolvido, apresenta como desvantagem ser pouco sensível quando considerado o tempo e a elevada concentração de anticorpos necessários para a emissão do sinal. Além disto, em alguns casos não é discriminatória de infecção pregressa, ativa ou reação vacinal (FAINE et al., 1999; KEE et al., 1994). Portanto, a sorologia não reflete necessariamente o estado de portador ou eliminador de leptospiras (VAN EYS et al., 1989).

Outros ensaios têm sido aplicados como métodos alternativos de triagem soroepidemiológica para a leptospirose, como o ELISA que apresenta como vantagens a segurança, por não utilizar bactérias vivas, a alta sensibilidade, a facilidade de execução, rapidez e o baixo custo (CHAMPAGNE et al., 1991). Neste teste, são utilizados lisado total obtidos a partir de culturas bacterianas, adsorvidos em placa, cujas contaminações presentes nas preparações destas culturas, são responsáveis pela reatividade cruzada, muitas vezes, observada. Diversos ensaios imunoenzimáticos são considerados mais sensíveis que o MAT. As diferenças no desempenho destes testes se referem à sua composição, particularmente variações na preparação do antígeno (SMITH et al., 1994). Apesar da maior sensibilidade do ELISA, que eleva sua habilidade em detectar infecções recentes e o fato de que antígenos vivos não são necessitados para este teste, o ELISA possui baixa especificidade quando comparado com o SAM (SMITH et al., 1994; LEVETT, 2001). Além disso, o teste ELISA é normalmente gênero-específico, não sendo hábil para detectar o sorotipo infectante, limitando assim sua utilização para estudos epidemiológicos.

O isolamento bacteriano é o diagnóstico definitivo da doença, embora apresente baixa sensibilidade, necessitando de amostras de sangue, urina ou liquor recém-colhidas que devem ser observadas em cultura por um período mínimo de 30 dias (GENOVEZ et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004). Este método de diagnóstico apesar de suas dificuldades, sua baixa sensibilidade e ser dependente da viabilidade das leptospiras é importante para o conhecimento da doença. Permite conhecer a epidemiologia da enfermidade e possíveis mudanças do perfil de infecção numa espécie animal ou habitat ao longo dos anos.

Em vista da necessidade de suprir as falhas diagnósticas de isolamento e do diagnóstico sorológico pela SAM ou ELISA vem sendo empregados métodos com maior

sensibilidade, especificidade e rapidez (MAGAJEVSKI, 2002), como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que permite amplificar sequências específicas a partir de quantidades mínimas de DNA do microrganismo em diversos tipos de amostras biológicas, tais como soro, líquido cérebro-espinhal, urina, fezes e tecidos (BAL et al., 1994; SCARCELLI et al., 2004). Além disso, a PCR possibilita a identificação de leptospiras em materiais de difícil isolamento, tais como fetos abortados (SCARCELLI et al., 2004) e sêmen nas centrais de inseminação artificial (GOTTI, 2007). Porém, a mais importante limitação desta técnica como método diagnóstico gênero específico é a impossibilidade de identificar a estirpe infectante e relacioná-las aos dados epidemiológicos.

O ensaio do tipo *dipstick*, empregando antígenos preparados a partir de culturas de *L. biflexa* inativadas pela ação do calor, também já foram estudados e são comercialmente disponíveis. Neste caso, a detecção é feita utilizando-se anti-IgM conjugado com corante coloidal. A fita é colocada em contato com a amostra de soro e quando existem anticorpos da classe IgM os mesmos se ligam aos antígenos da fita e são detectados pela ligação do conjugado marcado (SMITS et al., 2000). Este método apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis com os obtidos para o ELISA IgM com a vantagem de ser de execução simples e rápida e utiliza pequeno volume de amostra. Entretanto, como é utilizado o lisado total de leptospira também é observada reatividade cruzada, o que pode resultar em resultados falso-negativos (GUSSENHOVEN et al., 1997; SMITS et al., 1999).

Recentemente, testes imunocromatográficos que empregam o uso de proteínas recombinantes vêm sendo estudados como novos métodos diagnósticos para a leptospirose e outras enfermidades. A detecção de anticorpos, através de teste imunocromatográfico, para outros patógenos também vem sendo amplamente aplicados, como para as doenças causadas por *Anaplasma marginale* (NILSEN et al., 2007); *Yersinia pestis* (RAJERISON et al., 2009); *Neisseria meningitidis* (ROSE et al., 2010); *Theileria annulata* (ABDO et al.,, 2010); *Treponema pallidum* (LIN et al., 2010); *Salmonella typhi* (PREECHAKASEDKIT; PINWATTANA; DUNGCHAI, 2011); vírus da peste suína clássica (LI et al., 2012); circovírus suíno 2 (JIN et al., 2012); entre outras. Alvarez et al. (2010) realizaram um teste imunocromatográfico para o diagnóstico de anemia infecciosa equina com a proteína recombinante p26 proteína do capsídio, apresentando sensibilidade de 98,3% e especificidade de 87,4% quando comparado a imunodifusão em gel de agarose. Wang et al. (2011) realizaram o teste imunocromatográfico para o diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa* com a proteína recombinante OprF e obteve uma sensibilidade de 84,8% quando comparou com PCR multiplex.

Um teste rápido em látex (LAT) com antígeno recombinante (LipL32) foi utilizado realizados em soros de cães e humanos, para o diagnóstico da leptospirose (DEY et al., 2007). Nabity et al. (2012) desenvolveram um teste DDP (*Dual Path Plataform)* utilizando a proteína recombinante pertencente a uma família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos para o diagnóstico de leptospirose em humanos. Ambos os teste apresentaram boa especificidade e sensibilidade, porém o aprimoramento do teste na detecção na fase aguda da doença se faz necessário, principalmente focando na melhoria da sensibilidade do teste.

Outros ensaios como o que detecta a presença de leptospiras na urina utilizando nano partículas de ouro (CHIRATHAWORN et al., 2011; WIDIYANTI et al., 2013) e o desenvolvimento de PCR de imunocaptura (IC- PCR) utilizando anticorpos policlonais e monoclonais para diferentes sorovares e sorogrupos de *Leptospira* têm sido descritos (BALASSIANO; VITAL-BRAZIL; PEREIRA, 2012). Goarant et al. (2013) desenvolveram um teste rápido de fluxo lateral vertical para detecção de IgM em humanos. Obtiveram valores bons em relação à sensibilidade (89,8%) e à especificidade (93,7%) do teste. Porém, foi utilizado lisado total de *Leptospira faine*, podendo apresentar reações cruzadas.

A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeira criada para o estudo das proteínas séricas. Também conhecida como teste imunocromatográfico (TIC), ensaio de fluxo lateral, *dipstick* ou ensaio de fita, a técnica utiliza as propriedades da reação antígeno-anticorpo para a rápida detecção do analito (JIN et al., 2005).

O teste imunocromatográfico (TIC) se tornou amplamente utilizado no diagnóstico e na triagem de diversas patologias como diabetes, doenças cardíacas e renais, nas e doenças infecciosas como: dengue, malária, amebíase, peste bubônica, brucelose, giardíase, leishmaniose visceral, hepatite B, infecção por HIV, cinomose, parvovirose, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, entre outras. Este método possui como principais características a de ser de baixo custo, simples e ser realizado em um curto período de tempo, entre 15 a 30 minutos (LIN et al., 2010). Esta técnica permite identificar doenças com mais rapidez aumentando as chances de recuperação dos pacientes.

Considerando as facilidades descritas, os testes imunocromatográficos têm sido muito aplicados no diagnóstico em domicílio, no campo ou em regiões com poucos recursos. Seu emprego inclui diferentes moléculas alvo, como: antígenos, anticorpos, hormônios, citocinas, receptores de células, haptenos, resíduos de drogas, ácidos nucléicos, oligonucleotídeos e marcadores sanguíneos (ZHANG; GUO; WANG, 2009), podendo se utilizados pelas áreas

médica, veterinária e sanitária (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Os modelos dos imunoensaios do teste imunocromatográfico existentes são do tipo sanduíche, inibição ou competição. A técnica do teste imunocromatográfico, é uma metodologia de detecção baseada na utilização de tiras de um material de suporte impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. O sistema é realizado em uma matriz constituída de membrana de nitrocelulose ou de náilon coberta por acetato transparente para facilitar a visualização do teste.

Os componentes do teste são: anticorpos ou antígeno de detecção que são marcados com um gerador de sinal, normalmente esferas de látex ou ouro coloidal, e outro anticorpo ou antígeno, que é denominado partícula de captura, ambos são imobilizados sobre superfície sólida. Os anticorpos ou antígenos de detecção, conjugados com ouro, são colocados em um estado desidratado na membrana de fibra de vidro de modo que são dissolvidos quando em contato com o meio aquoso contendo o analito (MILLIPORE, 2008). Em seguida, forma-se o complexo analito-conjugado, no qual este migra por capilaridade do meio até ser capturado pelo anticorpo ou antígeno previamente imobilizado sobre a superfície da membrana de nitrocelulose na linha teste (SHYU et al., 2002; MURRAY et al., 2008). Um anticorpo adicional específico para o anticorpo de detecção pode ser utilizado para produzir um sinal na linha controle. A fibra de celulose possui a atribuição de aumentar o volume da amostra que entra na tira do teste. Sua função é absorver tanto os reagentes de revelação quanto a amostra que migraram pelos poros das membranas, garantindo uma absorção contínua dos componentes do sistema na plataforma (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Nos testes imunocromatográficos os marcados mais utilizados para preparação do conjugado são o látex e o ouro coloidal. As partículas de ouro são menores que as de látex, e mais comumente usadas nestes testes (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Outros conjugados de enzimas, metais coloidais, partículas fluorescentes e partículas magnéticas também são usadas (MILLIPORE, 2008).

O resultado do teste imunocromatográfico é considerado positivo quando duas linhas são visíveis, sendo uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T). A intensidade de cor da linha teste (T) poderá variar de acordo com a concentração presente na amostra. Todavia, qualquer intensidade de cor na linha teste indica resultado positivo. No resultado negativo apenas uma linha é visível na região controle (C), não sendo observada linha na

região teste. O teste é considerado inválido quando não é evidenciada a linha controle (C). As razões mais comuns de falha são o volume insuficiente de amostra ou falha no procedimento técnico. Neste caso, rever a técnica e repetir o teste com uma nova tira.

Recentemente, foram sequenciados oito genomas de *Leptospira* spp, sendo de dois sorovares de *L. interrogans* (Lai e Copenhageni) (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a,b), de duas estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis (L550 e JB197) (BULACH et al., 2006); de duas estirpes da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc I (Paris e Ames) (PICARDEAU et al., 2008); de duas estirpes de *L. licerasiae* sorovar Varillal (VAR010 e MMD0835) (RICALDI et al., 2012). As análises computacionais destas sequências têm contribuído para a identificação de genes que codificam proteínas possivelmente envolvidas na patogênese da doença, na virulência e na interação patógeno-hospedeiro. Estes estudos são de grande importância na busca de proteínas para serem utilizadas no desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos mais eficientes.

A proposta deste trabalho é utilizar proteínas recombinantes de *Leptospira* spp. como antígenos no desenvolvimento de um teste rápido baseado em ensaio imunocromatográfico do tipo *dipstick*, como possível método diagnóstico da leptospirose animal. Métodos sorológicos utilizando proteínas recombinantes como antígenos podem possibilitar sensibilidade e especificidade maiores devido à maior concentração de antígenos imunoreativos e à ausência de sítios inespecíficos. Tomich et al. (2009) observou em bovinos uma alta sensibilidade e especificidade apresentada pelo Teste IgG ELISA utilizando a lipoproteína de membrana externa LipL32 em sua forma recombinante. Os resultados obtidos sugerem a aplicação deste teste em investigações soroepidemiológicas de leptospirose bovina, para triagem de animais positivos, conferindo mais rapidez e praticidade aos procedimentos laboratoriais.

As proteínas escolhidas para este trabalho (Quadro 1) são prováveis lipoproteínas de membrana externa e foram identificadas utilizando ferramentas de bioinformática em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo (BARBOSA et al., 2010).

As lipoproteínas bacterianas são um grupo importante de proteínas de membrana que possuem a cisteína amino-terminal covalentemente ligada a ácidos graxos. São sintetizadas com um peptídeo sinal, clivado por uma peptidase sinal antes da ligação covalente aos ácidos graxos. Em *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 foram identificadas 136 prováveis lipoproteínas (NASCIMENTO et al., 2004a; SETUBAL et al., 2006). Esta diversidade sugere que muitas funções celulares podem ser dependentes destas proteínas, como formação e estabilização da parede celular, transporte de substratos, interação bactéria-

hospedeiro e virulência, como já descrito para outras bactérias (BABU; SANKARAN, 2002; SUTCLIFFE; HARRINGTON, 2004).

As lipoproteínas Lp25, Lp11, Lp22, Lp35 e LipL32 (Quadro 1) são hipotéticas e ainda não foram identificadas em nenhum outro organismo e as proteínas Lp21, Lsa30, LcpA, LigA e LigB já possuem funções descritas (BARBOSA et al., 2010).

Resultados obtidos com a Lp21 mostraram que esta proteína é expressa nas células dos túbulos renais de animais infectados, está localizada na membrana externa da bactéria e também é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e E-selectina) em células endoteliais (HUVECS) (VIEIRA et al., 2007).

Estudos descreveram a capacidade da proteína Lsa30 em aderir a componente de matriz extracelular como fibronectina plasmática e laminina, atuando como receptora de plasminogênio e podendo ocasionar a atividade proteolítica através da produção de plasmina. Além disso, esta proteína interfere na cascata de complemento através da interação com o regulador de C4BP (SOUZA et al., 2012). As moléculas de adesão são proteínas localizadas na superfície de células eucarióticas e estão envolvidas nas interações celulares ou com a matriz extracelular. Muitas bactérias, como a leptospira, invadem os tecidos do hospedeiro através da habilidade de se ligarem às moléculas de adesão.

A proteína codificada pelo gene LIC11947 (Quadro 1) foi caracterizada, por nosso grupo, como a primeira proteína de leptospira capaz de interagir com a proteína reguladora de complemento C4BP (BARBOSA et al., 2010). Devido a esta função, esta proteína foi nomeada de LcpA, para *Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*. É conservada em diferentes espécies de leptospiras patogênicas e está ausente nas espécies saprófitas. A habilidade de escapar aos mecanismos de defesa imune, dentre os quais os sistemas fagocítico e complemento, parecem constituir uma estratégia essencial para que as leptospiras patogênicas sobrevivam e consigam invadir os tecidos do hospedeiro (BARBOSA et al., 2010).

As Lig (Leptospiral immunoglobulin-like) são pertencentes à família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos. Três genes lig (*lig*A, *lig*B e *lig*C) já foram descritos e só estão presentes em espécies patogênicas. O gene ligB é encontrado em várias espécies de leptospiras enquanto ligA é restrito às espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e ligC é um pseudogene (PALANIAPPAN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE , 2004; CERQUEIRA et al., 2009). As proteínas LigA e LigB estão localizadas na membrana externa da bactéria e participam dos processos de adesão das leptospiras às células do tecido do hospedeiro. Possuem as regiões

amino-terminais idênticas, que correspondem a seis domínios Big repetidos, seguidas por uma região variável de aproximadamente sete domínios Big repetidos. LigB apresenta ainda uma região carboxi-terminal sem domínios Big repetidos (MATSUNAGA et al., 2003). Estas proteínas se ligam a uma variedade de componentes da matriz extracelular mediando a adesão das bactérias a células hospedeiras. Além disso, interagem com reguladores negativos do sistema complemento humano ajudando no processo para o processo de evasão ao sistema imune inato (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

A LipL32 é a mais abundante proteína de membrana externa de espécies patogênicas de *Leptospiras*, tem sido considerada um promissor candidato à antígeno vacinal embora seja capaz de induzir somente imunidade protetora parcial em hamsters desafiados com inóculo letal de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000). Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro à LipL32 é bastante intensa (NABITY et al., 2012). Essas características sugerem que a LipL32 seja adequada ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE et al., 2000). A lipoproteína recombinante LipL32 tem sido utilizada em ELISAs para diagnóstico de leptospirose humana (FLANNERY et al., 2001), canina (DEY et al., 2004) e bovina (BOMFIM; KO; KOURY, 2005; TOMICH et al., 2009).

Quadro 1- Proteínas recombinantes utilizadas neste estudo

Nomenclatura do Genoma[a]	***Nomenclatura da proteína***	***Anotação do Genoma***
LIC10009	Lp25	Provável lipoproteína
LIC10301	Lp11	Provável lipoproteína
LIC10507	Lp21	Provável lipoproteína
LIC10704	Lp22	Provável lipoproteína
LIC11030	Lp35	Provável lipoproteína
LIC11087	Lsa30	Provável lipoproteína
LIC11947	LcpA	Provável lipoproteína
LIC10465	LigAC porção C-terminal	Lipoproteína com domínios IgG-*like*
LIC10464	LigBN porção N-terminal	Lipoproteína com domínios IgG-*like*
LIC10464	LigBC porção C-terminal	Lipoproteína com domínios IgG-*like*
LIC11352	LipL32	Lipoproteína

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a utilização de proteínas recombinantes de *Leptospira* spp. como antígenos no desenvolvimento de um teste rápido baseado em ensaio imunocromatográfico do tipo *dipstick*, como método diagnóstico da leptospirose animal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar as proteínas recombinantes.
- Selecionar amostras de soros de animais da espécie bovina reagentes e não reagentes para a leptospirose provenientes da rotina dos Laboratórios de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP através do teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM).
- Avaliar a utilização das proteínas recombinantes purificadas na detecção de anticorpos específicos em amostras clínicas por *Western-blotting.*
- Confirmar os resultados positivos por *ELISA*-IgM e IgG.
- Conjugar o ouro coloidal ao anticorpo ou antígeno.
- Desenvolver, padronizar e montar o teste imunocromatográfico com a proteína recombinante selecionada.
- Analisar em amostras clínicas o teste imunocromatográfico desenvolvido em plataforma automatizada.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas selecionadas para este trabalho estão descritas na tabela 1. As clonagens dos genes LIC10009 (Lp25); LIC10301 (Lp11); LIC10507 (Lp21); LIC10704 (Lp22); LIC11030 (Lp35); LIC11087 (Lsa30); LIC11947 (LcpA); LIC10465 (LigAC); LIC10464 (LigBN); e LIC10464 (LigBC), em vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004), foram realizadas por trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). A construção pDEST-17- LipL32 foi gentilmente cedida pelo Dr. Paulo Lee Ho do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (HAUK et al., 2009). Os vetores de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) e pDEST-17 possibilitam a purificação da proteína recombinante através de colunas de afinidade a metal, pois adicionam seis resíduos de histidinas na extremidade amino-terminal da proteína a ser expressa. A expressão da proteína recombinante só ocorre na presença da T7 RNA polimerase. Para isto, foram utilizadas as linhagens *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) que possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma, sob o controle do promotor *Lac*UV5, induzível por isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) ou a linhagem *E. coli* BL21-SI (LifeTechnologies) com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *pro*U, induzível por NaCl.

Para purificação das proteínas recombinantes, colônias isoladas das transformações com as construções em pAE ou pDEST-17 foram inoculadas em meio LB para BL21 ou LBON (meio LB sem NaCl) para BL21-SI suplementado com ampicilina. A cultura foi incubada a 37°C para BL21 ou 30°C para BL21-SI por 12-18 horas, sob agitação. Este pré-inóculo foi transferido para meio fresco contendo ampicilina, utilizando-se uma diluição 1:20. A cultura foi incubada novamente sob agitação até O.D. 600nm = 0,6-0,8. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com a adição de 1 mM de IPTG ou 300 mM de NaCl por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. As células foram coletadas por centrifugação (2.057x g por 15 minutos a 4 °C), e o sedimento bacteriano foi pesado e armazenado a – 70 °C até o momento do uso.

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

gelo. A suspensão resultante da lise foi centrifugada a 12.857x g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e mantido a 4°C até o momento da purificação. O sedimento (corpúsculos de inclusão-fração insolúvel) foi lavado 2 vezes com tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0) acrescido de 1M uréia, 0,1% de triton (v/v) e 5 mM β-mercaptoetanol. Os corpúsculos lavados foram congelados a - 70 °C até a purificação. Amostras da fração solúvel, fração insolúvel e das lavagens foram analisadas em gel SDS-PAGE com 15 % de acrilamida segundo protocolo descrito em Sambrook et al. (1989).

As proteínas recombinantes expressas na fração solúvel (Lp25, Lp21, Lp22 e LipL32) foram purificadas utilizando-se resina de afinidade metálica *("Fast Flow chelating Sepharose"* – GE Healthcare) carregada com 5 volumes de 100 mM NiSO4 e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e 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 10 volumes do tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9) e 20 volumes do tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 60 mM de imidazol e pH 7,9). A proteína recombinante foi eluída com 6 volumes do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 M imidazol e pH 7,9). A proteína purificada foi dialisada progressivamente contra: (i) tampão 1 (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, 0,1 % glicina, 1 mM EDTA e pH 7,9); (ii) tampão 2 (10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 % glicina e pH 7,9; (iii) PBS com 0,1% glicina e pH 7.6. Frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE com 15 % acrilamida.

As proteínas expressas na fração insolúvel (Lp11, Lp35, Lsa30, LigAC, LigBN, LigBC) foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade metálica *("Fast Flow chelating Sepharose"* - GE Healthcare). Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão lavado foi ressuspendido em 10 volumes (p/v) de tampão de solubilização (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol, 0,1% de triton (v/v), 8M uréia e pH 7,9) e mantido a temperatura ambiente por 2 horas com agitação. Posteriormente, o solubilizado foi diluído 100X em 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM imidazol e pH 7,9, lentamente. Esta solução foi adsorvida (fluxo 1 ml/min) à coluna de afinidade a metal, previamente carregada com 5 volumes de 100 mM NiSO4 e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5mM 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 realizado utilizando-se método microanalítico com reagente de Bradford (Pierce Protein Research Products, Thermo Fisher Scientific). Para cada 10 µl de amostra utilizaram-se 100 µl de reagente de Bradford diluído cinco vezes em PBS, numa placa de microdiluição. Como controles foram adicionados 10 µl de uma solução contendo albumina numa concentração conhecida e 100 µl do tampão PBS. Através da leitura da absorbância a 595 nm, a concentração da proteína foi estimada e dessa maneira as amostras serão selecionadas para análises em gel de SDS-PAGE.

A concentração da proteína recombinante purificada e dialisada foi calculada pela leitura espectrofotométrica a 280 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção (ε), pela fórmula de Lambert e Beer (Do = C.I. ε, onde C é a concentração molar da proteína e I é o caminho óptico). Os coeficientes de extinção das proteínas recombinantes foram calculados por programa disponível em servidor público (http:// www.expasy.ch/).

3.2 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE

As eletroforeses foram realizadas segundo protocolos descritos por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), utilizando-se géis de empilhamento com 1 mm de espessura, 5% de bisacrilamida/acrilamida e 15% de bisacrilamida/acrilamida no gel de separação (a partir de uma solução de 29% Acrilamida e 1% Bisacrilamida). As eletroforeses foram feitas a 8 V/ cm de gel de empilhamento e 15 V/cm de gel de separação, a temperatura ambiente.

Posteriormente, os géis foram corados com *"Coomassie Blue Brillant R-250"* (*USB*) em 50% etanol e 10% ácido acético em água por 1-2 horas a temperatura ambiente e descorados com solução de 30% etanol e 10% ácido acético em água. Para secar, foram envoltos em papel celofane.

3.3 SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)

A técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, utilizando 24 variantes sorológicas de *Leptospira* spp.

As culturas de leptospiras foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado (FAINE et al., 1999) suplementado com 10% de soro estéril de coelho e inativado a 56ºC por 30 minutos, enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina e incubadas durante sete a dez dias em estufa bacteriológica a 28ºC. Cada cultura foi examinada quanto à pureza e ausência de autoaglutinação em microscopia de campo escuro em aumento 100X. A densidade antigênica obtida foi conteve aproximadamente de 100 a 200 microrganismos por campo microscópico (100X). Cada amostra de soro foi diluída a 1:50 em solução salina tamponada de Sorënsen (pH 7,4). Desta diluição, 50 µL foram colocados em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços (COSTAR) e acrescentados de 50 µL do cultura, obtendo-se diluição inicial 1:100. Cada amostra sorológica foi colocada frente à bateria antigênica com 24 sorovares. As microplacas são incubadas em estufa bacteriológica a 28 º C por três horas. Os soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final de aglutininas antileptospiras, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorënsen (pH 7,4) e acrescidos de 50µL do antígeno que foi detectado como positivo na triagem.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 º C por três horas. As leituras foram realizadas em microscópico óptico microscópio Jena Zeiss com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 10x/0,20 e de ocular 10 (100X) observando-se a formação de aglutinações. Na triagem, os soros na diluição de 1:100 que obtiveram 50% ou mais leptospiras aglutinadas foram titulados frente aos respectivos antígenos. O título final foi a recíproca da maior diluição (>100) que apresentou pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas (FAINE et al., 1999).

3.4 WESTERN-BLOTTING

Os títulos dos soros obtidos por *ELISA* foram utilizados como referência na diluição dos mesmos nos experimentos de *Western-Blotting.* As proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) e transferidas por sistema úmido (*BioRad Laboratories)* para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL - GE Healthcare*), durante uma hora a 0,65 mA/cm de gel, imersos em tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM Glicina, 20% etanol e 0, 037% SDS, pH 8,3). Após a transferência, a

membrana foi corada com Ponceau S (0,1% Ponceau em 10% ácido acético), O excesso de corante foi lavado com água destilada e a membrana e digitalizada para monitorização da transferência. O gel foi corado com 0,25% de *Coomassie Blue Brillant* em 50% etanol e 10% ácido acético em água, por 1-2 horas, a temperatura ambiente e descorado com solução de 30% etanol e 10% ácido acético em água para controle da transferência (BURNETTE, 1981).

Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,2% Tween-20) sob agitação, por 16 horas, a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,2% Tween-20) sob agitação por 15 minutos.

A reação com o primeiro anticorpo foi feita com soro dos animais, na diluição 1:100 seguido de incubação com o segundo anticorpo anti-IgG bovino conjugado com peroxidase (*KPL*) na diluição 1:5000. Os soros e anticorpos foram diluídos em PBS-T e as incubações foram realizadas por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Depois de cada incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T, por 15 minutos, à temperatura ambiente com agitação. A detecção foi realizada através da utilização de *"kit"* ECL (*GE Healthcare*). A membrana foi exposta a filme de raios-X (*Hyperfilm - GE Healthcare*) por tempos curtos (30 segundos a 2 minutos), o filme revelado e digitalizado.

3.5 ELISA

O *ELISA* (*enzyme-linked immunosorbent assay)* foi feito segundo método descrito em Sato et al. (1983). Para a adsorção dos antígenos, placas de microdiluição de 96 poços de poliestireno de alta afinidade foram expostas a uma solução de 5 μg/mL de cada proteína recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas, por 16 horas, a 4 °C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20, por 1 hora, a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio. Após as lavagens, foram realizadas diluições seriadas dos soros dos animais em tampão de diluição (1% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,01% Tween-20). Seguida pela incubação por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS-T

e a reação com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase, diluído 1:5000 em tampão de diluição, foi realizada, por 1 hora, a 37 °C, seguido de lavagens como descrito anteriormente.

O reconhecimento foi realizado através de reação, com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato na presença de traços de H_2O_2, por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2 N de H_2SO_4 e a intensidade da reação foi determinada pela leitura da DO em 492 nm (*Multiskan EX*, Thermo Fisher Scientific).

3.6 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE LipL32

Para a produção deste soro hiperimune, um coelho foi imunizado por via intramuscular com 250 μg da proteína recombinante purificada, com dois reforços em intervalo de aproximadamente 15 dias. Os animais foram sangrados após última imunização. O soro obtido foi purificado por precipitação com ácido caprílico. A fração enriquecida em IgG de cada um dos soros de animais com a diferentes proteínas foi obtida conforme metodologia descrita por McKinney e Parkinson (1987). Para isso, cada um dos soros foi diluído em quatro volumes de tampão acetato de sódio 60 mM pH 4,0 e o pH final ajustado para pH 4,5. O ácido caprílico foi adicionado gota-a-gota, na proporção de 25 μL por mL da solução, a temperatura ambiente sob constante agitação. Após 30 min, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min a 4 ºC. O sobrenadante foi coletado e acrescido de PBS 0,1 M pH 7,2 (1 parte de PBS para 9 partes do sobrenadante), sendo o pH final ajustado para 7,4 com NaOH 1 M. A seguir, o sobrenadante foi resfriado a 4 ºC e submetido à precipitação com sulfato de amônio (0, 227 g de sulfato de amônio por mL da solução) a 4 ºC por 1 h sob agitação. A solução foi centrifugada a 5.000 x g por 15 min a 4 ºC e o sobrenadante desprezado. O precitado foi dissolvido com PBS 0,01 M pH 7,2 (cerca de 1/10 do volume original do soro) e submetido à diálise contra PBS por dois dias com duas trocas por dia. A solução obtida foi filtrada em filtro de poro 0,45 μm e o conteúdo protéico foi determinado pelo *Kit Qubit ® Fluorometer* (Invitrogen) A titulação dos soros foi feita por ELISA.

3.7 PRODUÇÃO DO SORO DE COELHO ANTI-IgG BOVINO

Para a produção do soro anti IgG bovino, um coelho foi imunizado por via intramuscular com 250 µg da imunoglobulina bovina IgG (sigma), com dois reforços e intervalo de 15 dias entre cada aplicação. O soro de coelho obtido foi purificado em coluna de afinidade à proteína G Sepharose (*HiTrap* ^{TM} *Protein G HP Columns* - GE Healthcare). A proteína G-Sepharose foi escolhida, pois possui maior afinidade à IgG de coelho e mínima ligação à albumina, resultando em uma purificação eficiente e de grande rendimento. Para tanto, a coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes do tampão de ligação (fosfato de sódio 20mM pH7,0). Em seguida, a amostra contendo anti-IgG foi adsorvida (fluxo 1 ml/min) à coluna de proteína G, com posterior lavagem com 5 volumes do tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, para retirada das proteínas não adsorvidas. Em seguida, as proteínas ligadas a matriz da coluna (anticorpos) foram eluídas com tris-glicina (1 M, pH 9,0 tris e 0,1 M, pH 2,7 glicina) Imediatamente, o pH da amostra coletada na eluição foi neutralizado com solução de tris HCL (1 M, pH 9,0). A amostra correspondente ao pico de eluição foi dialisada contra PBS. A solução obtida foi filtrada em filtro de poro 0,45 µm e o conteúdo protéico foi determinado pelo *Kit Qubit ® Fluorometer* (Invitrogen). Para verificar o grau de pureza dos anticorpos, 10 µg do conteúdo protéico foram submetidas à SDS-PAGE 12% e o gel corado com *Comassie Blue* (Bio-Rad). A titulação dos soros foi feita por ELISA.

3.8 DESENVOLVIMENTO DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

O protocolo de conjugação do ouro coloidal com antígeno (proteína recombinante) ou anticorpo (anticorpo anti-IgG) foi realizado de acordo com o método descrito por Oliver (2010). Para isso, 1 mg do antígeno (Ag) ou anticorpo (Ac) foi ressuspendido em tampão borato 0,2 M (borato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 7,0) e dialisado contra tampão borato 2 mM (borato de sódio 2 mM, NaCl 1,5 mM, pH 7,0) a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, a quantidade ótima de antígeno ou anticorpo necessária para estabilizar o ouro coloidal foi determinada utilizando-se 100 µl de ouro coloidal a 0,01% (20nm, Sigma) e 10 µl de diluições seriadas do antígeno ou anticorpo tampão borato 2 mM. A quantidade de

Ag ou Ac satisfatória para estabilizar o ouro foi a observada na diluição em que a solução não sofreu alteração de cor.

Em seguida, a conjugação foi realizada adicionando-se 10 ml da solução de ouro coloidal a 0,01% à quantidade de antígeno ou anticorpo determinada na etapa anterior, mantendo-se em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi estabilizada com 1% de BSA em agitação por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4º C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 2 ml de 2% BSA (2% de BSA em 0,01M de tampão borato) e centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4º C. Esta etapa foi repetida mais uma vez para a completa eliminação das proteínas livres. Por fim, o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de tampão de armazenamento (3% de BSA, 3% de sacarose, 0,01 M de borato de sódio e 0,05% de azida de sódio) e armazenado a 4º C até o momento do uso.

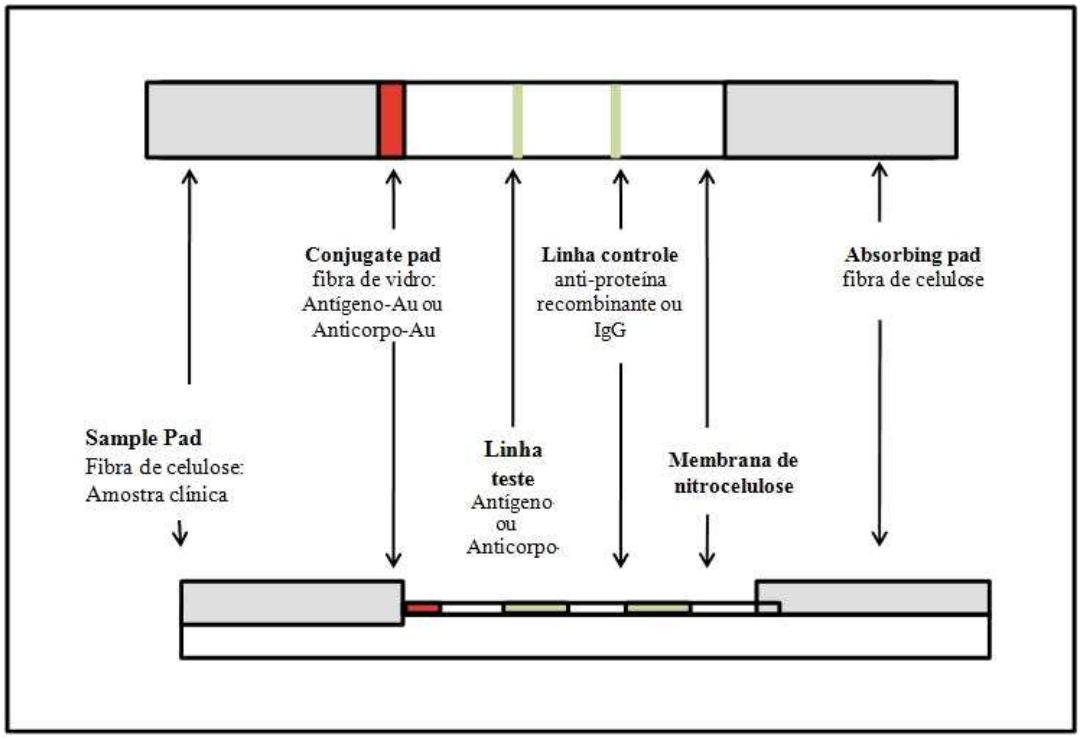
No quadro 2, são mostrados os papéis utilizados no teste imunocromatográfico e suas características. Cada tipo de papel foi tratado antes da montagem da fita separadamente. Os papéis *Sample pad e* foi imerso em Tampão *pad* Tween (20 mM de tampão borato de sódio; 0,05% de azida de sódio, 3% pH 7) e secos a temperatura ambiente em dessecador a vácuo *overnight*; no *conjugate pad* (fibra de vidro) foram aplicados na membrana 20 µL da solução da proteína recombinante conjugada ao ouro nas membranas. Em seguida, as membranas foram secas em dessecador a vácuo *overnight*. No *Nitrocellulose HiFlow Plus*, 1,5 µL de anticorpo anti-IgG bovino ou anticorpo anti-IgG Hamster diluídos em PBS 0,01 M pH 7,2 foram aplicados na linha teste 1,5 µL do anticorpo anti-proteína recombinante (anti-LipL32) feito em coelho foram aplicados após 0,5 cm da linha teste, sendo esta a linha controle. O *absorbing pad* não necessita de tratamento.

Para montagem do teste, os papéis previamente tratados foram sobrepostos em uma base plástica de aproximadamente 6 x 0,5 cm e fixados com auxílio de fita adesiva dupla-face conforme o esquema da figura 1.

Quadro 2 - Papéis utilizados no teste imunocromatográfico e suas características

Tipo de papel	Marca	Medidas	Função
Nitrocellulose HiFlow Plus HFB24004	Millipore	2 X 0,5 cm	Possibilitar o fluxo da amostra para reagir com a linha teste e linha controle
Cellulose fiber sample pad e absorbing pad	Millipore	2 X 0,5 cm	Absorver a amostra no início *(sample pad)* e final da fita *(absorbing pad)*
Glass fiber conjugate pad	Millipore	1 X 0,5 cm	Região de localização do Ab ou Ag conjugado com ouro coloidal

Figura 1 - Esquema de montagem do teste imunocromatográfico



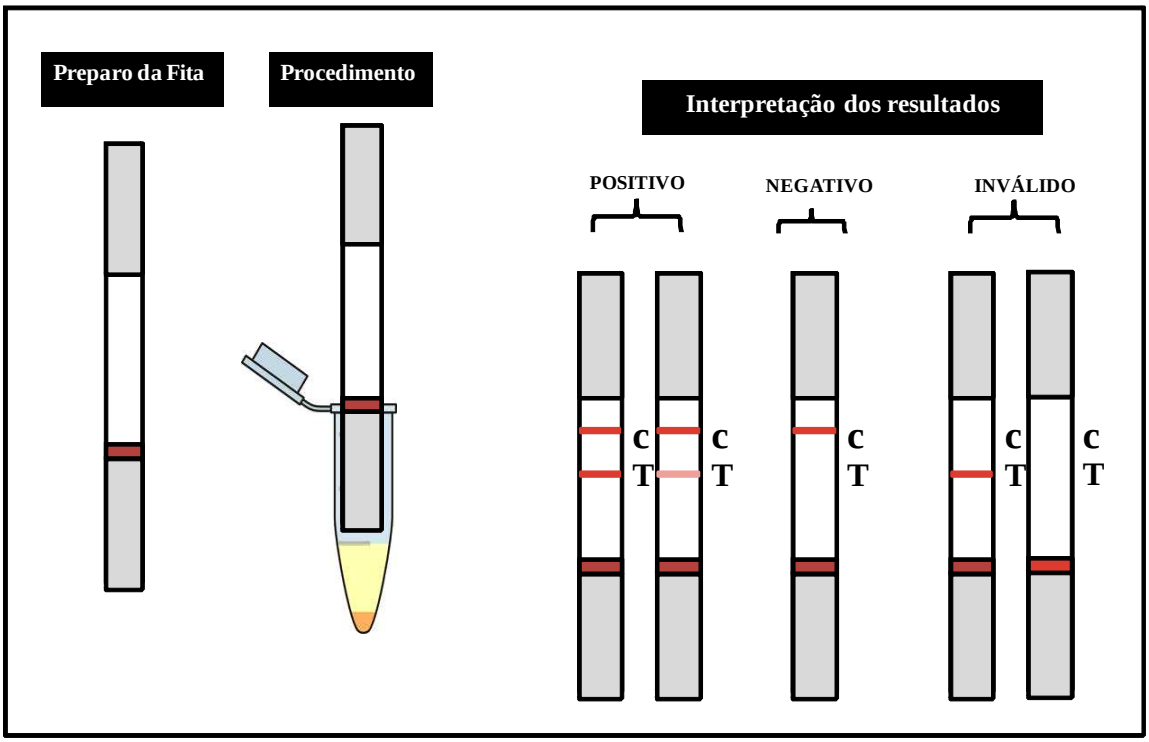
Fonte: Gotti (2015)

Legenda: Representação esquemática demonstrando a montagem pela sobreposição das membranas e os principais componentes para construção da fita imunocromatográfica; Antígeno-Au (antígeno conjugado com ouro coloidal); Anticorpo (anticorpo conjugado com ouro coloidal).

Para a aplicação do teste, a porção final (*sample pad)* da fita foi colocada em contato com a amostra de soro. Os tempos de incubação e as diluições das amostras dos soros dos animais para o desenvolvimento serão definidos após padronização da técnica. Neste ensaio piloto, foi utilizada uma incubação de 20 minutos, com uma diluição de 1:10 do soro e a leitura realizada visualmente.

A intensidade de coloração avermelhada é o indicativo da reação positiva. O teste é considerado positivo, quando as duas linhas (linha teste e linha controle) foram visíveis, independentemente da variação da intensidade de cor. Na reação negativa apenas a banda controle deverá estar corada (Figura 2).

Figura 2 - Interpretação do teste imunocromatográfico



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: A interpretação do teste é realizada após 20 minutos de contato com a amostra. Resultados: O teste é POSITIVO: quando duas linhas são visíveis, uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T), NEGATIVO: quando apenas uma linha controle (C) é visualizada, não sendo observada a linha teste (T) e INVÁLIDO: quando não é observado a linha controle (C).

3.8.1 Tratamento dos papéis do teste imunocromatográfico e outros parâmetros do teste

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste diversos parâmetros foram analisados, como região de bloqueio, pré-tratamento dos papéis, concentração dos reagentes na linha teste utilizando a sacarose, diluição da amostra teste, tampões de amostras, utilizando-se o modelo tipo I com soro hiperimune de coelho.

O papel *Sample pad*, que entra em contato com a amostra, foi bloqueado com dois tipos de tampões: 1) Tampão *pad* (20 mM de tampão borato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de azida de sódio, pH 8,5) contendo 1% de BSA; 2) Tampão *pad* Tween (20 mM de tampão borato de sódio; 0,05% de azida de sódio, 3% pH 7. Depois de imergidos nos tampões, foram secos, *overnight* de três formas distintas: em temperatura ambiente; 56 ºC por 2 h e em dessecador à vácuo.

Na fibra de vidro, porção *conjugate pad,* foram aplicados na membrana 20 µL da solução da proteína recombinante conjugada ao ouro. Em seguida, as membranas foram secas em dessecador à vácuo (Solab) e umidade relativa e 20-22 por duas horas e *overnight*.

Para tentar melhorar o grau de absorção no momento da aplicação dos reagentes na linha teste e na linha controle, testamos diversos tamanhos de membrana de nitrocelulose e sua ativação da membrana com posterior bloqueio da mesma. As membranas de *Nitrocellulose HiFlow Plus* dos tamanhos 75, 135, 180 e 240 foram testadas quanto a sua melhor absorção. Posteriormente foi realizada a ativação da membrana de nitrocelulose utilizando solução de tris HCL com glicerol a 0,4% por 15 minutos com agitação. Posteriormente, a membrana de nitrocelulose foi lavada uma vez com solução de lavagem Na_2HPO_4 10 mM pH 7,5 e seca na estufa a 37°C durante a noite. Após a ativação, foram aplicados os reagentes na linha teste e controle (1,5 µL de anticorpo anti-IgG Coelho, 2mg/ml, diluídos em PBS 0,01 M pH 7,2 na linha teste e 1,5 µL do anticorpo anti-LipL32, 2mg/ml, na linha controle). A seguir, a membrana foi seca em temperatura ambiente em dessecador à vácuo *overnight.* Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução tris HCL 0,1M pH 7.6 contendo 2% BSA, por 15 minutos em agitação e temperatura ambiente. Em seguida, a nitrocelulose foi lavada cinco vezes por dois minutos com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,5 e uma vez com tris HCL com 0,4% glicerol. Após a lavagem, a membrana foi seca em temperatura ambiente na câmara de vácuo *overnight.*

Para a eliminação de sais que pudessem interferir no teste, foi realizada a diálise da solução da linha teste (anticorpo ou proteína), neste caso para padronização foi utilizado anti-IgG Rabbit. Posteriormente, diferentes concentrações de sacarose foram 3%, 5%, 9% adicionados à solução dialisada, que foi aplicada na linha teste. A membrana de nitrocelulose não foi ativada e nem bloqueada.

Diferentes diluições do soro teste foram testadas. Utilizando a amostra pura, diluídas 1:5 e 1:10. Além das diluições, as amostras foram testadas com diferentes tampões de amostras:

-PBS uma vez;

-Tampão 1) Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Triton X-100, BSA 1%, EDTA 1 mM;

-Tampão 2) Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Tween 20 0,05%, BSA 1%, EDTA 1 mM;

-Tampão 3) Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Tween 20 0,05%, BSA 2%, Desoxocolato de sódio 0,25%, EDTA 1 mM;

-Tampão 4) Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Tween 20 0,05%, BSA 1%, EDTA 1 mM; sacarose 2%.

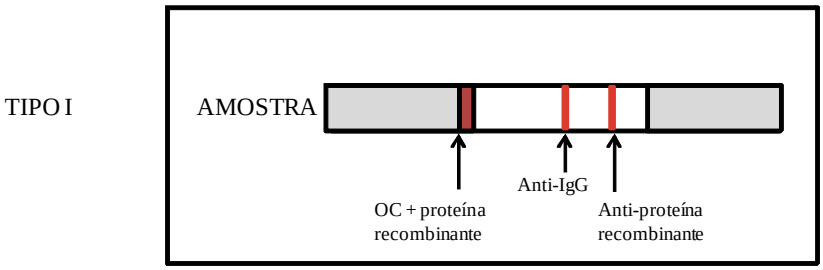
3.8.2 Modelos de testes imunocromatográficos para detecção de anticorpos

Existem diversos modelos de configuração dos testes imunocromatográficos. Definimos como tipos I, II e III para detecção de anticorpos nas amostras de soro. Cada dispositivo tem suas limitações e vantagens. Segue abaixo os modelos:

- modelo tipo I (Figura 3): Este é um modelo de fase única, destinado à detecção de anticorpos. O antígeno, neste caso proteína recombinante, é conjugado ao ouro coloidal liga-se especificamente ao anticorpo presentes na amostra na tira é colocada uma quantidade de anticorpo anti-imunoglobulina ou proteína A capaz de captar os anticorpos presentes na amostra de soro. Na região do controle, são fixados anticorpos contra antígenos (antiproteína recombinante). Por cromatografia, o complexo antígeno-ouro coloidal formado na área do conjugado desloca-se ao longo da membrana para as regiões teste e controle. Nas reações positivas os anticorpos específicos reagem com as partículas conjugadas ao antígeno, originando uma linha vermelha na região teste. O conjugado ao ouro não capturado continua a

migrar até a extremidade da tira, onde é captado na região de controle, gerando uma segunda banda vermelha, indicando a funcionalidade do teste.

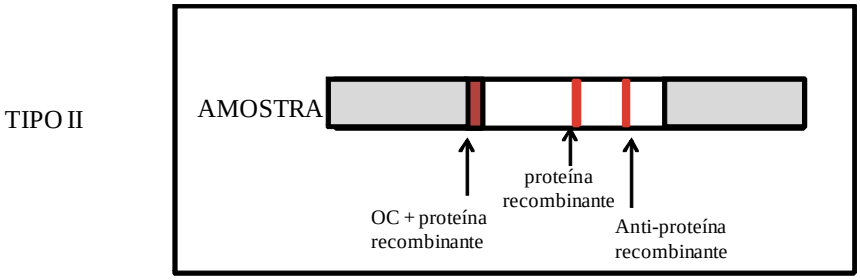
Figura 3 - Teste imunocromatográfico tipo I



Fonte: Gotti (2015)

- modelo tipo II (Figura 4): Destina-se à detecção de anticorpos presentes na amostra de soro que se ligam às partículas de ouro coloidal revestidas com antígenos (proteínas recombinantes). O mesmo antígeno de captura (proteína recombinante) está fixado na linha teste. Logo a seguir, na linha controle esta o anticorpo antiproteína recombinante. Enquanto a amostra flui através da membrana de nitrocelulose, anticorpos específicos contra antígeno ligam-se ao conjugado para formar o imunocomplexo. Este imunocomplexo se liga aos respectivos antígenos de captura na linha teste, emitindo o sinal de coloração com uma linha vermelha na região da linha teste. O excesso de conjugado reage na linha controle, validando o teste.

Figura 4 - Teste imunocromatográfico tipo II

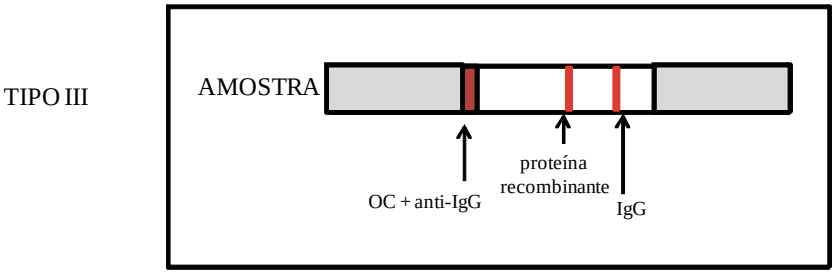


Fonte: Gotti (2015)

- modelo tipo III (Figura 5): Neste modelo, as partículas de ouro são recobertas com um ligante específico para a porção Fc dos anticorpos, como um anticorpo anti-Fc de IgG ou

Proteína A ou G. Para que a reação se efetive, na linha teste estão os antígenos impregnados (proteína recombinante) e na linha controle a imunoglobulina (IgG). Por cromatografia, o complexo anticorpo anti-IgG ou proteína A-ouro coloidal impregnado na área do conjugado desloca-se ao longo da membrana. Na reação positiva os anticorpos específicos reagem com as partículas conjugadas com a proteína A, gerando uma linha vermelha na região teste e uma segunda banda na região controle.

Figura 5 - Teste imunocromatográfico tipo III



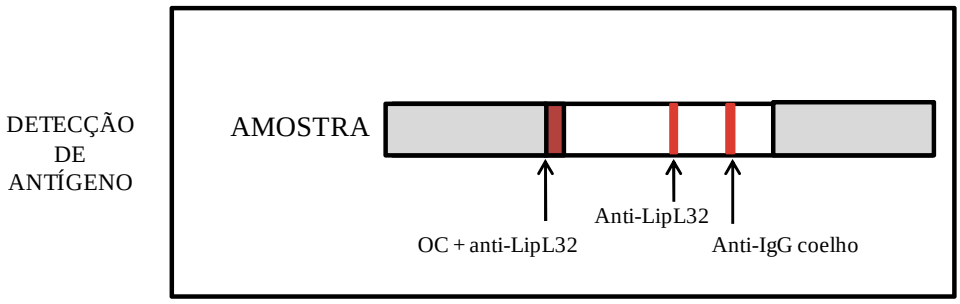
Fonte: Gotti (2015)

3.8.3 Modelo de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno

Um novo modelo de teste imunocromatográfico foi testado para detectar antígeno. Este modelo utiliza um anticorpo fixado na membrana, formando uma ponte com um segundo anticorpo ligado a partícula colorida ou ouro coloidal. Uma restrição a este modelo seria que a leptospira é eliminado de forma intermitente, dependendo da espécie animal em questão, como os bovinos. Porém, em humanos e cão, onde a forma aguda é bastante presente, este formato seria bem aplicado.

Para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico capaz de detectar o antígeno foi utilizado anticorpo anti-LipL32 conjugado ao ouro; o anticorpo anti-LipL32 na linha teste e anti-IgG coelho na linha controle (Figura 6).

Figura 6 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno



Fonte: Gotti (2015)

A conjugação do ouro coloidal com o anticorpo anti-LipL32 foi realizada conforme com o mesmo protocolo descrito para os outros modelos tipo I e III (OLIVER, 2010). Após a conjugação, o teste imunocromatográfico foi realizado para detecção de antígeno. A porção *Sample pad* foi imersa em Tampão *pad* Tween (20 mM de tampão borato de sódio; 0,05% de azida de sódio, 3% pH 7) e secos a temperatura ambiente em dessecador a vácuo *overnight*; no *conjugate pad* (fibra de vidro) foram aplicados na 20 µL da solução do anticorpo anti-LipL32 conjugado ao ouro coloidal. Em seguida, as membranas foram secas dessecador a vácuo *overnight*. No *Nitrocellulose HiFlow Plus*, foi utilizada a membrana que usualmente utilizamos para todos os modelos descritos até o momento a *HF 240*, 1,5 µL do anticorpo anti-LipL32 (2 mg/ml) foram aplicados na linha teste; 1,5 µL do anticorpo anti-IgG de coelho (2 mg/ml) foram aplicados na linha controle. O *absorbing pad* não necessita de tratamento. Para montagem do teste, os papéis previamente tratados foram sobrepostos.

Para testar o modelo de detecção do antígeno, foram utilizadas amostras de urina humana infectadas experimentalmente. Para tanto, uma cultura de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola cultivada em meio EMJH com BSA foi centrifugada por 30 minutos, a temperatura de 20ºC, a 6500rpm, o sedimento obtido foi lavado com PBS uma vez. Posteriormente, o sedimento celular lavado foi ressuspendido em 1 mL de urina humana para uma concentração final de $1x10^9$ células/mL. Uma diluição seriada da amostra de urina infectada foi realizada, variando-se a concentração de 10^8 até 10^1 células /mL. Estas amostras foram testadas no método desenvolvido.

3.8.4 Uso de microesferas como conjugado para desenvolvimento do teste imuncromatográfico

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste imunocromatográfico do modelo tipo I foi realizado a conjugação da proteína recombinante LipL32 com microesferas Estapor ® K-030 Azul (MERCK). Para isso, as microesferas foram diluídas para concentração final de 1% em Tampão PBS pH 7,45 (fosfato de potássio 10 mM; fosfato de sódio monobásico 2 mM; cloreto de sódio 150 mM). A proteína foi adicionada em três diluições diferentes testadas (0,2; 04 e 0,8 mg/ml) e a reação incubada, sob agitação, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a incubação da suspensão durante a noite, a 4° C com agitação constante. A seguir, a solução foi centrifugada a 9400 g por 15 minutos. O sedimento foi ressuspendido em tampão de bloqueio (PBS, 1% BSA e 0,05% azida de sódio) e incubado por 1 hora em agitação. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada novamente e ressuspendida em tampão de estoque (fosfato 10 mM pH 7,5, NaCl 25 mM, 1% BSA, 0,1% Tween 20, 0,05% Triton X-100, 0,1% NaN_3). Durante as lavagens, a amostra foi agitada vigorosamente para desfazer os grumos formados (BANG, 2008).

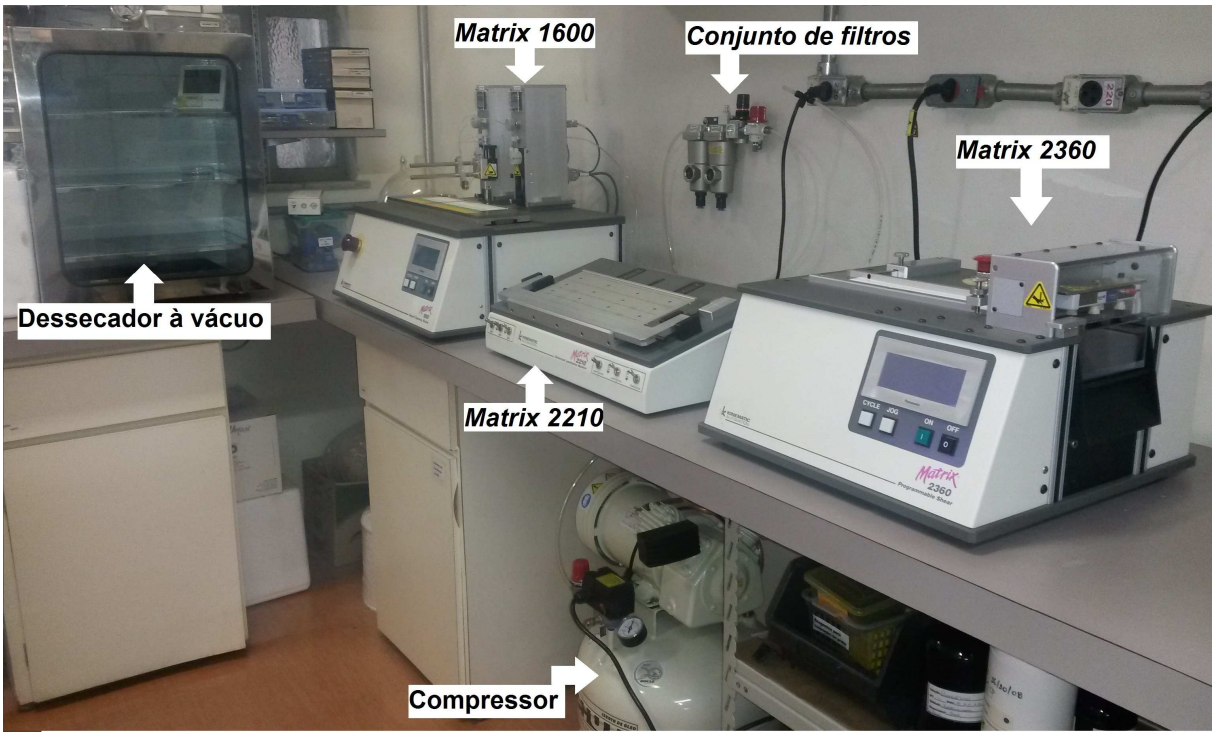
O modelo tipo I foi utilizado na avaliação das microesferas conjugadas com a LipL32, utilizando soro de coelho hiperimune. Após a conjugação foi realizado o tratamento dos papeis. O papel *Sample pad* foi imerso em dessecador a vácuo *overnight;* no *conjugate pad* (fibra de vidro) foram aplicados na membrana 20 µL da solução da proteína recombinante LipL32 conjugada a microesfera. Após a aplicação, as membranas foram secas em dessecador a vácuo em temperatura ambiente por *over nigh*. No *Nitrocellulose HiFlow Plus* (HF 240), 1,5 µL de anticorpo anti-IgG coelho (2mg/ml) foram diluídos em PBS 0,01 M pH 7,2 na linha teste e 1,5 µL do anticorpo anti-LipL32 (2mg/ml) foram aplicados na linha controle. O *absorbing pad* não necessita de tratamento.

3.8.5 Aplicação e validação do teste em amostras clínicas em plataforma diagnóstica

Após escolha e padronização dos testes imunocromatográficos, foi realizado o teste em amostras clínicas de diversas espécies animais (bovinos, eqüinos, cão, coelho, hamster e suíno), em plataforma diagnóstica como mostra figura 7.

Os testes que foram aplicados nas máquinas foram o teste imunocromatográfico tipo I (conjugado: ouro coloidal com proteína LipL32; linha teste anti-IgG bovino feito em coelho dialisado em tampão fosfato 10mmM com 5 % sacarose ; linha controle: anti-LipL32) e o teste imunocromatográfico tipo III (conjugado: ouro coloidal com proteína A; linha teste proteína LipL32 dialisada em tampão fosfato 10mmM com 5 % sacarose ; linha controle: anti-IgG coelho).

Figura 7 – Plataforma diagnóstica



Fonte: Gotti (2015)

O preparo dos conjugados foram realizados como descrito anteriormente, seguida da secagem dos papéis em dessecadora vácuo (*Solab*) como descrito na padronização dos testes.

Foram aplicados os reagentes na linha teste e na linha controle de acordo com cada teste, através da máquina Matrix 1600 (Kinematic) *Matrix 1600 Reagent Dispensing Module* (Kinematic Automation, Inc.). Para isso antes de ligar a máquina se faz necessário a limpeza das seringas aplicadoras com álcool isopropílico e posterior lavagem com água destilada. Após a limpeza, as seringas são acopladas na peça de distribuição de reagente e o suprimento de ar (compressor *Schulz, modelo MSV6*) é ligado, a válvula do compressor é aberta até armazenar ar comprimido e o desligamento ocorre automaticamente.

Posteriormente, deve-se abrir lentamente a válvula do compressor e ajustar para que a pressão do aparelho fique entre 70 e 80 psi e preencher os recipientes de armazenamento (Linha teste e linha controle) com os respectivos reagentes com mínimo de 1mL, encaixá-los ao lado das bombas e introduzi-los os respectivos tubos. Em seguida, é necessário, inicializar a bomba e aplicação dos reagentes. Após aplicação, a limpeza do aparelho água destilada deve ser realizada cuidadosamente, posteriormente deixar por 10 minutos com NaOH 0,1M, lavar novamente com água destilada aproximadamente 10 ml, enxaguar com etanol 30% deixando agir por 10 minutos, com posterior lavagem com 10 ml de água destilada. Após aplicação, o papel de nitroceluose foi seco em dessecador a vácuo *overnight.* Em seguida foi realizada a montagem dos papeis no aparelho a vácuo *Matrix 2210 Universal Laminator Module* (Kinematic Automation, Inc.), onde é colocado primeiramente a fibra de vidro (já previamente seca com o conjugado), após os papéis *sample pad* tratado e *absorbing pad*. Posteriormente, foi realizado o corte das fitas pela máquina *Matrix 2360 Programmable Shear* (Kinematic Automation, Inc.), nesta operação, uma membrana inteira de 30 cm rende em média 60 fitas.

Para aplicação do teste, as amostras clínicas foram diluídas em tampão de amostra, Tampão 1) Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Triton X-100, BSA 1%, EDTA 1 mM; em uma diluição 1:10 em 100 µl de soro. Estes soros foram aplicados em placa de ELISA, devido ao grande número de amostras e as fitas foram emersas durante 20 minutos, com posterior leitura.

3.9 PRODUÇÃO DO OURO COLOIDAL

Além do ouro comercial utilizado para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico (*BBI solution* 20nm), foi utilizado um ouro coloidal produzido *in house* para controle de possíveis contaminações. O protocolo para a preparação da solução de ouro coloidal foi realizado de acordo com o método descrito por Cvak (2012). Para tanto, 2,5 ml de cloreto de ouro III (2 mg/ml em água) foi aquecido até ocorrer à ebulição. Posteriormente, 2,5 ml de citrato de sódio 25 mM foram adicionados à solução de ouro com agitação. Logo após atingir uma coloração vermelho escuro, a suspensão foi armazenada a 4° C até o momento do uso e conservada com azida sódica 0,02%. Posteriormente, para a determinação qualitativa do

tamanho das partículas de ouro, foi realizada a leitura da absorbância UV/VIS entre os comprimentos de 400-700 nm.

Em seguida, as partículas de ouro obtidas foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão, onde as partículas de diferentes tamanhos foram visualizadas como pontos elétron-densos negros, sendo possível avaliar o tamanho, forma e homogeneidade das mesmas. Posteriormente, uma fina camada da suspensão de ouro (10ul) coloidal foi adicionada a um pedaço de parafilme e uma tela de cobre revestido com carbono foi colocada sobre a amostra. Após 2 minutos de incubação, a tela de cobre foi seca cuidadosamente utilizando papel de filtro, a secagem completa foi realizada durante a noite. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 E da Zeiss; modelo programa de captura de imagem – ITEM, Olympus soft imaging solutions GmbH, version ITEM E 23082007; Câmera mega viem III.

3.9.1 Conjugação do ouro coloidal produzido *in house* com a proteína recombinante LipL32

O protocolo de conjugação do ouro coloidal com a proteína recombinante (antígeno) foi realizado de acordo com o método descrito por Oliver (2010). Para isso, 1 mg do antígeno foi ressuspendido em tampão borato 0,2 M (borato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 7,0) e a solução foi dialisada contra tampão borato 2 mM (borato de sódio 2 mM, NaCl 1,5 mM, pH 7,0) a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, a quantidade ótima de antígeno, necessária para estabilizar o ouro coloidal foi determinada, utilizando-se 100 µl de ouro coloidal a 0,01% produzido *in house* e 10 µl de diluições seriadas do antígeno em tampão borato 2 mM. A quantidade de antígeno satisfatória para estabilizar o ouro foi à observada na diluição em que a solução não sofreu alteração de cor.

Em seguida, a conjugação foi realizada adicionando-se 10 ml da solução de ouro coloidal a 0,01% à quantidade de antígeno determinada na etapa anterior, mantendo-se em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi estabilizada com 1% de BSA em agitação por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4º C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 2 ml de 2% BSA (2% de BSA em 0,01M de tampão borato) e centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4º C. Esta etapa foi repetida mais uma vez para a completa

eliminação das proteínas livres. Por fim, o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de tampão de armazenamento (3% de BSA, 3% de sacarose, 0,01 M de borato de sódio e 0,05% de azida de sódio) e armazenado a 4º C até o momento do uso.

3.9.2 Teste Imunocromatográfico tipo I com soro de coelho hiperimune utilizando o conjugado com ouro coloidal *in house.*

Após a produção do ouro coloidal e sua conjugação com a proteína recombinante LipL32, foi realizado teste imunocromatográfico modelo tipo I com soro de coelho hiperimune para avaliar a conjugação realizada em questão.

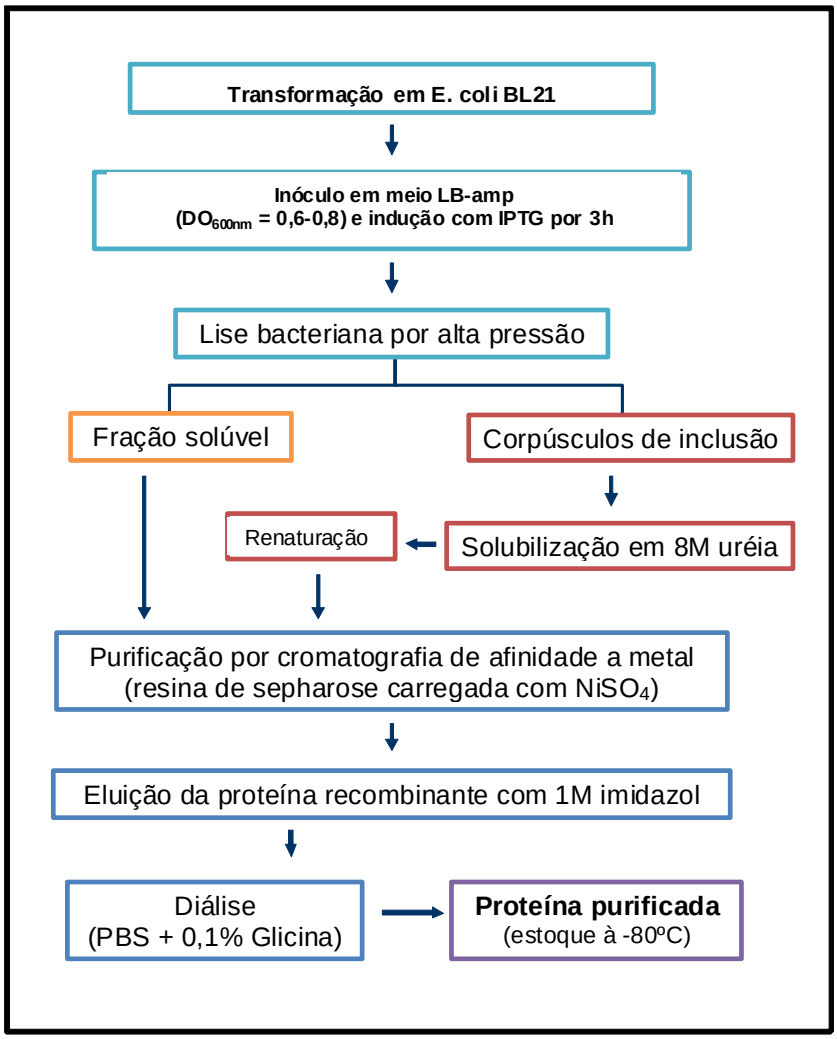
Posteriormente, a solução da proteína recombinante conjugada ao ouro foi aplicada na fibra de vidro (*conjugate pad*) e esta foi mantida em dessecador a vácuo a temperatura ambiente *overnight* para secagem. Foi realizado o bloqueio na porção *Sample pad,* utilizando o Tampão *pad* com Tween (20mM Borato de sódio; 0,05% de azida de sódio e 3% Tween 20) e a secagem foi realizada em dessecador a vácuo a temperatura ambiente *overnight*. No papel de *Nitrocellulose HiFlow Plus* foi aplicada 1,5 μL de anticorpo anti-IgG coelho (2mg/ml) diluídos em PBS 0,01 M pH 7,2 foram aplicados na linha teste 1,5 μL do anticorpo anti-LipL32 (2mg/ml) foram aplicados na linha controle. Em seguida, as membranas foram secas em dessecador a vácuo a temperatura ambiente *overnight*. O *absorbing pad* não necessita de tratamento. Para montagem do teste, os papéis previamente tratados foram sobrepostos.

4 RESULTADOS

4.1 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A primeira etapa deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo de purificação adequado para cada proteína recombinante. A figura 8 mostra o fluxograma geral dos processos de purificação utilizados.

Figura 8 - Fluxograma do processo de expressão e purificação de proteínas recombinantes



Fonte: Gotti (2015)

Para expressar as proteínas recombinantes, as estirpes *E. coli* BL21 competentes foram transformadas com os plasmídeos pAE-LIC10009 (Lp25), pAE-LIC10301 (Lp11), pAE-LIC10507 (Lp21), pAE-LIC10704 (Lp22), pAE-LIC11030 (Lp35), pAE-LIC11087 (Lsa30), pAE-10464N (LigBN), pAE-10464C (LigBC), pAE-10465 (LigAC) e pDEST-LIC11352 (LipL32). Colônias isoladas, obtidas destas transformações, foram inoculadas em meio líquido LB-amp, a cultura foi mantida a 37 °C sob agitação até DO 600nm = 0,6. Neste momento, adicionou-se 1mM de IPTG, mantendo-se a incubação por mais 3 horas. Após a indução, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento foi utilizado para purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas recombinantes Lp25, Lp21, Lp22 e LipL32 foram purificadas a partir da fração solúvel adsorvida à resina de afinidade a metal. Proteínas contaminantes foram eliminadas pela passagem de solução de lavagem contendo concentrações crescentes de imidazol (20 mM a 60 mM). Após a eluição com 1M imidazol, as proteínas purificadas foram dialisadas contra tampão PBS e 0,1% glicina.

As proteínas recombinantes Lp11, Lsa30, Lp35, LcpA, LigBN, LigBC e LigAC foram purificadas a partir da fração insolúvel. O sedimento de corpúsculos de inclusão foi ressuspendido em tampão de solubilização contendo 8 M uréia, como agente desnaturante e posteriormente, o solubilizado foi diluído 100 vezes lentamente em tampão de renaturação, com o objetivo de diminuir a quantidade de uréia (de 8 M até zero) e recuperar a conformação estrutural da proteína. Esta solução foi adsorvida à coluna de afinidade a metal para eliminação das proteínas contaminantes. Na eluição das proteínas recombinantes e na diálise foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para as proteínas solúveis.

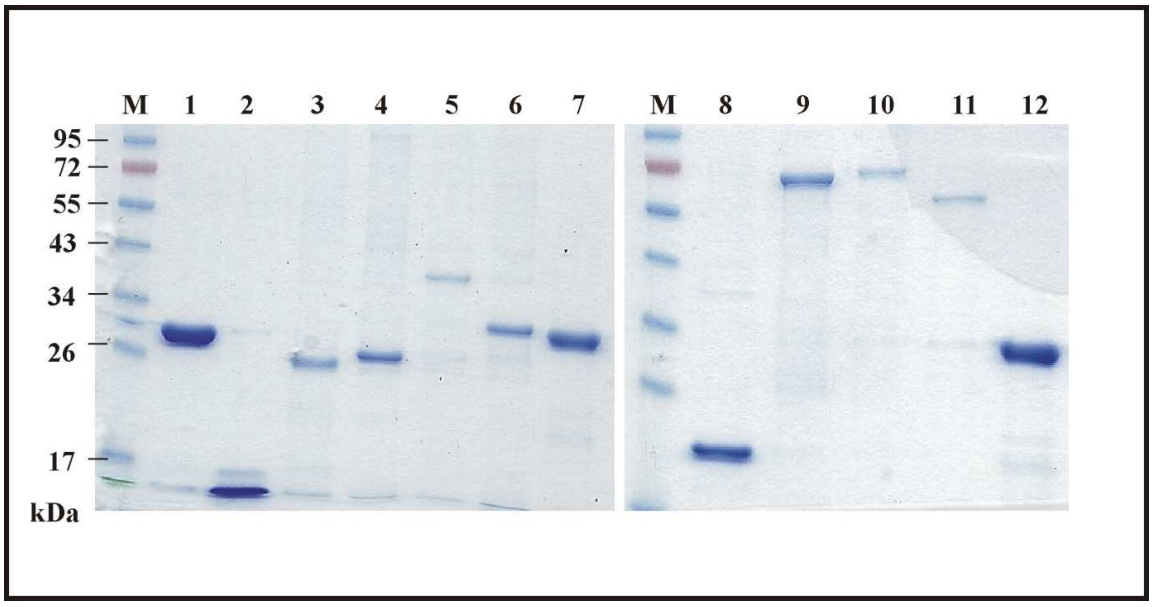
A figura 9 mostra o resultado da purificação das proteínas recombinantes após a diálise. É possível verificar que a maioria das proteínas contaminantes foi eliminada com o processo de purificação e todas as proteínas recombinantes são bandas majoritárias.

O ponto isoelétrico e a massa molecular de cada proteína foram calculados a partir da composição de aminoácidos, utilizando a ferramenta Swiss-prot disponível em servidor público (http://expasy.ch/). A massa molecular, o pI, a fração utilizada na purificação e a estimativa do rendimento da purificação para cada proteína recombinante estão descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Dados da purificação das proteínas recombinantes

Nomenclatura do Genoma[a]	*Nomenclatura da proteína recombinante*	*Massa Molecular da proteína recombinante (kDa)*	*pI* [b]	*Fração utilizada na purificação*	*Rendimento (mg/L)*
LIC10009	Lp25	26,59	6,12	Solúvel	29
LIC10301	Lp11	12,97	6,30	Insolúvel	18
LIC10507	Lp21	22,66	5,53	Solúvel	17
LIC10704	Lp22	23,54	5,43	Solúvel	5,5
LIC11030	Lp35	36,82	6,17	Insolúvel	7,5
LIC11087	Lp30	31,83	5,65	Insolúvel	10
LIC11947	LcpA	20,77	6,60	Insolúvel	15
LIC10465	LigAC	63,42	7,82	Insolúvel	28
LIC10464	LigBN	64,24	5,71	Insolúvel	10
LIC10464	LigBC	55,61	9,30	Insolúvel	10
LIC11352	LipL32	30,74	5,89	Solúvel	32

Figura 9 - Análise da purificação das proteínas recombinantes. Gel SDS-PAGE (15%) corado com Coomassie Brilliant Blue



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: M – Padrão de peso molecular (pageRuler) pré-corado; Proteínas: 1- Lp25; 2- Lp11; 3-Lp21; 4-Lp22; 5-Lp35; 6-Lsa30; 7- LipL32; 8- LcpA; 9-LigAC; 10-LigBN; 11-LigBC e 12-LipL32.

4.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE SOROS DE ANIMAIS REAGENTES E NÃO REAGENTES PARA LEPTOSPIROSE ATRAVÉS DA SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)

A seleção das amostras de soros de animais não reagentes (negativos) e reagentes (positivos) foi realizada através do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) como método diagnóstico padrão ouro. Para tanto, culturas de 24 variantes sorológicas foram usadas como antígenos, como mostra o quadro 4.

Quadro 4 - Coleção de antígenos de leptospiras de referência utilizadas na SAM

Sorogrupo	Sorovar	Estirpe	Instituição de origem*
Australis	Australis	Balico	1
Australis	Bratislava	Jez Bratislava	2
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	1
Autumnalis	Butembo	Butembo	1
Ballum	Castellonis	Castellon 3	1
Bataviae	Bataviae	Swart	1
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	1
Celledoni	Whitcombi	Whitcombi	1
Cynopteri	Cynopteri	3522 C	1
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	1
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	1
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20	
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	1
Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46	1
Panama	Panama	CZ 214 K	1
Pomona	Pomona	Pomona	1
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	1
Serjoe	Hardjo	Hardjoprajitno	2
Serjoe	Wolffi	3705	2
Serjoe	Hardjo	Hardjobovis	2
Shermani	Shermani	1342 K	1
Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	1
Seramanga	Patoc	Patoc 1	1
Djasiman	Sentot	Sentot	1

Legenda: Notas: * 1 CDC – EUA / Prof. Dr. Paulo Hideki Yasuda
2 BgVV – Berlim – Alemanha (Arno – Schonberg).

Os soros dos animais foram titulados em uma série de diluições geométricas de razão dois, sendo a diluição inicial 1/50. O título foi considerado a maior diluição que apresentou 50% de leptospiras aglutinadas (FAINE et al., 1999). A placa foi levemente agitada e incubada a 28 °C por 1 hora e em seguida foi realizada a leitura em microscópio de campo escuro (Carl Zeiss7).

Para esta primeira fase do estudo, 200 amostras de soros de animais da espécie bovina (100 reagentes e 100 não-reagentes no SAM) foram selecionadas utilizando dois critérios; o título 1/800 para as soros reagentes e o animal não ter sido vacinado. Nos anexos A e B, estão apresentadas as amostras reagentes selecionadas com os sorovares mais comuns identificados.

O primeiro critério foi utilizado porque as amostras de soros provenientes do Laboratório de Zoonose Bacteriana da Faculdade de Medicina Veterinária da USP são amostras únicas (não pareadas). Para a confirmação do diagnóstico da leptospirose utilizando o SAM recomenda-se comparar duas amostras de soro, a primeira coletada na fase aguda da doença e a segunda, duas ou três semanas após. Isto acontece porque, geralmente, os anticorpos começam a surgir na primeira semana da doença e alcançam níveis máximos em torno da terceira e quarta semanas. O aumento no título de anticorpos de quatro ou mais vezes da primeira para segunda amostra confirma o diagnóstico da infecção aguda. Se houver um resultado não reagente na primeira amostra e um resultado reagente com título maior ou igual a 200 na segunda amostra, tem-se o que se conhece como soroconversão, o que também confirma o caso.

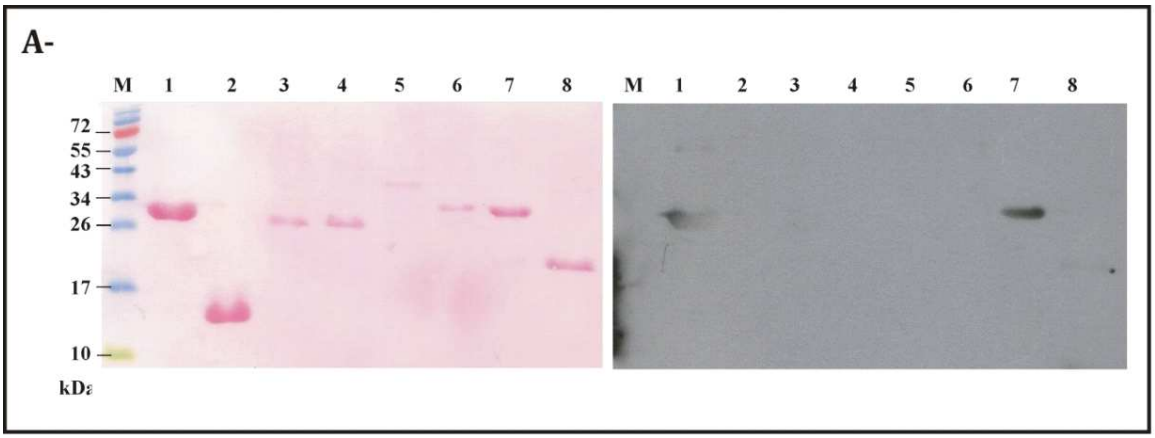
A leptospirose humana é uma doença de notificação compulsória no Brasil, por esta razão, a coleta de amostras de soro pareadas nas fases aguda e convalescente de casos suspeitos é, normalmente, realizada na rotina. Entretanto, este procedimento nem sempre é seguido para os animais domésticos, como bovinos, suínos, caprinos, ovinos, equinos e os caninos. Para contornar esta dificuldade, o título igual ou maior que 800 foi adotado na seleção das amostras de soros reagentes para este estudo. Este título mínimo também é usado quando se conta apenas com uma amostra sanguínea com teste de microaglutinação reagente, para a confirmação do caso suspeito em humanos.

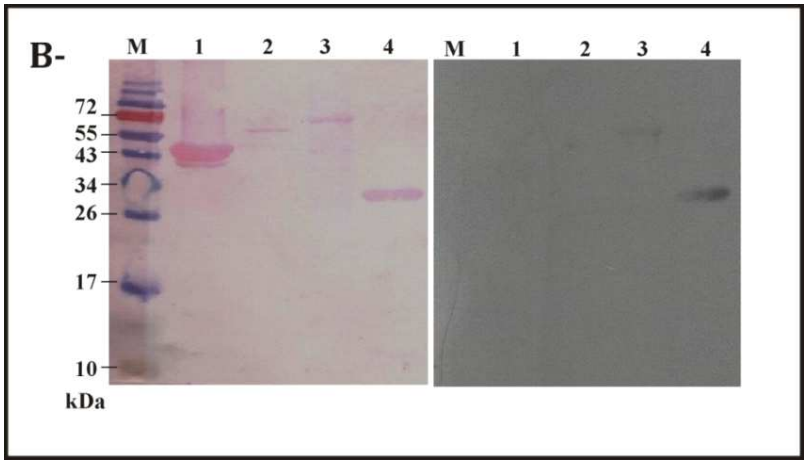
4.3 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM AMOSTRAS DE SOROS POR *WESTERN-BLOTTING*

A avaliação da utilização das proteínas recombinantes purificadas na detecção de anticorpos específicos em *pool* de amostras de soros de animais reagentes e não-reagentes para a leptospirose foi realizada por *Western-blotting*. Para tanto as proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema úmido. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S e digitalizadas para monitorização da transferência. A reação com os *pools* de soros foi realizada com uma diluição de 1/100 por uma hora, seguido de incubação com o segundo anticorpo (IgG anti-bovino - KPL) conjugado com peroxidase (diluição 1/5.000), por uma hora. A detecção foi realizada através da utilização de “kit” ECL (GE Healthcare). As membranas foram expostas a filmes (Hyperfilm ECL) por tempos curtos e o filme revelado.

A figura 10 (A e B) mostra que somente a proteína LipL32 apresentou reatividade com *pool* dos soros positivos para a leptospirose (poços 7A e 4B). Este *pool* de soros não reconheceu as bandas correspondentes às outras proteínas recombinantes (Poços 1 a 6; poço 8 – figura 10 A e poços de 1 a 3- figura 10 B). Além disso, os soros negativos não apresentaram reatividade com nenhuma proteína recombinante (Figura 11). Estes resultados demonstram a especificidade do reconhecimento da proteína recombinante LipL32 pelos soros dos animais positivos.

Figura 10 - *Western blotting* das proteínas recombinantes purificadas, utilizando pool de soros reagentes para leptospirose

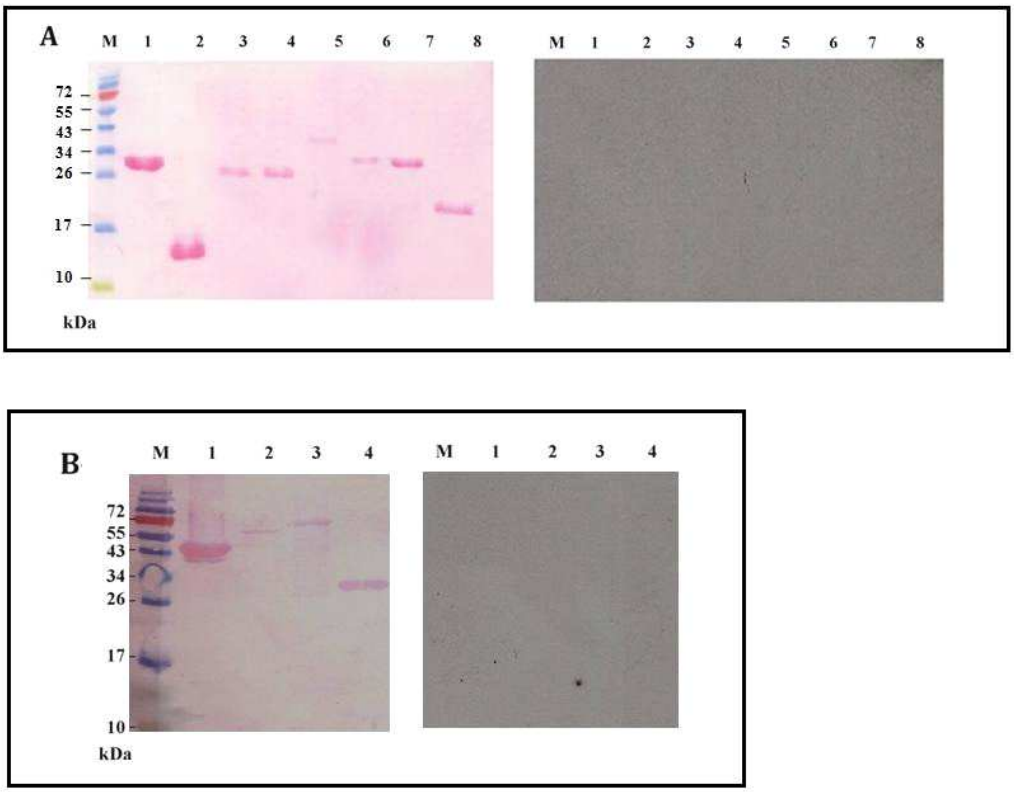




Fonte: Gotti (2015)

Legenda: No lado esquerdo das figuras **A** e **B** estão as membranas de nitrocelulose coradas com Ponceau. No lado direito estão os filmes (detecção por ECL). M – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteínas: Em A: 1- Lp25; 2- Lp11; 3-Lp21; 4-Lp22; 5-Lp35; 6-Lp30; 7- LipL32; 8- LcpA. Em B: 1-LigAC; 2-LigBN; 3-LigBC e 4-LipL32; Soro teste: *pool* de soros bovinos reagentes.

Figura 11 - *Western blotting* das proteínas recombinantes purificadas, utilizando pool de soros não reagentes para leptospirose

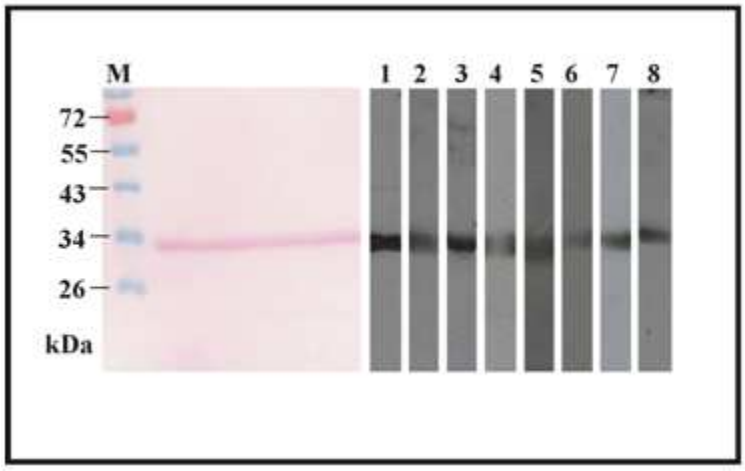


Fonte: Gotti (2015)

Legenda: No lado esquerdo das figuras **A** e **B** estão as membranas de nitrocelulose coradas com Ponceau. No lado direito estão os filmes (detecção por ECL). M – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteínas: Em A: 1- Lp25; 2- Lp11; 3-Lp21; 4-Lp22; 5-Lp35; 6-Lp30; 7- LipL32; 8- LcpA. Em B: 1-LigAC; 2-LigBN; 3-LigBC e 4-LipL32; Soro teste: *pool* de soros bovinos não reagentes.

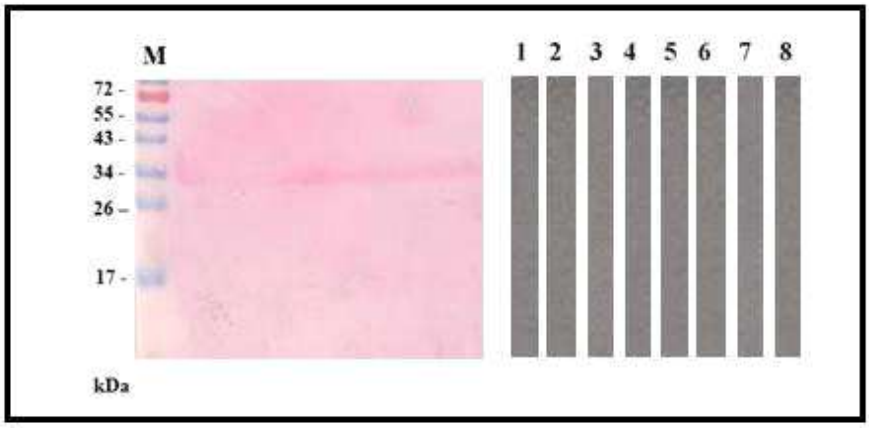
Posteriormente, foi avaliada a reatividade da proteína LipL32 com soros de amostras individuais, utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente. Na figura 12, são mostrados alguns exemplos representativos dos resultados obtidos com os soros com diferentes títulos no SAM. É possível, observar que a reatividade com a LipL32 não depende do título da SAM. Além disso, os soros negativos não apresentaram reatividade com proteína LipL32 (Figura 13).

Figura 12 - *Western blotting* da proteína recombinante LipL32 purificada, utilizando amostras de soros individuais reagentes para leptospirose



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau. **E** Filmes (detecção por ECL). M – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteína LipL32. 1 a 8: Soros reagentes para leptospirose de amostras individuais com diferentes títulos no SAM.

Figura 13 - *Western blotting* da proteína recombinante LipL32 purificada, utilizando amostras de soros individuais não reagentes para leptospirose



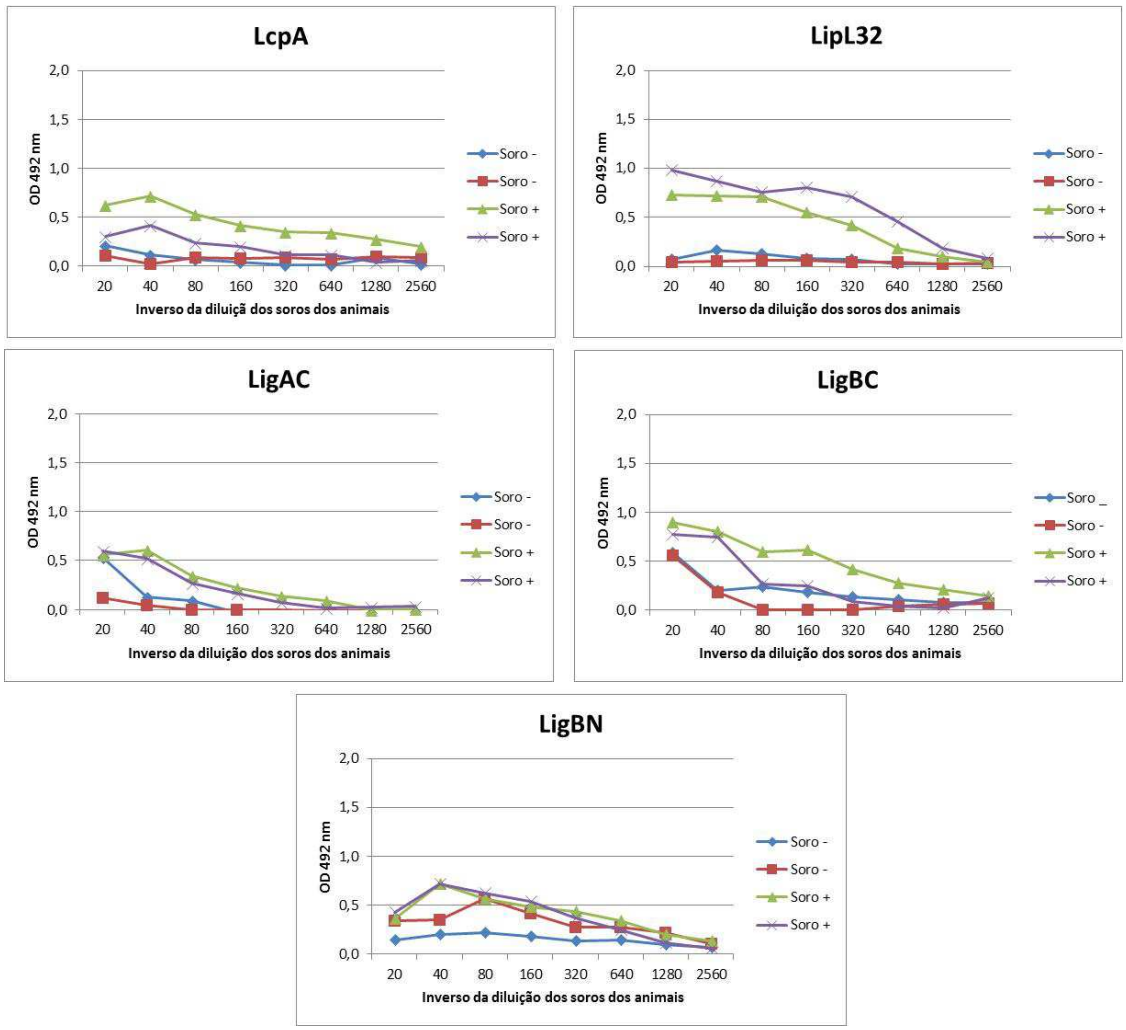
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau. **E** Filmes (detecção por ECL). M – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteína LipL32. 1 a 8: Soros não reagentes para leptospirose de amostras individuais com diferentes títulos no SAM.

4.4 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO *WESTERN BLOTTING* ATRAVÉS DO ELISA

As análises realizadas por *Western blotting* foram confirmadas por ELISA, utilizando soros não reagentes e reagentes de amostras individuais. Para tanto, 5 µg/mL de cada proteína recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9,6 foram adsorvidos em placas de 96 poços. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20, por 1 hora, a 37 °C. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas dos soros dos animais em tampão de diluição (1% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,01% Tween-20). A placa foi incubada, por 1 hora, a 37 °C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS-T e a reação com o segundo anticorpo anti-bovino (KPL) conjugado com peroxidase diluído 1:5000 em tampão de diluição, foi realizada, por 1 hora, a 37 °C, seguido de lavagens como descrito anteriormente. O reconhecimento foi realizado através de reação, com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato na presença de traços de H_2O_2, por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2N de H_2SO_4. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da DO em 492 nm.

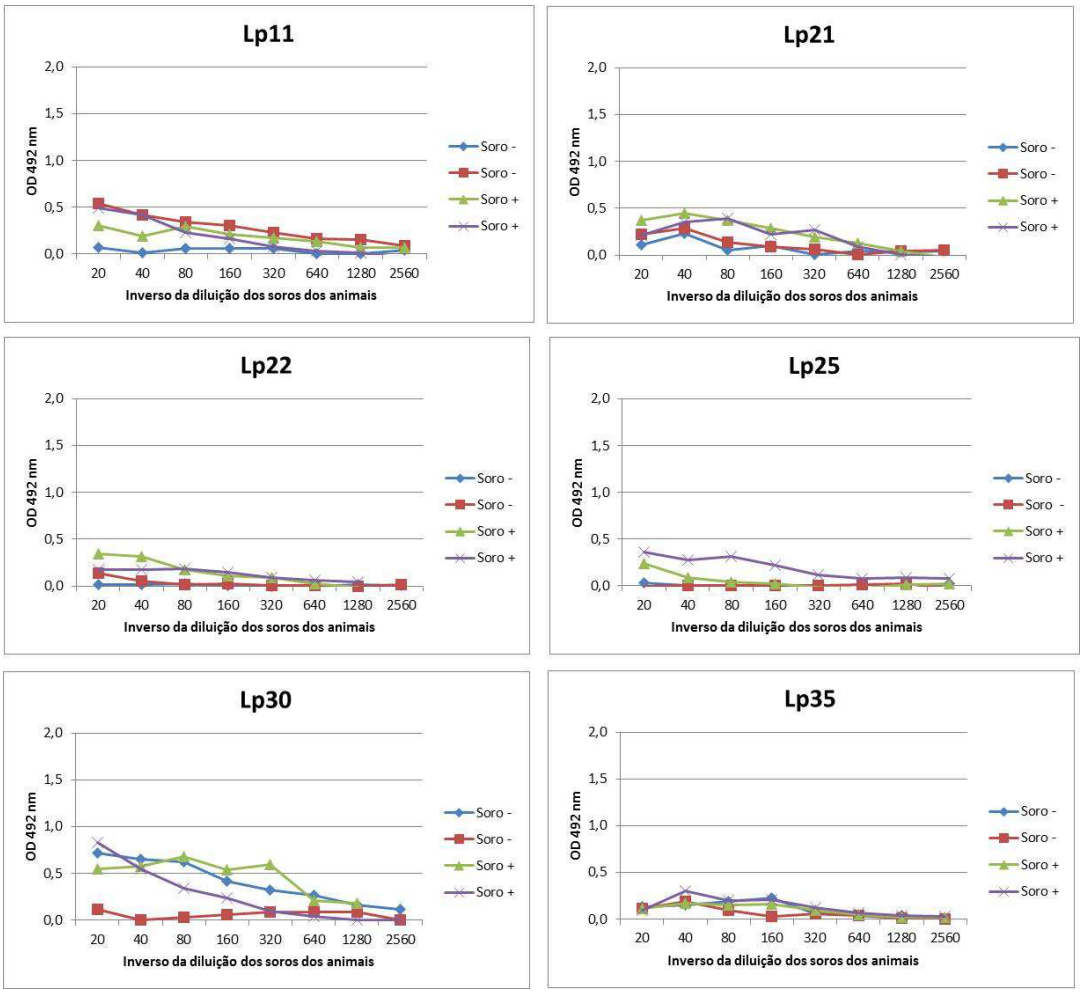
As figuras 14 e 15 mostram que as curvas de titulação de IgG total dos soros dos animais negativos são próximas à zero. Também, é possível observar a ocorrência de reconhecimento inespecífico destes soros com algumas proteínas recombinantes nas diluições iniciais, provavelmente devido à presença de proteínas bacterianas contaminantes decorrentes do processo de purificação, pois não foi realizada a adsorção dos soros com lisados bacterianos. O gráfico da proteína LipL32 (Figuras 12 e 13) apresenta as curvas de titulação dos soros positivos com altos títulos de anticorpos. As curvas de titulação dos soros negativos para esta proteína são próximas à zero, confirmando os resultados obtidos pelo *Western blotting* (figura 8) e a especificidade da reação.

Figura 14 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros reagentes (+) e não reagentes (-) de amostras individuais



Fonte: Gotti (2015)

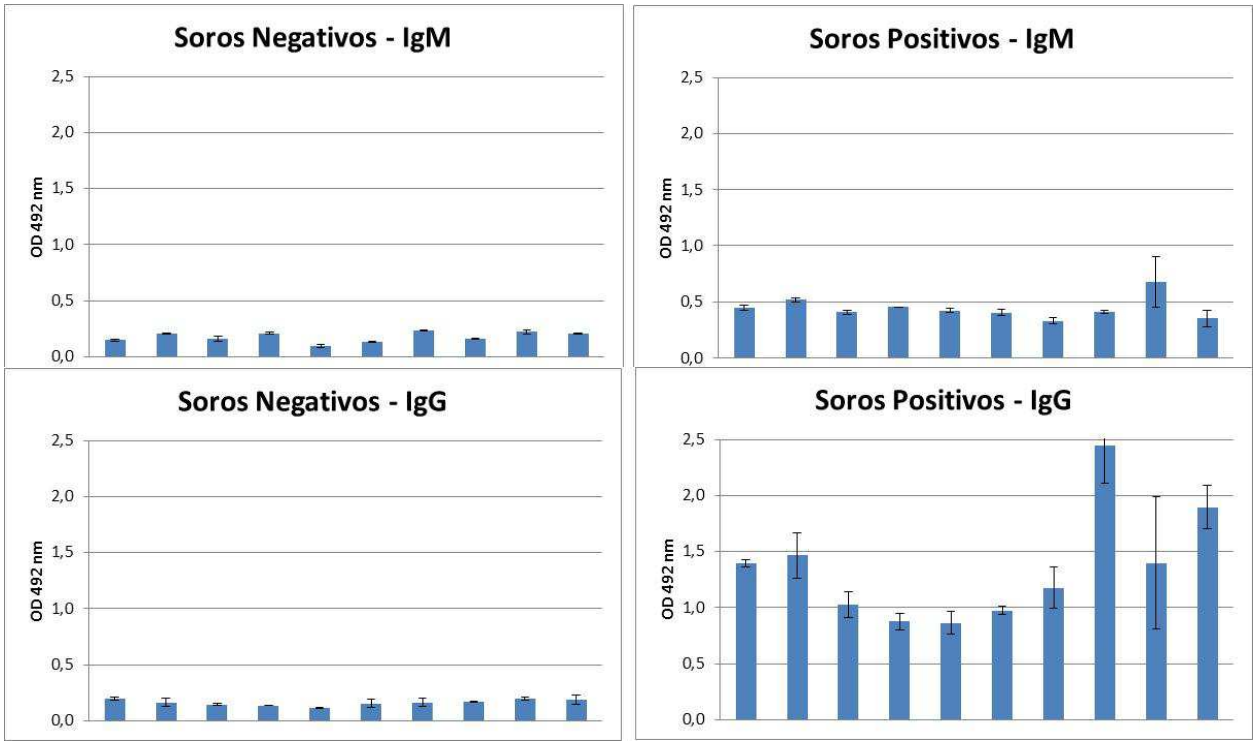
Figura 15 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros reagentes (+) e não reagentes (-) de amostras individuais



Fonte: Gotti (2015)

Posteriormente, para a determinação de anticorpos IgM ou IgG, os soros foram diluídos 1:50 em tampão 1% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,01% Tween-20 e a reação com o segundo anticorpos conjugado com peroxidase foi realizada na diluição de 1:5000 em placas adsorvidas com a proteína LipL32. Todos os soros (dez amostras positivas e dez amostras negativas) foram analisados em triplicatas. Na figura 16, é possível verificar uma maior reatividade para anticorpos IgG do que IgM em amostras reagentes. Por esta razão, o anticorpo secundário IgG foi utilizado no desenvolvimento do teste imunocromatográfico.

Figura 16 - ELISA utilizando soros reagentes e não reagentes de amostras individuais. Os gráficos foram construídos a partir da média das absorbâncias das triplicatas com os respectivos desvios-padrão



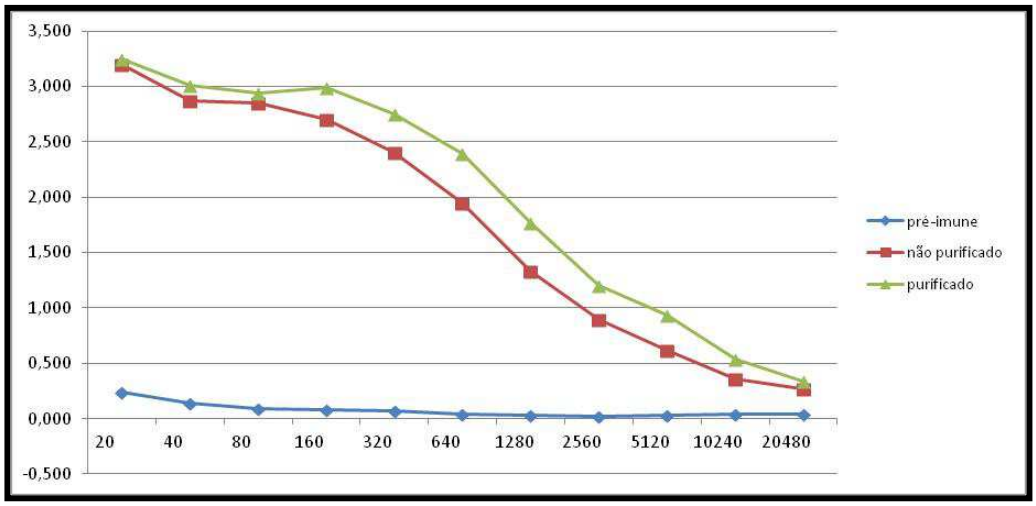
Fonte: Gotti (2015)

Em conjunto, os resultados obtidos por *Western blotting* e ELISA indicam que a LipL32 é a proteína mais adequada para desenvolvimento do teste rápido baseado em ensaio imunocromatográfico do tipo *dipstick*, como método diagnóstico da leptospirose animal.

4.5 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL CONTRA LipL32

Para a produção do soro hiperimune contra a proteína recombinante LipL32, um coelho foi imunizado com a proteína recombinante purificada, com dois reforços em intervalo de 15 dias. O animal foi sangrado após a última imunização. O soro obtido foi purificado por precipitação com ácido caprílico. A titulação do soro obtido foi feita por ELISA, como mostra a figura 17. É possível observar que a curva de titulação de IgG total do soro negativo é próxima a zero. As curvas de titulação dos soros anti-LipL32 antes e depois da purificação apresentaram altos títulos de anticorpos, demonstrando que o uso do ácido caprílico não alterou o perfil no ELISA.

Figura 17 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soro de coelhos pré-imune, antes e depois da precipitação com ácido caprílico

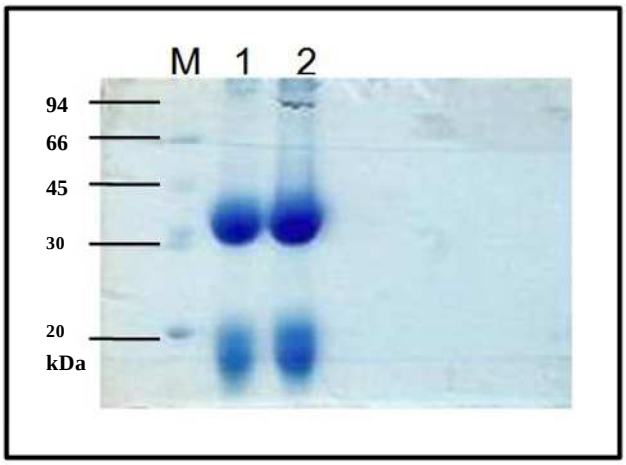


Fonte: Gotti (2015)

4.6 PRODUÇÃO DO SORO DE COELHO ANTI-IgG BOVINO

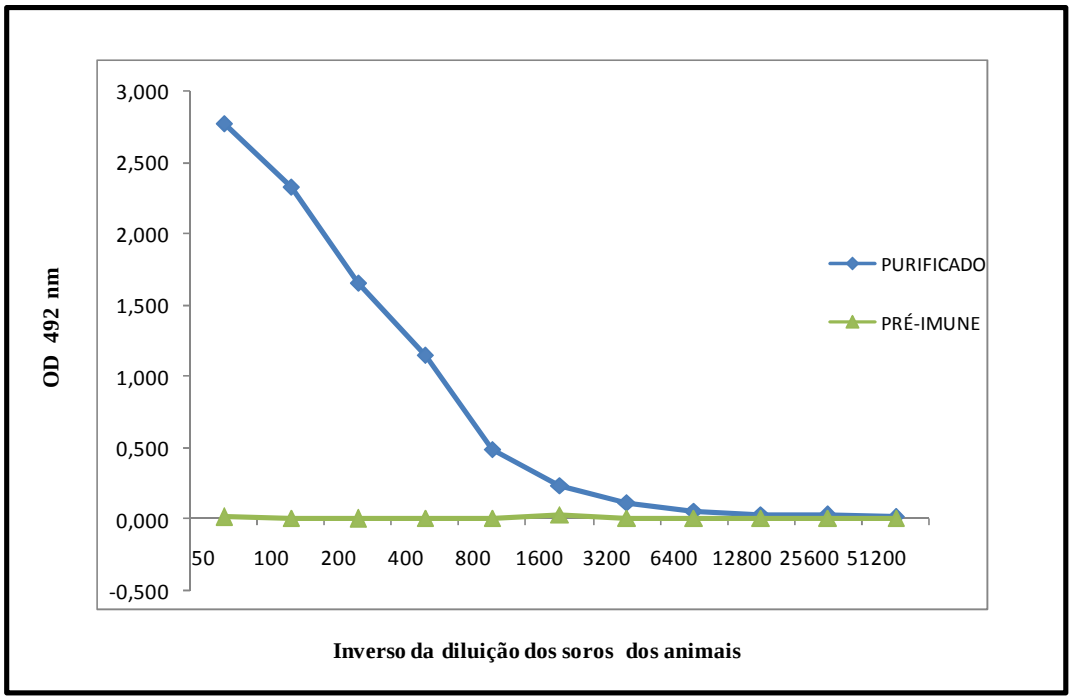
Para a obtenção do soro anti IgG Bovino, um coelho foi imunizado com a imunoglobulina IgG comercial, o soro de coelho obtido foi purificado em coluna de afinidade *HiTrap Protein G HP* (GE Healthcare). Para verificar o grau de pureza dos anticorpos, foi realizado um gel SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*, como mostra a figura 18. É possível observar a presença das duas bandas correspondentes à cadeia leve e pesada das imunoglobulinas e a ausência de proteínas contaminantes do soro, demonstrando que a purificação foi eficiente. A titulação do soro foi feita por ELISA, como mostra a figura 19. A curva de titulação de do soro pré-imune, utilizado como controle negativo, é próxima a zero. Enquanto, a curva de titulação do soro purificado apresenta alto título de anticorpos anti-IgG bovino.

Figura 18 - Análise da purificação do anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho. Gel SDS-PAGE (12%) corado com *Coomassie Brilliant* Blue



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: M – Padrão de peso molecular (Low Molecular Weight) pré-corado; 1 e 2: anti IgG bovino produzido em coelho.

Figura 19 - Curvas de titulação de anti IgG bovino obtidas por ELISA utilizando soro de coelho pré-imune e depois da purificação em coluna de afinidade HiTrap Protein G



Fonte: Gotti (2015)

4.7 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DOS COMPONENTES PARA A CONFEÇÃO DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO (TIC)

4.7.1 Tratamento dos papéis do teste imunocromatográfico e outros parâmetros do teste

De forma a estabelecer qual a melhor condição para realização do teste imunocromatográfico, alguns parâmetros foram analisados como descrito em materiais e métodos. Toda a validação destes parâmetros foi desenvolvida utilizando-se o modelo tipo I com soro de coelho hiperimune, por ser este o teste padronizado.

No papel *Sample pad,* foram avaliados dois tampões diferentes, um Tampão *pad* (20mM de Borato de sódio, 0,1% de Triton X-100, 0,1% de azida de sódio pH8,5 contendo 1% de BSA) e outro Tampão *pad* com Tween (20mM Borato de sódio; 0,05% de azida de sódio e 3% Tween 20). O tampão que apresentou melhor resposta foi o que continha 3% Tween 20. A amostra correu mais uniformemente pela tira de nitrocelulose e com velocidade maior, sendo este tampão contendo 3% Tween 20 o escolhido para continuação do desenvolvimento do teste imunocromatográfico.

Para a porção *conjugate pad (*fibra de vidro), a condição que propiciou a secagem mais adequada foi em dessecador de vácuo, a temperatura ambiente com umidade relativa entre 20-22 e *overnight*.

Diferentes tamanhos da membrana de nitrocelulose *Nitrocellulose HiFlow Plus* dos tamanhos foram testadas. O tamanho que mostrou melhor absorção, mais homogênea e por um tempo mais prolongado, foi a *Nitrocellulose HiFlow Plus 240.* Não foi observada diferença significativa quando a ativação da membrana de nitrocelulose foi realizada com solução de Tris HCL 0,1M com glicerol a 0,4% pH 7,5, lavagem com Na_2HPO_4 10 mM pH 7.5 e posterior bloqueio com solução Tris HCL 0,1M pH 7,6 com 2% BSA. Com isso, definiu-se não realizar a ativação e bloqueio da membrana de nitrocelulose.

Para a eliminação de sais que pudessem interferir no procedimento, foi realizada a diálise da solução contendo o anticorpo anti IgG coelho utilizado na linha teste, com posterior análise no modelo tipo I, utilizando 10 mM tampão Fosfato e diferentes concentrações de sacarose. As concentrações de sacarose testadas não demonstraram diferenças significativas, sendo a escolhida aquela com 5 %. A membrana de nitrocelulose não foi ativada e nem

bloqueada. Foram empregados os parâmetros usualmente utilizados no modelo tipo I, com posterior secagem no dessecador à vácuo em temperatura ambiente. E, o teste foi realizado com soro de coelho reagente e não reagente para a leptospirose. É possível observar na figura 20 que o teste funcionou, pois a banda avermelhada intensa foi detectada na linha controle, tanto com a amostra de soro reagente quanto a não reagente e na linha teste somente com o soro positivo. Estes resultados demonstraram que a diálise com tampão fosfato, juntamente com 5% sacarose, melhoraram o sinal do teste, quando comparado a linha teste não dialisada e não acrescida de sacarose.

Figura 20 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro hiperimune de coelho com anticorpo dialisado na linha teste e 5% sacarose

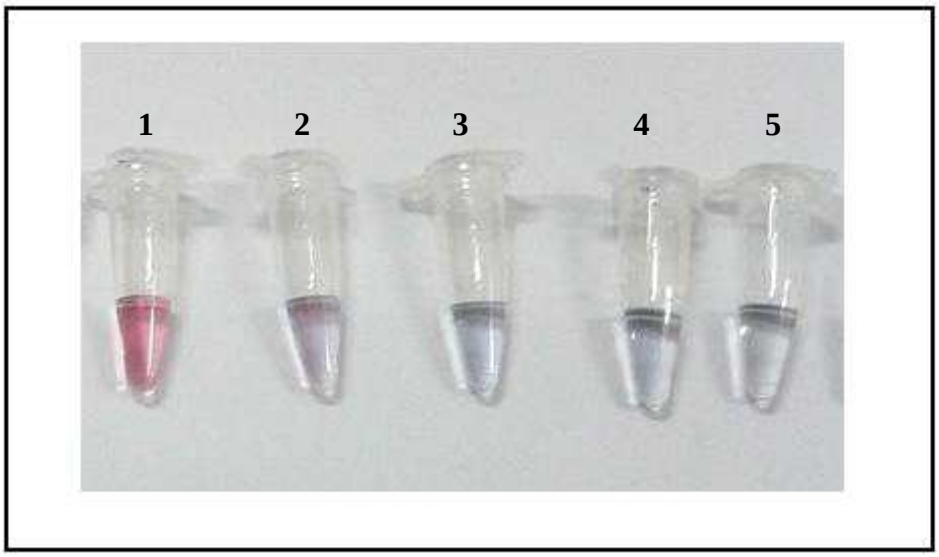
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-IgG rabbit 2 mg/ml na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro hiperimune de coelho diluído 1:10. Fitas: 1e 2) soros de coelho reagentes para leptospirose anti-Hardjobovis não dialisados e sem sacarose; 3 e 4) soros de coelho reagentes para leptospirose anti-Hardjobovis dialisados e com 5 % sacarose.

A diluição do soro que melhor reagiu foi 1:10. O tampão de amostra que teve melhor resultado foi o PBS e o tampão 1- Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Triton X-100, BSA 1%, EDTA 1 mM.

4.7.2 Teste imunocromatográfico modelo tipo I

Para o desenvolvimento deste ensaio, o modelo de configuração do tipo I foi testado. Neste caso, a conjugação do ouro coloidal foi realizada com o antígeno (proteína recombinante LipL32). Na conjugação, a quantidade de proteína recombinante utilizada foi a suficiente para estabilizar o ouro, ou seja, a concentração na qual a solução não sofreu alteração de cor, como observado na figura 21. O ouro foi estabilizado com 3,2 μg de antígeno para cada 100 μL da solução, ou seja, 30,2 μg/ mL de ouro. As concentrações do antígeno menores que 3,2 μg não foram capazes de estabilizar a solução. O volume do antígeno conjugado ao ouro utilizado inicialmente foi de 20 μL.

Figura 21 - Concentração de proteína recombinante necessária para estabilizar o ouro coloidal



Fonte:
Gotti (2015)

Legenda: 100 μL de ouro coloidal 0,01% foi acrescido de 10 μL de diferentes concentrações de LipL32: **1)** 3,2 μg; **2)** 1,6 μg; **3)** 0,8 μg; **4)** 0,4 μg; **5)** 0,2 μg. Após 10 minutos as soluções foram acrescidas de 11 μL de NaCl 10% e a leitura dos resultados realizada visualmente.

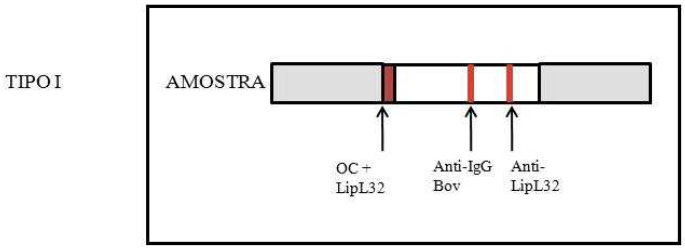
A conjugação foi estabilizada com 1% BSA e a solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 2% BSA e centrifugado. Este sedimento foi ressuspendido em tampão de armazenamento e mantido a 4º C até o momento do uso, conforme figura 22.

Figura 22 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm em tampão citrato com a proteína recombinante LipL32

Fonte: Gotti (2015)

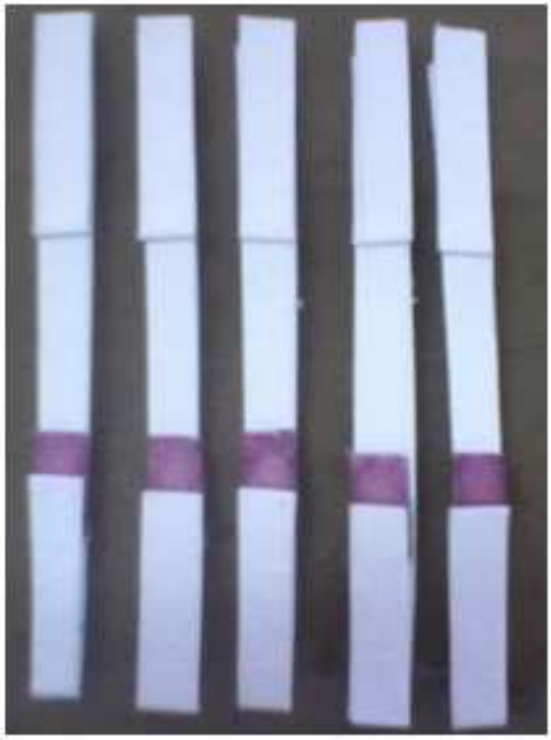
Posteriormente, a solução da proteína recombinante conjugada ao ouro foi aplicada na fibra de vidro (*conjugate pad*) e esta foi mantida em dessecador a vácuo a temperatura ambiente *overnight* para secagem. Foi realizado o bloqueio na porção *Sample pad*, utilizando o tampão *pad* tween e a secagem foi realizada em dessecador a vácuo a temperatura ambiente *overnight*. No papel de *Nitrocellulose HiFlow Plus* foi aplicada a solução contendo o anticorpo anti-IgG Bovino (KPL), anticorpo anti-IgG Hamster (Sigma) ou anticorpo anti-IgG Coelho (Sigma) na linha teste, de acordo com a espécie animal que foi testada, ao lado do controle interno, o anticorpo anti-LipL32 (figura 23). Em seguida, as membranas foram secas em dessecador a vácuo a temperatura ambiente *overnight* e os papéis foram sobrepostos em uma base plástica e fixados com auxílio de fita adesiva para a montagem do teste como apresentado na figura 24.

Figura 23 - Teste imunocromatográfico modelo tipo I



Fonte: Gotti (2015)

Figura 24 - Fitas de *dipstick* montadas após tratamento dos papéis

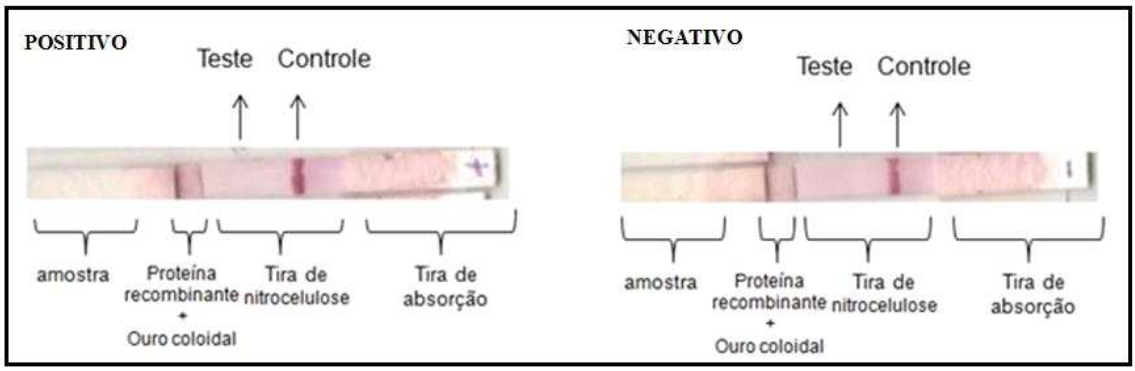


Fonte: Gotti (2015)

Para a realização do teste, a porção final (*sample pad)* da fita foi colocada em contato com 300 µl de soro diluído 1:10 em PBS e com o tempo de incubação de 20 minutos. Duas amostras de soro bovino foram utilizadas, uma SAM positiva e outra SAM negativa. Neste primeiro ensaio, a proteína LipL32 conjugada ao ouro; o anticorpo anti-LipL32 feito em coelho aplicado na linha controle e o anticorpo anti-IgG Bovino (2mg/ml) na linha teste Conforme apresentado na figura 25, é possível observar que o teste funcionou, pois a banda avermelhada foi observada na linha controle, tanto com a amostra de soro negativo quanto

positivo. Entretanto, na linha teste não ocorreu reação, demonstrando que esta configuração não foi capaz de detectar os anticorpos anti-LipL32 presentes no soro positivo, resultado previamente comprovado por ELISA e *Western blotting.*

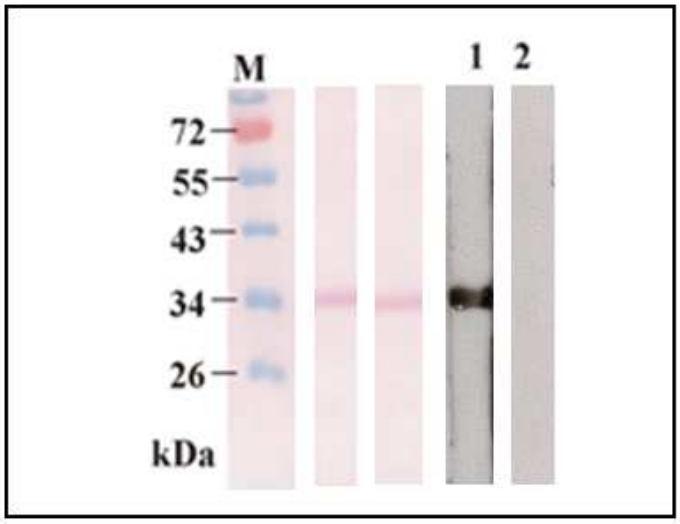
Figura 25 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico com soro Bovino



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG Bovino (0,5 mg/ml) na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro bovino em uma diluição 1:10.

Para aumentar a concentração de IgG totais de um *pool* de soros bovinos, foi realizada a precipitação dos mesmos com ácido caprílico. Os resultados obtidos deste procedimento com o aumento da concentração em 10X foram satisfatórios, como mostram as figuras 26 e 27 nos testes de *Western blotting e* ELISA.

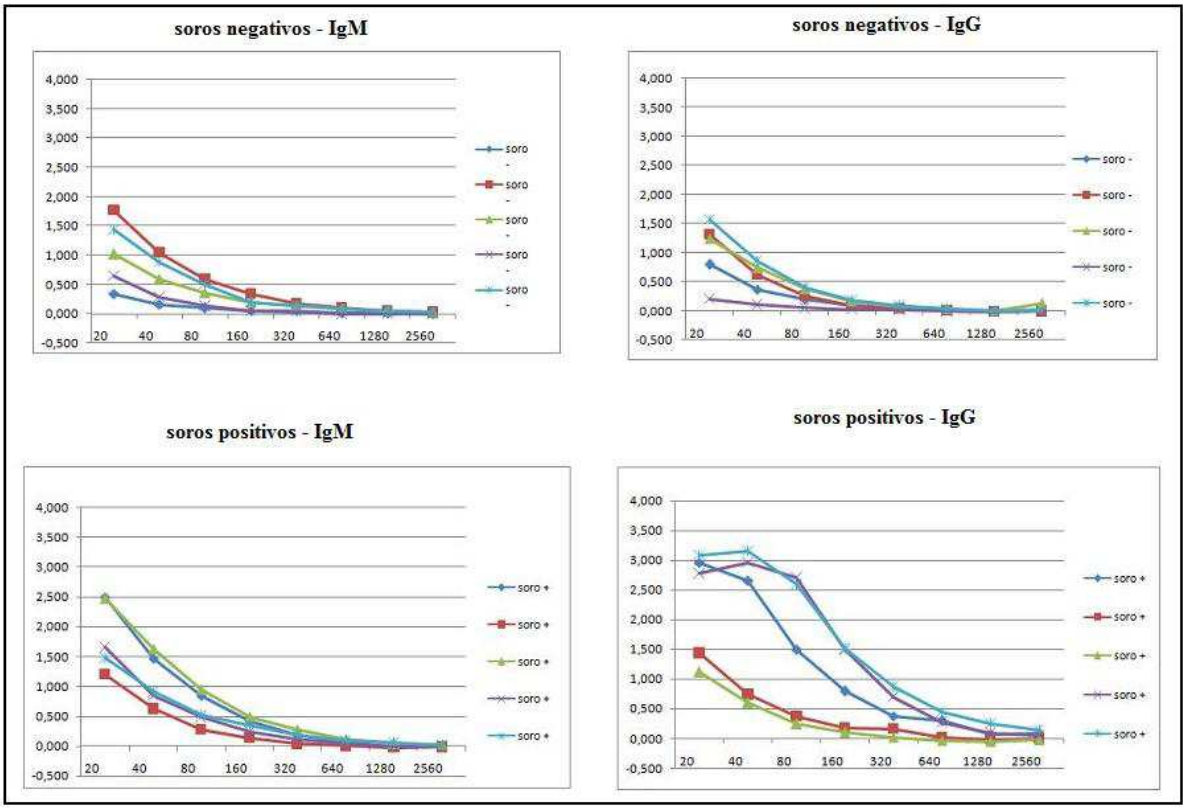
Figura 26 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico com soro bovino



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau. e Filmes (detecção por ECL). M – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteína LipL32. 1 e 2: Pool de Soros reagentes e não reagentes para leptospirose, precipitados e purificados com ácido caprílico.

Figura 27 - Curvas de titulação de IgG e IgM total obtidas por ELISA utilizando soros não reagentes (-) de amostras individuais de bovinos

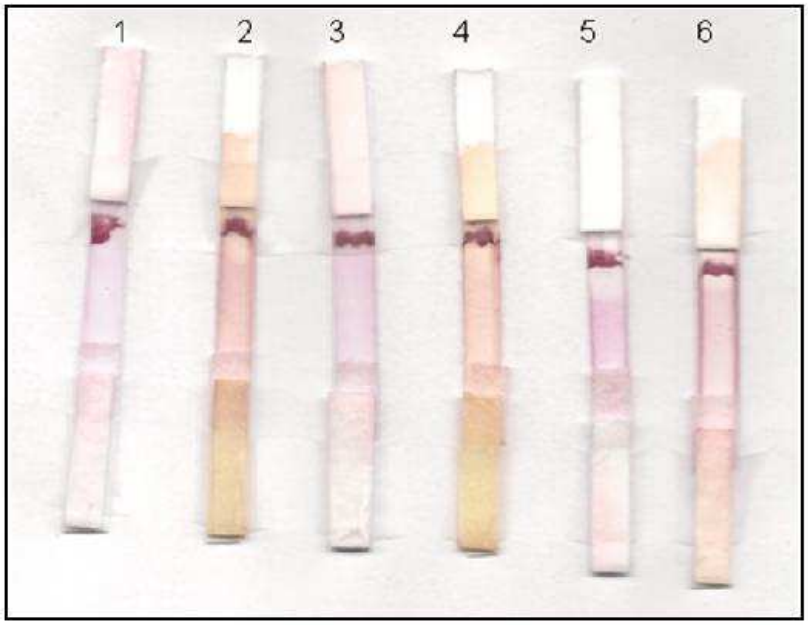


Fonte: Gotti (2015)

Posteriormente, o mesmo teste imunocromatográfico descrito anteriormente foi testado com os soros bovinos concentrados. O resultado obtido foi o mesmo, como mostra a figura 28.

Diferentes marcas e tipos de anticorpos e em diversas concentrações foram analisados com objetivo de se obter sinal na linha teste na mesma configuração. Foram testados o anti-IgG Bovino (SIGMA e KPL) nas concentrações: 0,5mg/ml; 1mg/ml, 2mg/ml e 3mg/ml. Nenhum destes testes melhorou a reação na linha teste.

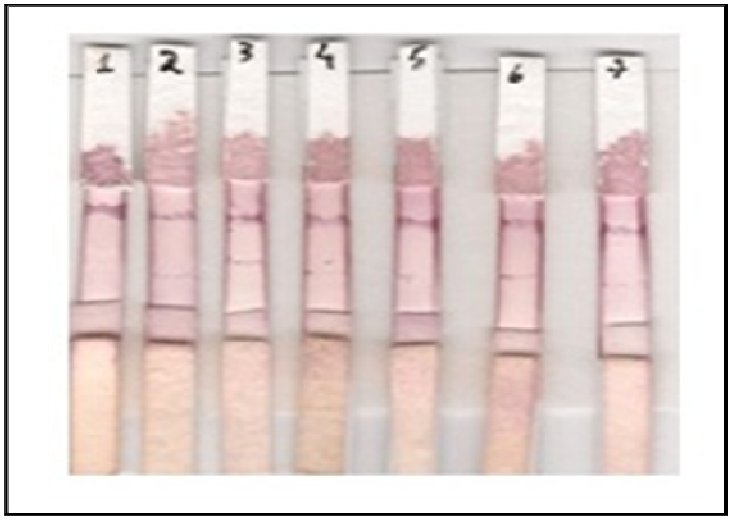
Figura 28 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico com soro bovino purificados



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG Bovino (0,5 mg/ml) na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro bovino. 1) soro bovino positivo purificado; 2) soro bovino positivo não purificado; 3) soro bovino negativo purificado; 4) soro bovino negativo não purificado; 5) soro fetal bovino purificado; 6) soro fetal bovino não purificado.

Um segundo ensaio foi realizado com soro de hamster infectado com *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130, utilizando a proteína LipL32 conjugada ao ouro, o anticorpo anti-LipL32 feito em coelho, na linha controle e o anticorpo monoclonal anti-IgG Hamster 2mg/ml (Sigma) na linha teste. Este ensaio apresentou os mesmo resultados obtidos com os soros bovinos anteriormente, como mostra figura 29.

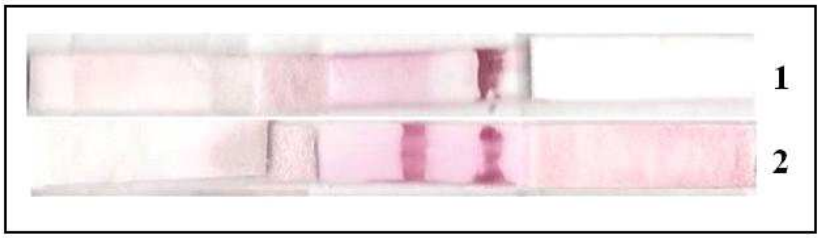
Figura 29 - Teste imunocromatográfico com soro de Hamster



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo monoclonal anti-IgG de Hamster 2,7 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro hamster imunizado com as seguintes preparações antigênicas: 1) LipL32; 3) PBS; 4) LipL32; 5) Vacina comercial antileptospirose; 6) L1-130 Bacterina antileptospirose e 7) Lp35. A fita 2 foi incubada com o soro de hamster pré-imune.

Um terceiro ensaio, no mesmo modelo do tipo I, foi realizado com soro de coelho, utilizado proteína recombinante LipL32 conjugada ao ouro, o anticorpo anti-LipL32 feito em coelho na linha controle e o anticorpo anti-IgG Coelho 2 mg/ml (Sigma), usado na linha teste. Como amostra positiva foi utilizado soro hiperimune de coelho e soro pré-imune como amostra negativa. Conforme apresentado na figura 30, é possível observar que o teste funcionou, pois a banda avermelhada foi detectada na linha controle, tanto com a amostra de soro negativa quanto positiva e na linha teste com o soro positivo. Estes resultados demonstraram que esta configuração foi capaz de detectar os anticorpos anti-LipL32 presentes no soro hiperimune de coelho.

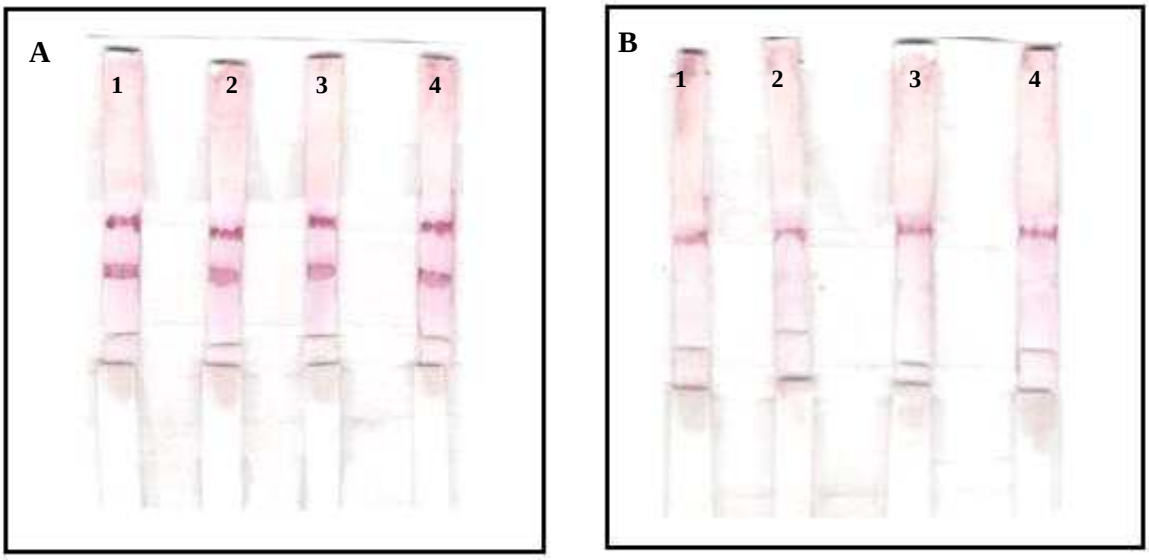
Figura 30 - Teste imunocromatográfico com soro de coelho



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo monoclonal anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro. 1) soro hiperimune de coelho; 2) soro coelho pré-imune.

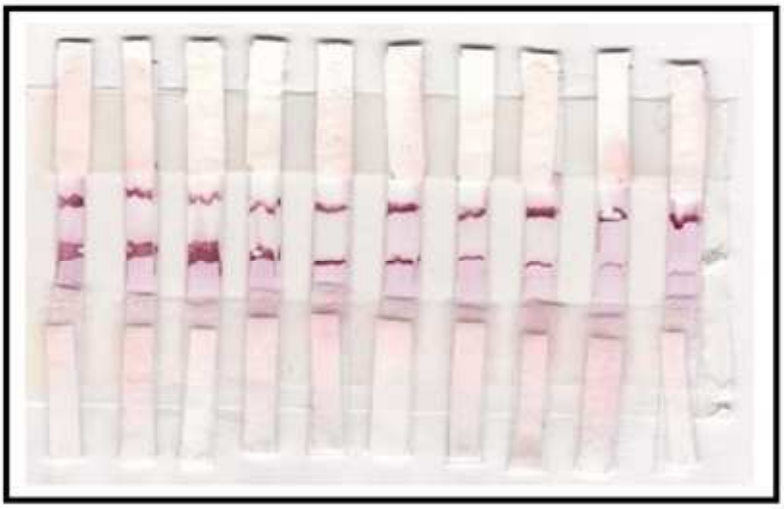
Para a determinação do limite de detecção do teste imunocromatográfico no modelo I, foram testadas várias diluições (1/10 até 1/25.600) dos soros hiperimunes contra a LipL32 e soro pré-imune de coelho como controle negativo. As figuras 31, 32 e 33 mostram que o sinal foi visualizado até a última diluição, porém entre as diluições 1/400 e 1/800 a banda avermelhada foi mais evidente.

Figura 31 - Teste imunocromatográfico com soro de coelho



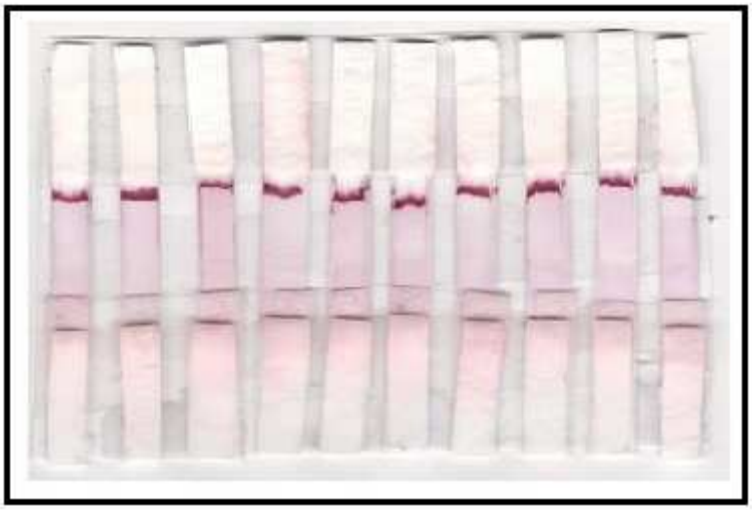
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 minutos em 300 µl da amostra de soro hiperimune de coelho com diferentes diluições. A) soro hiperimune de coelho nas diluições 1)1/10; 2) 1/20; 3) 1/30; 4)1/50; B) soro pré-imune de coelho nas diluições 1)1/10; 2) 1/20; 3) 1/30; 4)1/50.

Figura 32 - Limiar de detecção do teste imunocromatográfico com soro de coelho positivo



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 minutos em 300 µl da amostra de soro de coelho hiperimune em diferentes diluições.

Figura 33 - Limiar de detecção do teste imunocromatográfico com soro de coelho negativo

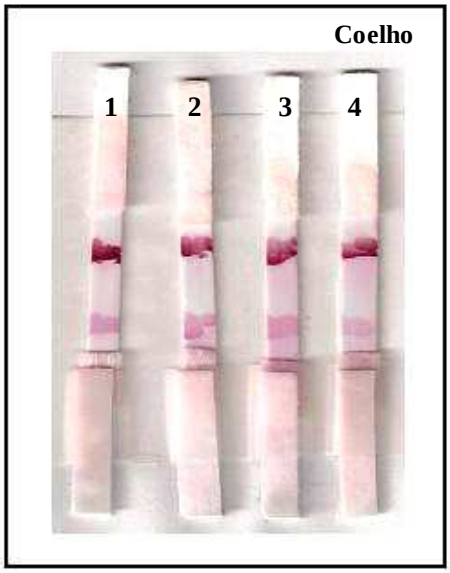


Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 minutos em 300 µl da amostra de soro pré-imune de coelho em diferentes diluições.

O teste imunocromatográfico do modelo tipo I foi testado com outros quatro soros hiperimunes de coelho, gentilmente cedidos pelo Dr. Silvio Arruda Vasconcelos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP, como mostra a figura 34. É possível observar que o teste funcionou para todos os soros testados,

pois a banda avermelhada foi observada na linha controle e na linha teste. Estes resultados demonstraram que esta configuração foi capaz de detectar os anticorpos anti-LipL32 presentes nos soros hiperimunes de coelhos. Estes soros foram produzidos utilizando-se o lisado total de leptospiras de diferentes sorovares. Estes resultados são muito importantes porque comprovam a eficiência da utilização da proteína LipL32, como antígeno conservado e mais abundante nas diferentes espécies de leptospiras. Apesar de o teste apresentar baixa sensibilidade, pois só detectou reatividade na linha teste com os soros hiperimunes.

Figura 34 - Teste imunocromatográfico com soro de coelho



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro de coelho. 1) soro de coelho hiperimune anti-L1-130; 2) soro de coelho hiperimune anti-Hardjobovis; 3) soro de coelho hiperimune anti-LPF; 4) soro de coelho hiperimune anti-Grippothiphosa.

A próxima etapa foi avaliar o teste imunocromatográfico do modelo tipo I com soros de outras espécies animais (cães e equinos). Os mesmos critérios estabelecidos para os bovinos foram utilizados, primeiramente realizou-se a soroaglutinação microscópica (SAM) para seleções de animais reagentes e não reagentes como mostrado no quadro 5. Com exceção da utilização de soros com títulos menores que 800 no SAM devido à disponibilidade de amostras.

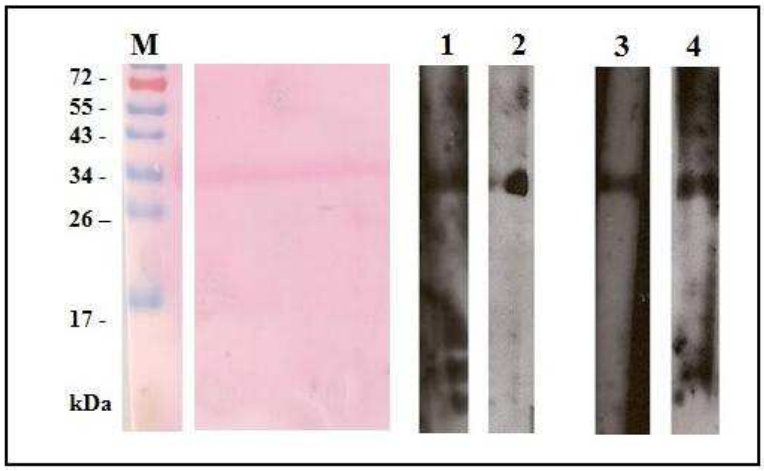
Quadro 5 - Amostras de soros de cães e equinos reagentes para leptospirose selecionadas

Identificação da Amostra de soro	*Título do SAM*[a]	*Sorovar com maior reatividade*
Soro de Cães		
35	400	Canicula
62	400	Grippothiphosa
63	400	Australis
80	400	Australis
99	200	Castellonis
109	800	Autumnalis
197	800	Autumnalis
Soros de equinos		
26	800	Castellonis
27	1600	Grippothiphosa
28	3200	Grippothiphosa
29	1600	Bratislava
30	400	Grippothiphosa
31	1.600	Grippothiphosa
32	1.600	Pyrogenes

Legenda: [a] SAM- teste de Soroaglutinação Microscópica.

Posteriormente para se avaliar a reatividade da proteína LipL32 com os soros de cães e equinos, foi realizado *Western blotting,* como mostra figura 35, nos mesmos padrões e condições que os soros bovinos. Estes ensaios revelaram-se satisfatórios, assim como nos soros bovinos demonstram a especificidade do reconhecimento da proteína recombinante LipL32 pelos soros dos animais positivos.

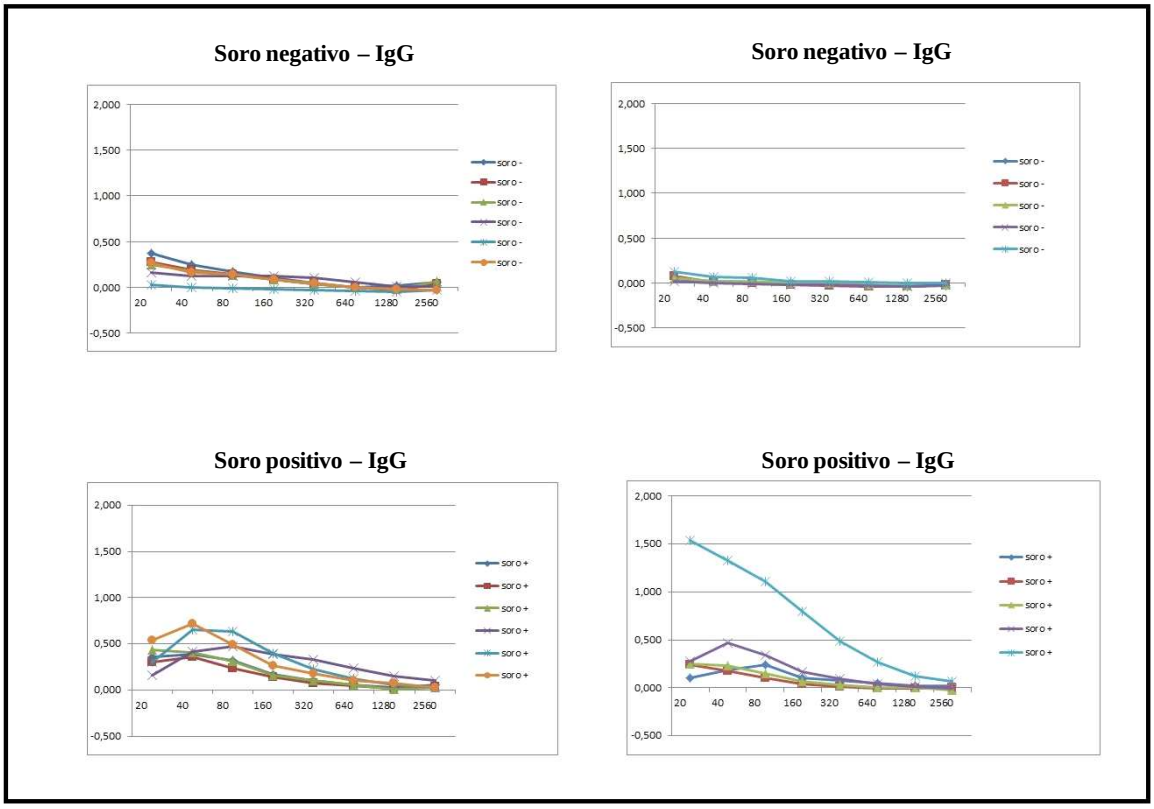
Figura 35 - *Western blotting* da proteína recombinante LipL32 purificada, utilizando amostras de soros individuais reagentes para leptospirose de cães e equinos



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau. e Filmes (detecção por ECL). M – Padrão de peso molecular (PageRuler) pré-corado; Proteína LipL32: 1 e 2) soros de cães reagentes para leptospirose; 3 e 4) soros de equinos reagentes para leptospirose.

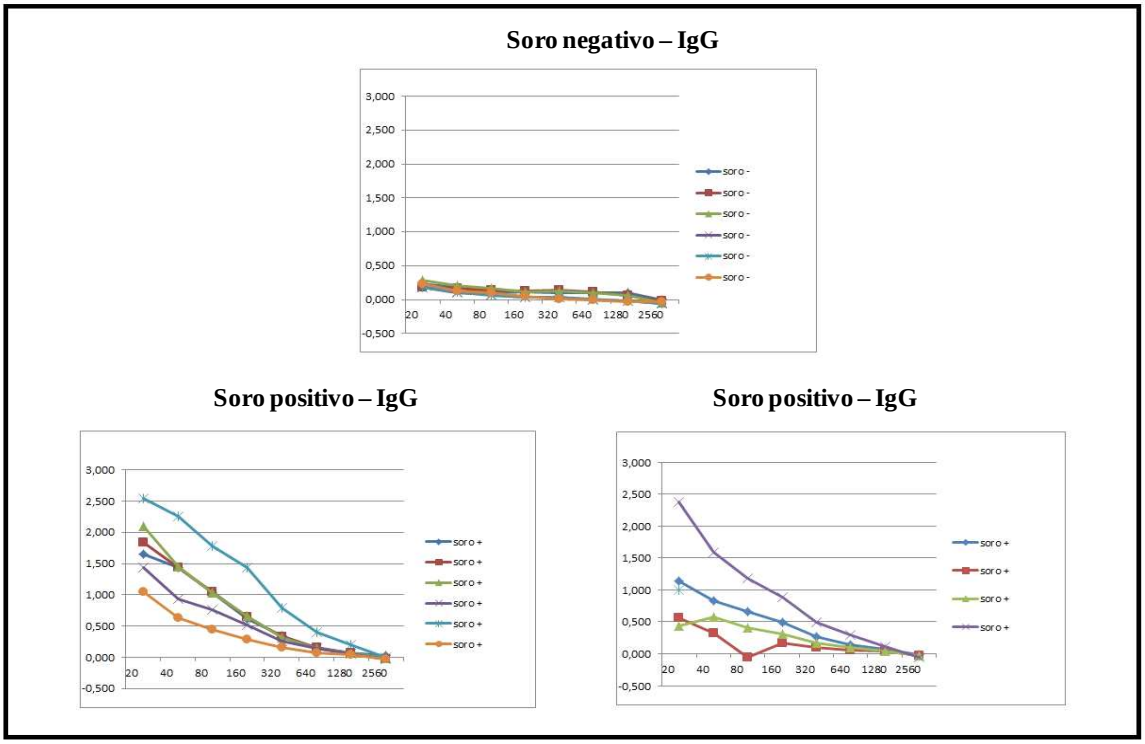
As análises realizadas por *Western blotting* foram confirmadas por ELISA, utilizando soros não reagentes e reagentes de amostras individuais de cães e equinos, realizado nas mesmas condições que descritas para soros bovinos. As figuras 36 e 37 mostram que as curvas de titulação de IgG total dos soros dos animais negativos são próximas a zero. O gráfico da proteína LipL32 (figura 36 e 37) mostram as curvas de titulação dos soros positivos com altos títulos de anticorpos. As curvas de titulação dos soros negativos para esta proteína são próximas à zero, confirmando os resultados obtidos pelo *Western blotting* (figura 35) e a especificidade da reação.

Figura 36 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros não reagentes (-) e reagentes (+) de amostras individuais de cães



Fonte: Gotti (2015)

Figura 37 - Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros não reagentes (-) e reagentes (+) de amostras individuais de equinos

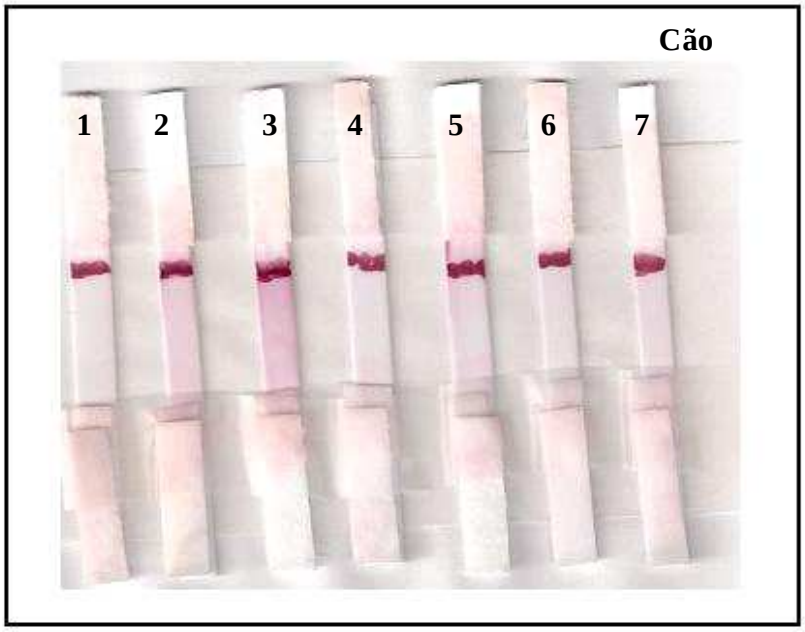


Fonte: Gotti (2015)

Depois da confirmação da reatividade da proteína recombinante LipL32 com os soros de cães e equinos, o teste imunocromatográfico do modelo tipo I foi aplicado, nas mesmas condições estabelecidas anteriormente.

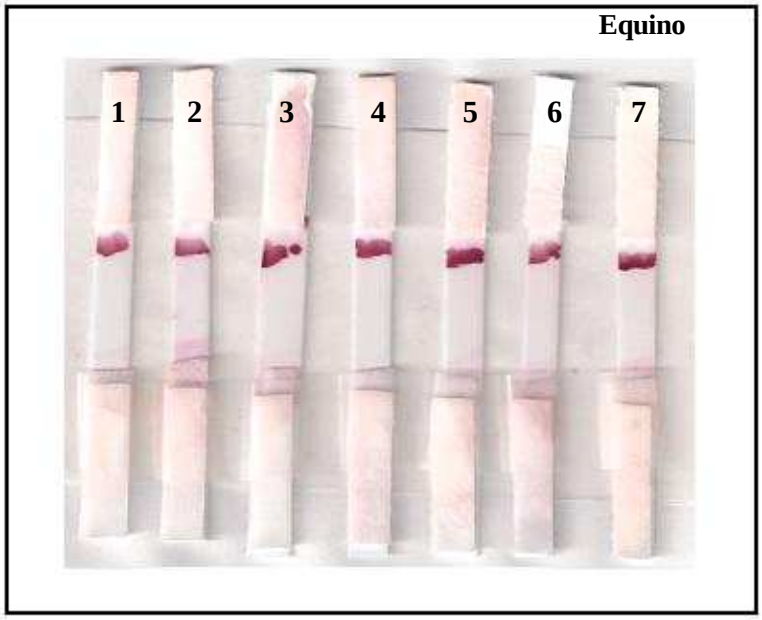
Neste ensaio, foi utilizada a proteína LipL32 conjugada ao ouro, o anticorpo anti-LipL32 feito em coelho, na linha controle e o anticorpo anti-IgG de cão ou cavalo 2 mg/ml (SIGMA) na linha teste. Nas figuras 38 e 39, são mostrados os mesmos resultados obtidos com as amostras de soros bovinos, demonstrando que o teste funcionou, mas apresentou sensibilidade baixa.

Figura 38 - Teste imunocromatográfico com soro de cão



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG de cão 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro de cão. 1 a 4) soro de cão reagente para leptospirose; 5 a 7: soro de cão não reagente.

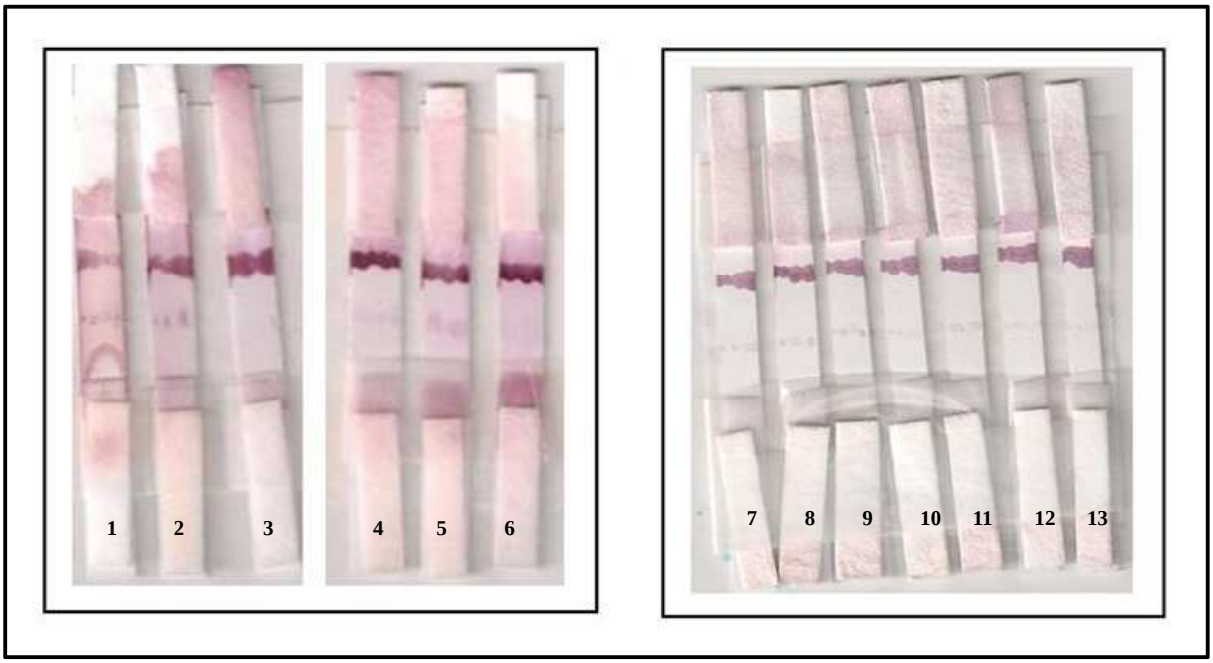
Figura 39 - Teste imunocromatográfico com soro de eqüino



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: anticorpo anti-IgG de equino 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 minutos em 300 µl da amostra de soro equino. 1 a 4) soro de equino reagente para leptospirose; 5 a 7: soro de equino não reagente.

Para tentar aumentar a sensibilidade do teste utilizamos anti-IgG bovino feito em coelho *in house* na linha teste. Para a eliminação de sais que pudessem interferir no procedimento, foi realizada a diálise da solução contendo o anticorpo anti IgG bovino feito em coelho *in house* utilizado na linha teste, com posterior análise no modelo tipo I, utilizando 10 mM tampão Fosfato com 5% sacarose. A membrana de nitrocelulose não foi ativada e nem bloqueada. Foram empregados os parâmetros usualmente utilizados no modelo tipo I, com posterior secagem em dessecador a vácuo temperatura ambiente *overnight*. E, o teste foi realizado com soro bovino reagente e não reagente para a leptospirose. É possível observar na figura 40 que o teste funcionou, pois a banda avermelhada foi detectada na linha controle, tanto com a amostra de soro negativa quanto positiva e na linha teste somente com o soro positivo. Estes resultados demonstraram que a diálise com tampão fosfato e a utilização de 5% sacarose melhoraram a sensibilidade do teste.

Figura 40 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino utilizando anticorpo dialisado na linha teste e 5% sacarose



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-IgG bovino 2 mg/ml na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro bovino diluído 1:10. Amostras: 1,2 e 7 a 13) soros bovinos reagentes para leptospirose; 3 e 6) soros bovinos não reagentes para leptospirose.

Na tentativa de se aumentar o sinal da linha teste foi testado uso da proteína A na linha teste. Sobre as mesmas condições descritas com o anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho *in house*, dialisados com tampão fosfato e 5% sacarose. Foram testados nas concentrações: 0,5mg/ml; 1mg/ml, 2mg/ml e 3mg/ml. Nenhum destes testes melhorou a reação na linha teste. O sinal da linha teste foi muito claro, como mostra a figura 41. Demonstrando que o anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho *in house* foi mais eficiente do que a proteína A na linha teste nesta configuração de teste.

Figura 41- Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino utilizando proteína A dialisado na linha teste e 5% sacarose

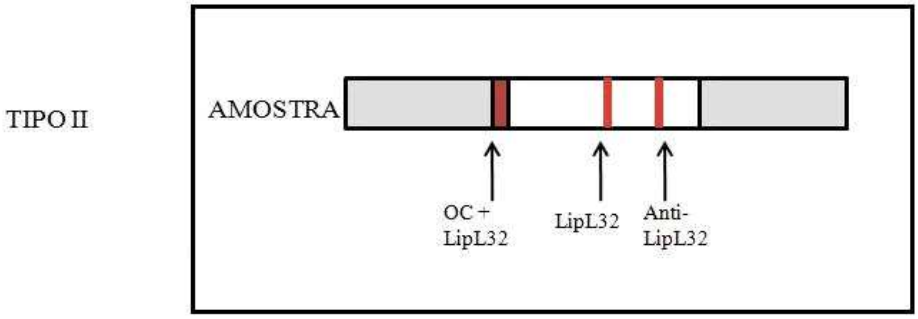
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína recombinante LipL32; proteína A 2 mg/ml na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro bovino diluído 1:10. Amostras1,2,3 4 nas respectivas concentrações 0,5mg/ml; 1mg/ml, 2mg/ml e 3mg/ml soros bovinos reagentes para leptospirose.

4.7.3 Teste imunocromatográfico modelo do tipo II

Este modelo foi avaliado com soros de coelho e bovino Neste ensaio, utilizou-se a proteína LipL32 conjugada ao ouro; o anticorpo anti-LipL32 feito em coelho aplicado na

linha controle e a proteína LipL32 na linha teste (Figura 42). O soro hiperimune de coelho reagiu, ou seja, apresentou sinal na linha teste, porém de fraca intensidade e com maior tempo de reação quando comparado ao teste anterior, utilizando o soro bovino. A intensidade da linha teste foi maior do que a da linha controle, como mostra a figura 43, sugerindo que para desenvolvimento deste modelo de teste as concentrações de cada reagente devem ser padronizadas.

Figura 42 - Teste imunocromatográfico modelo tipo II



Fonte: Gotti (2015)

Figura 43 - Montagem das fitas do teste imunocromatográfico modelo tipo II

Fonte: Gotti (2015)

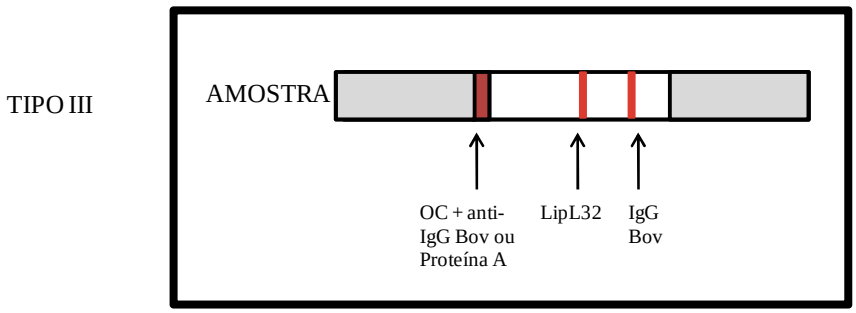
Legenda: Fitas 1 e 2: anticorpo anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Fita 3: anticorpo anti-IgG bovino 2mg/ml. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 minutos em 300 µl da amostra de soro de coelho e bovino. Soros teste: 1) soro hiperimune de coelho; 2) soro de coelho anti-L1-130; 3) soro bovino reagente para leptospirose.

4.7.4 Teste imunocromatográfico modelo tipo III

Para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico no modelo tipo III, é necessário: anticorpo anti-IgG bovino ou proteína A conjugada ao ouro; o anticorpo IgG coelho na linha controle e a proteína recombinante LipL32 na linha teste (figura 44). A primeira tentativa de conjugação foi realizada com ouro coloidal com o anticorpo anti-IgG bovino (SIGMA), entretanto, o rendimento não foi satisfatório provavelmente devido à contaminantes e conservantes presentes no anticorpo comercial. Para conseguir aplicar este modelo de teste, foi necessária a produção de soro de coelho anti-IgG bovino em coelho, conforme descrito no item 4.1 dos resultados. Após a produção e purificação deste soro em coluna de proteína G, foi realizada a conjugação do ouro coloidal 20nm (BBI) com o anticorpo anti-IgG bovino produzido em coelho purificado, conforme figura 45, apresentando uma coloração vermelho intensa, sendo um indicativo da eficiência da conjugação.

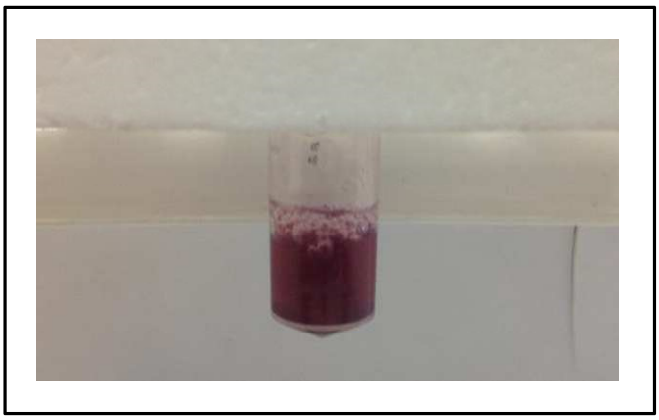
Foi realizada também, para posterior comparação, a conjugação do ouro coloidal 20 nm (BBI) e a proteína A, conforme figura 46, na qual a conjugação também se mostrou satisfatória.

Figura 44 - Teste imunocromatográfico modelo tipo III



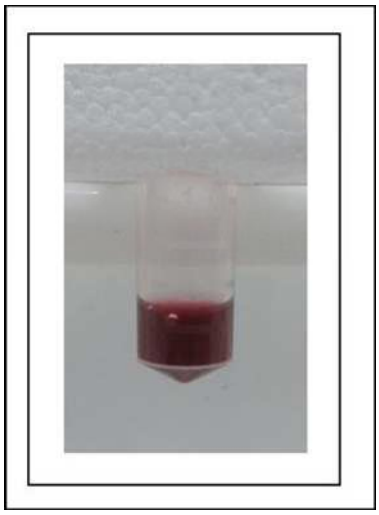
Fonte: Gotti (2015)

Figura 45 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm em tampão citrato com anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho



Fonte: Gotti (2015)

Figura 46 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm em tampão citrato com proteína A



Fonte: Gotti (2015)

Para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico no modelo tipo III, é necessário: anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho ou proteína A conjugado ao ouro; o anticorpo IgG Coelho na linha controle e a proteína recombinante LipL32 na linha teste, conforme esquema mostrado na figura 5 do item Material e Métodos.

A solução de anticorpo anti IgG bovino feito em coelho ou proteína A conjugada ao ouro coloidal foi aplicada na fibra de vidro (*conjugate pad*) e mantida a temperatura ambiente *overnight* em dessecador a vácuo para secagem. Foi realizado o bloqueio na porção *Sample pad*, utilizando o tampão *pad tween* e a secagem da mesma maneira. No papel de *Nitrocellulose HiFlow Plus* foi aplicada a proteína recombinante LipL32 na linha teste,

dialisada em tampão fosfato com 5% de sacarose, como padronizado, ao lado do controle interno, o anticorpo anti-IgG coelho (SIGMA). Após, as membranas foram secas a temperatura ambiente no dessecador a vácuo *overnight* e os papéis foram sobrepostos.

Após preparo dos papéis, a porção final (*sample pad)* da fita foi colocada em contato com 300 µl de soro diluído 1:10 em PBS e com o tempo de incubação de 20 minutos. O primeiro experimento realizado foi utilizando o anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho conjugado ao ouro coloidal. A amostra utilizada foi soro bovino reagente para leptospirose e o soro não reagente. Conforme apresentado na figura 47, é possível observar que o teste funcionou, pois a banda avermelhada foi detectada na linha controle, tanto com a amostra de soro negativo quanto positivo. Entretanto, na linha teste não ocorreu reação, demonstrando que esta configuração não foi capaz de detectar os anticorpos anti-LipL32 presentes no soro reagente para leptospirose em amostras bovinas. Diferentes concentrações (1mg/ml até 5mg/ml) de proteína recombinante (LipL32) foram avaliadas na linha teste, porém nenhuma destas concentrações alteraram o resultado final. Estes resultados mostraram que o modelo tipo III, utilizando o conjugado anti-IgG bovino ao ouro coloidal não é adequado para o desenvolvimento do teste imunocromatógrafico nas condições analisadas.

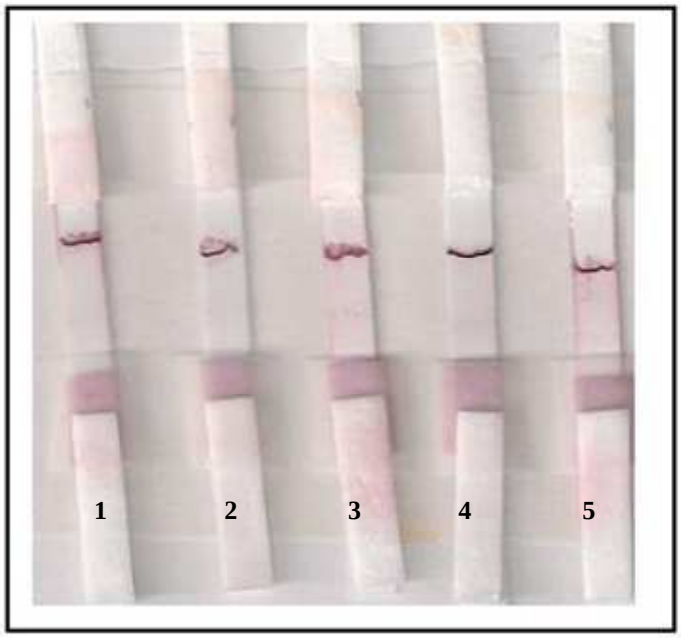
Figura 47 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a anticorpo anti-IgG bovino feito em coelho, em soro bovino

Fonte: Gotti (2015)

Legenda: conjugado: anticorpo anti –IgG bovino feito em coelho com ouro coloidal; LipL32 (0,5mg/ml) na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. 1) soro bovino reagente para leptospirose; 2) soro bovino não reagente para leptospirose.

Um segundo experimento nas mesmas condições descritas anteriormente foi realizado, utilizando o conjugado ouro coloidal com a proteína A. Foram utilizadas amostras de soros de coelhos, bovinos, eqüinos e cães de animais não reagentes e reagentes para leptospirose. A figura 48 mostra os animais não reagentes de cada espécie. É possível notar que o teste funcionou, pois a banda avermelhada foi detectada na linha controle, e a linha teste não acendeu.

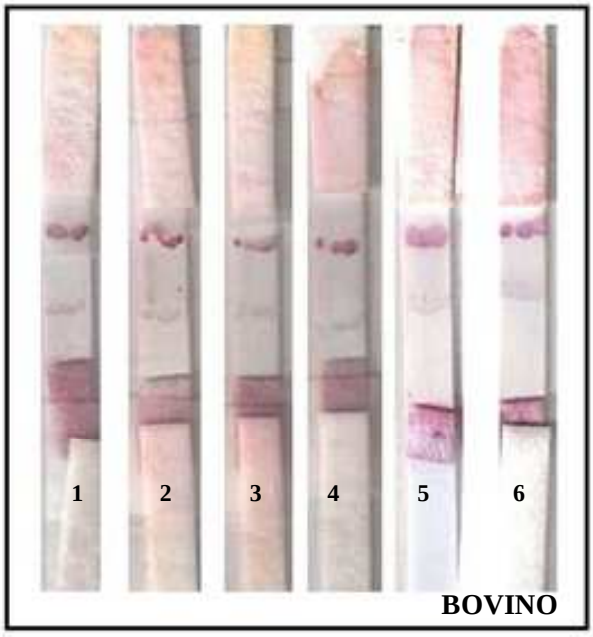
Figura 48 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostra s de animais não reagentes



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: conjugado: proteína A com ouro coloidal; LipL32 (0,5mg/ml) dialisada e acrescida de 5% sacarose, na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. 1) PBS; 2) soro bovino não reagente para leptospirose; 3) soro de cão não reagente para leptospirose; 4) soro de coelho não reagente para leptospirose; 5) soro de equino não reagente para leptospirose.

Nas amostras utilizando soros reagentes de bovinos, é possível observar na figura 49 que o teste funcionou, a linha teste reagiu mais fracamente do que a linha controle, validando o teste e o uso deste conjugado.

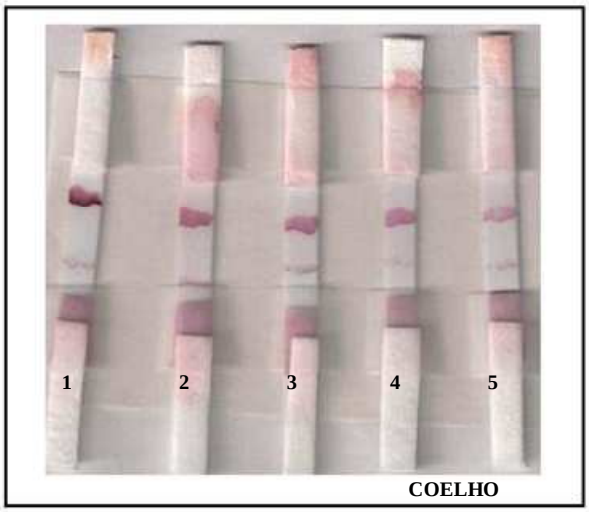
Figura 49 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de bovinos reagentes



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: conjugado: proteína A com ouro coloidal; LipL32 (0,5mg/ml) dialisada e acrescida de 5% sacarose, na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. 1, 2, 3, 4 e 5) soro bovino reagente para leptospirose;

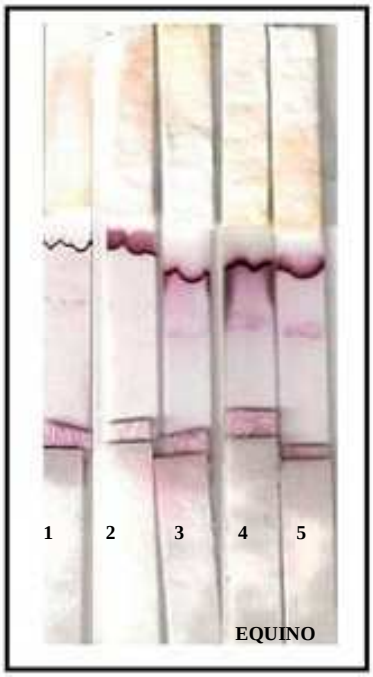
Na figura 50 é possível notar que o teste foi validado para os soros de coelho. As linhas controle e teste apresentaram coloração avermelhada . Nas amostras utilizando soros reagentes de equinos, é possível observar que ambas a linhas acenderam, tanto a linha controle validando o teste, quanto a linha teste, confome figura 51.

Figura 50 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de coelhos reagentes



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: conjugado: proteína A com ouro coloidal; LipL32 (0,5mg/ml) dialisada e acrescida de 5% sacarose, na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. 1, 2, 3, 4 e 5) soro de coelho reagente para leptospirose;

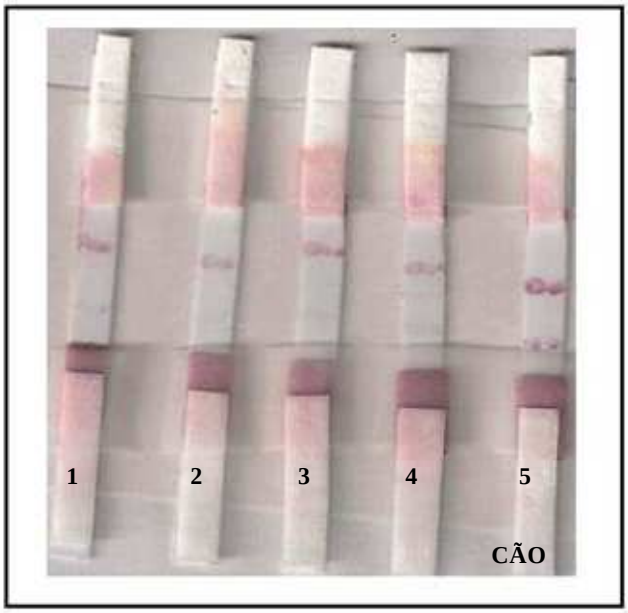
Figura 51 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de eqüino reagentes



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: conjugado: proteína A com ouro coloidal; LipL32 (0,5mg/ml) dialisada e acrescida de 5% sacarose, na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. 1, 2, 3, 4 e 5) soro de equino reagente para leptospirose.

Na figura 52 é possível observar que o teste foi validado para os soros reagentes de cão. O teste funcionou, a linha teste reagiu mais fracamente do que a linha controle, validando o teste e o uso do conjugado ouro coloidal com a proteína A.

Figura 52 - Teste imunocromatográfico tipo III utilizando ouro coloidal 20nm conjugado a proteína A em amostras de cães reagentes



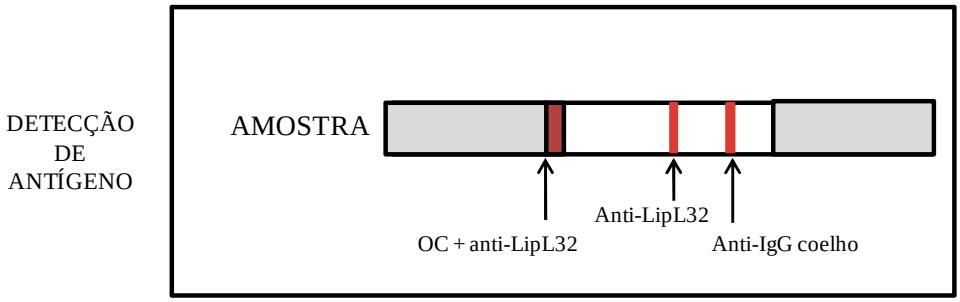
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: conjugado: proteína A com ouro coloidal; LipL32 (0,5mg/ml) dialisada e acrescida de 5% sacarose, na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. 1, 2, 3, 4 e 5) soro de cão reagente para leptospirose.

4.7.5 Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno

Até o momento, avaliamos a utilização do teste imunocromatográfico na detecção de anticorpos presentes em amostras de soros. Para verificarmos a possibilidade de o método ser aplicado na detecção de antígenos presentes em amostras de urina, um novo teste foi desenvolvido, conforme esquematizado na figura 53. Neste caso, o anticorpo anti-LipL32 foi conjugado ao ouro coloidal, como mostra figura 54, a suspensão apresentou coloração vermelho escuro característica de conjugação eficiente. Amostras de urina humana foram infectadas experimentalmente com uma cultura de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola

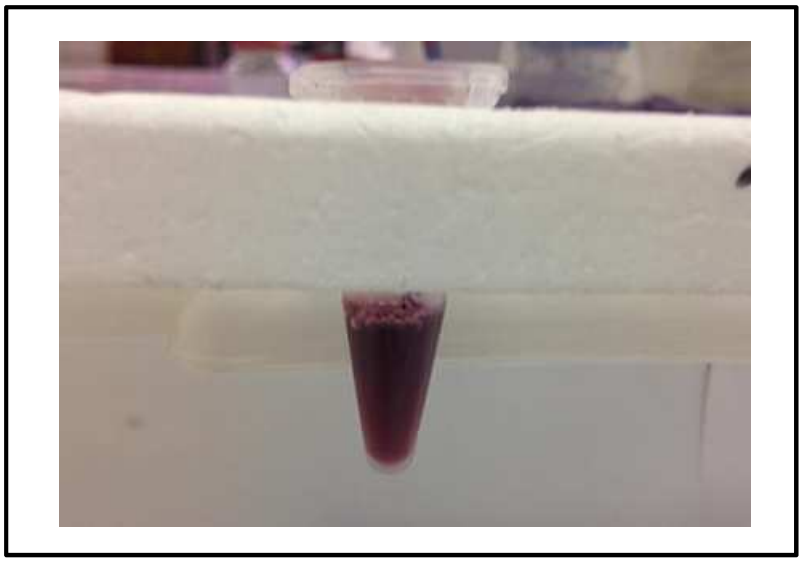
estirpe LO4 para serem utilizadas no ensaio. O anticorpo anti-LipL32 foi aplicado na linha teste e anticorpo anti-IgG coelho na linha controle.

Figura 53 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno



Fonte: Gotti (2015)

Figura 54 - Conjugação do ouro coloidal 20nm BBI com anti-LipL32

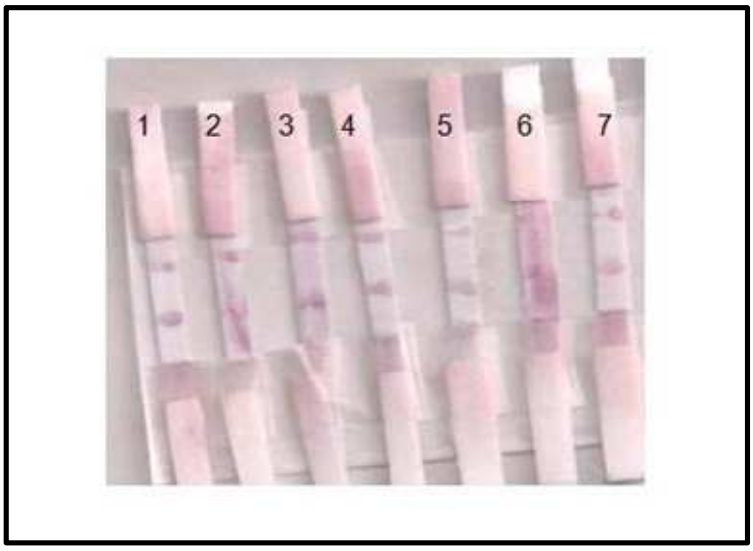


Fonte: Gotti (2015)

Os papéis foram tratados conforme descrito em matérias e métodos. A membrana de nitrocelulose utilizada foi a *Nitrocellulose HiFlow Plus*, tamanho HF 240. Realizamos dois ensaios, a figura 55 apresenta o resultado obtido com o primeiro ensaio, é possível observar que o teste imunocromatográfico foi capaz de detectar a presença da proteína LipL32 nas leptospiras em amostras de urina. A amostra de urina infectada apresentou sinal tanto na

linha controle, validando o teste quanto na linha teste em todas as concentrações de células avaliadas, com o limite de detecção de 10 leptospiras/ ml. Foi observada uma lentidão na migração da amostra, necessitando de novas padronizações para tentar melhor a fluidez da amostra na membrana.

Figura 55 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a anticorpo anti-LipL32; anticorpo anti-LipL32 2 mg/ml na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de urina humana infectada com diluição seriada de 10^8 a 10^1 cels/mL. O teste foi realizado em membrana de nitrocelulose HF 240.

No segundo ensaio realizado, foi avaliado o efeito do congelamento da amostra de urina na detecção do antígeno. Foram empregadas as mesmas condições descritas anteriormente. Na figura 56, as fitas com o resultado deste experimento são mostradas. É possível verificar a presença das linhas vermelhas na linha com a urina infectada com 10^8 células/ml e ausência destas linhas na urina não infectada, demonstrando que o congelamento não interfere no funcionamento do teste.

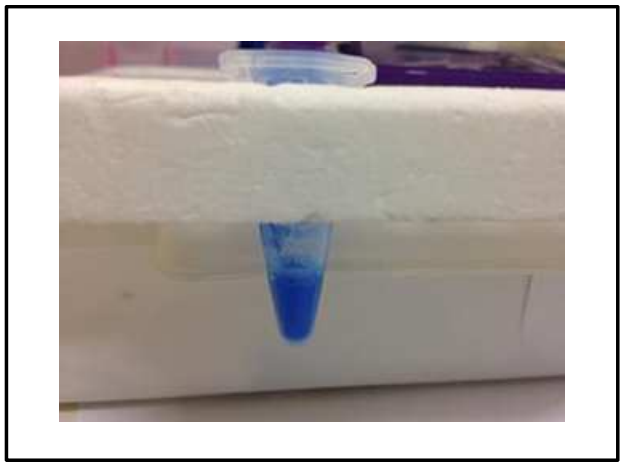
Figura 56 - Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno

Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a anticorpo anti-LipL32; anticorpo anti-LipL32 2 mg/ml na linha teste; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de urina humana. O teste foi realizado em membrana de nitrocelulose HF 240. 1) urina infectada 108; 2) urina infectada congelada 108; 3) LipL32 +urina ; 4) urina + PBS; 5) urina pura

4.7.6 Uso de microesferas como conjugado para desenvolvimento do teste imuncromatográfico

A conjugação da proteína recombinante LipL32 com microesferas Estapor ® K-030 Azul (MERCK) foi avaliada com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste imunocromatográfico do modelo tipo I. Para tanto, as microesferas foram diluídas para concentração final de 1% em Tampão PBS pH 7,45. A proteína foi adicionada em três diluições diferentes a serem testadas (0,2; 04 e 0,8 mg/ml) . A diluição escolhida foi a de 0,4mg/ml, que originou a conjugação mais estável, conforme figura 57.

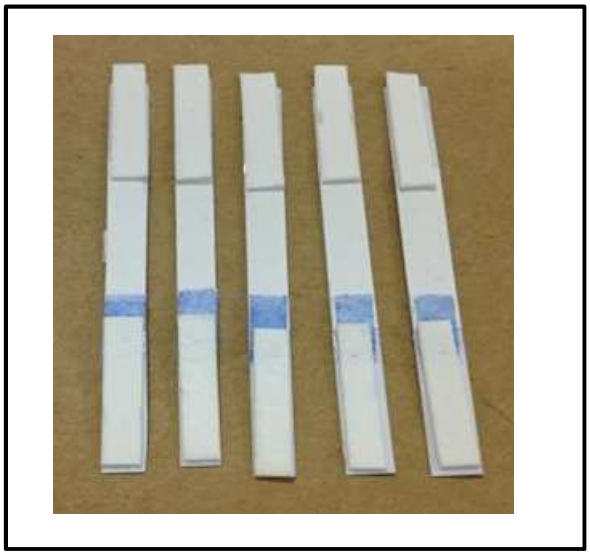
Figura 57 - Conjugação da microesfera com a proteína LipL32



Fonte: Gotti (2015)

Após a conjugação, foi realizado o tratamento dos papeis e a montagem das fitas, como observado na figura 58.

Figura 58 - Fitas de dipstick montadas após tratamento dos papéis, utilizando o conjugado com microesferas mais a proteína recombinante LipL32

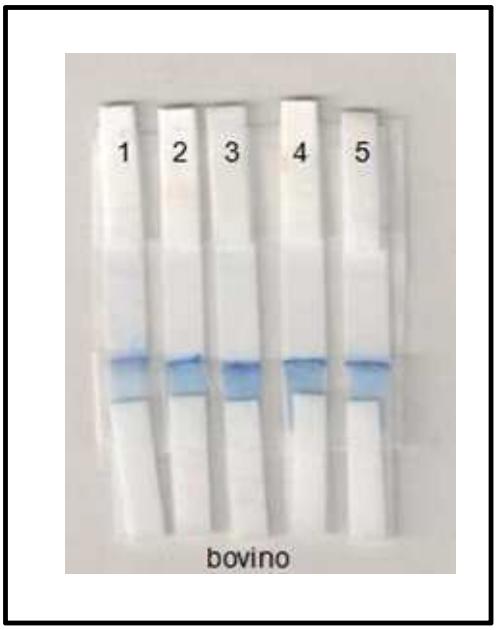


Fonte: Gotti (2015)

Para a realização do teste, a porção final (*sample pad)* da fita foi colocada em contato com 300 µl de soro diluído 1:10 em PBS e com o tempo de incubação de 20 minutos. Foram testadas amostras clínicas de soro bovino reagente não reagente para leptospirose e amostra

com soro de coelho hiperimune anti-Hardjobovis. Na figura 59, podemos observar que o teste não funcionou, provavelmente devido a não migração do conjugado. Todo o conjugado ficou retido na fibra de vidro. A linha controle acendeu muito fracamente em apenas uma das amostras. Para tentar contornar o problema, o conjugado não foi colocado na fibra de vidro e sim diretamente na nitrocelulose. Este procedimento mostrou um resultado melhor, porém ainda com as linhas controle e teste apresentando baixa intensidade mostraram-se muito fracas (figura 60).

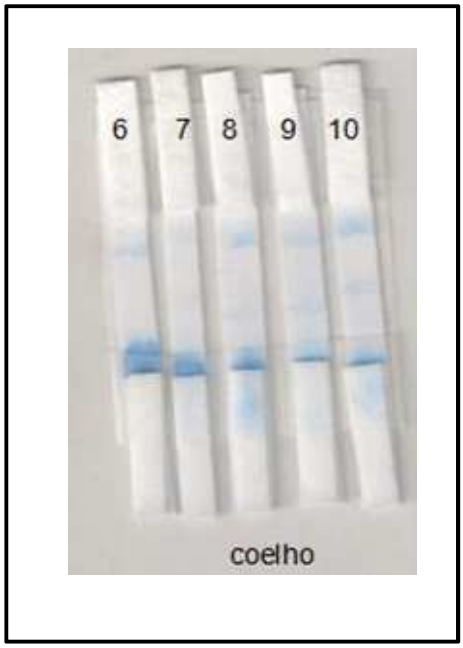
Figura 59 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino utilizando conjugado de microesferas com a proteína recombinante LipL32



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: Conjugado: microesferas com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-LipL32 2 mg/ml na linha controle; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG bovino na linha teste. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra soro diluído 1:10. O teste foi realizado em membrana de nitrocelulose HF 240. 1, 2 e 3) soro bovino reagente para leptospirose; 3 e 4) soro bovino não reagente; 5) PBS.

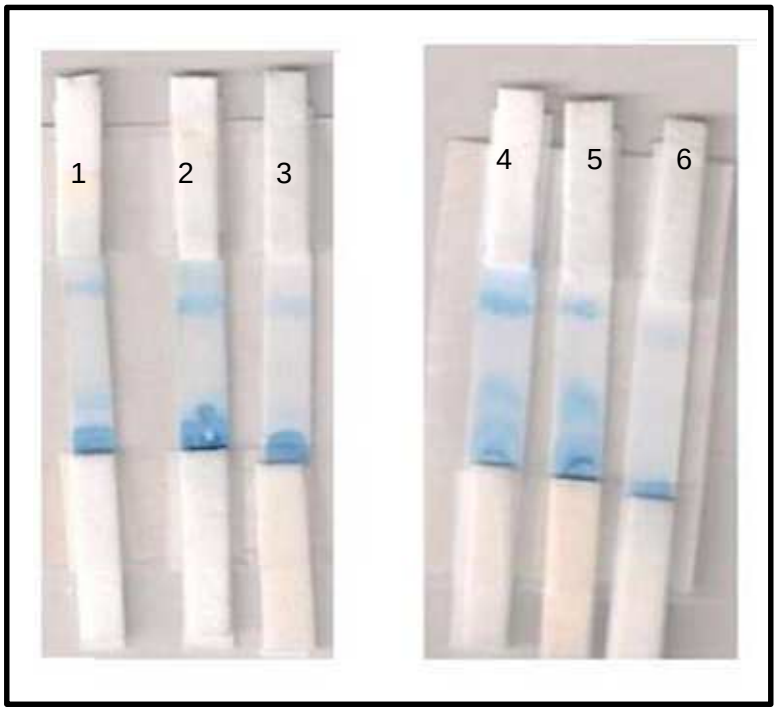
Figura 60 - Teste imunocromatográfico tipoI com soro bovino utilizando conjugado de microesferas com a proteína recombinante LipL32



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: microesferas com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-LipL32 2 mg/ml na linha controle; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG bovino na linha teste. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. O teste foi realizado em membrana de nitrocelulose HF 240. 6) soro pré-imune de coelho; 7) PBS; 8,9 e 10) soro hiperimune de coelho anti-Harjobovis; 9) soro hiperimune de coelho anti-LPF e 10) soro hiperimune de coelho anti-L1 130 .

Para confirmar os resultados obtidos, um novo ensaio foi realizado nas mesmas condições anteriores e com a aplicação do conjugado diretamente na membrana de nitrocelulose. Na figura 61, é possível observar que a reação ocorreu tanto na linha teste quanto na linha controle demonstrando que o teste funcionou, porém as bandas ficaram difusas. Não foi possível melhorar a sensibilidade do teste.

Figura 61 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino e soro de coelho hiperimune utilizando conjugado de microesferas com a proteína recombinante LipL32



Fonte: Gotti (2015)

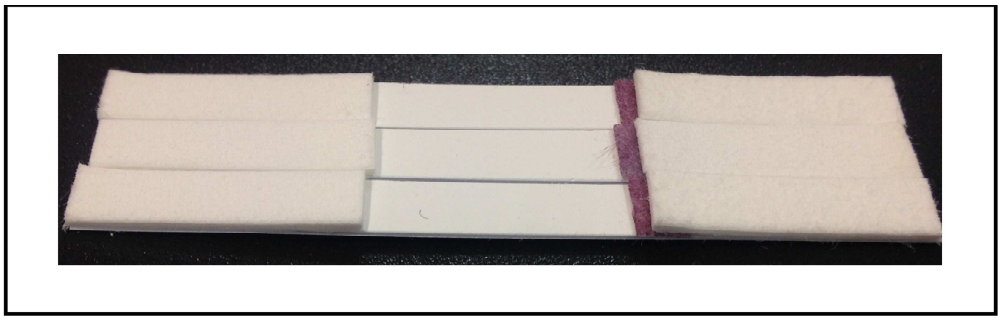
Legenda: Conjugado: microesferas com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-LipL32 2 mg/ml na linha controle; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG bovino na linha teste. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 300 µl da amostra de soro diluído 1:10. O teste foi realizado em membrana de nitrocelulose HF 240. 1) soro bovino reagente para leptospirose; 2) soro não reagente para leptospirose; 3) PBS; 4) soro hiperimune de coelho anti-Harjobovis; 5) soro hiperimune de coelho anti-L1 130 ; 6) soro pré-imune de coelho.

4.7.7 Aplicação e validação do teste em amostras clínicas em plataforma diagnóstica

Posteriormente a escolha e padronização dos testes imunocromatográficos, foram realizados os testes tipos I e III, em amostras clínicas de diversas espécies animais (bovinos, eqüinos, cão, coelho, hamster e suíno), em plataforma diagnóstica, como descrita em matérias e métodos.

O preparo das fitas foi realizado conforme descrito em materiais e métodos, conforme figura 62.

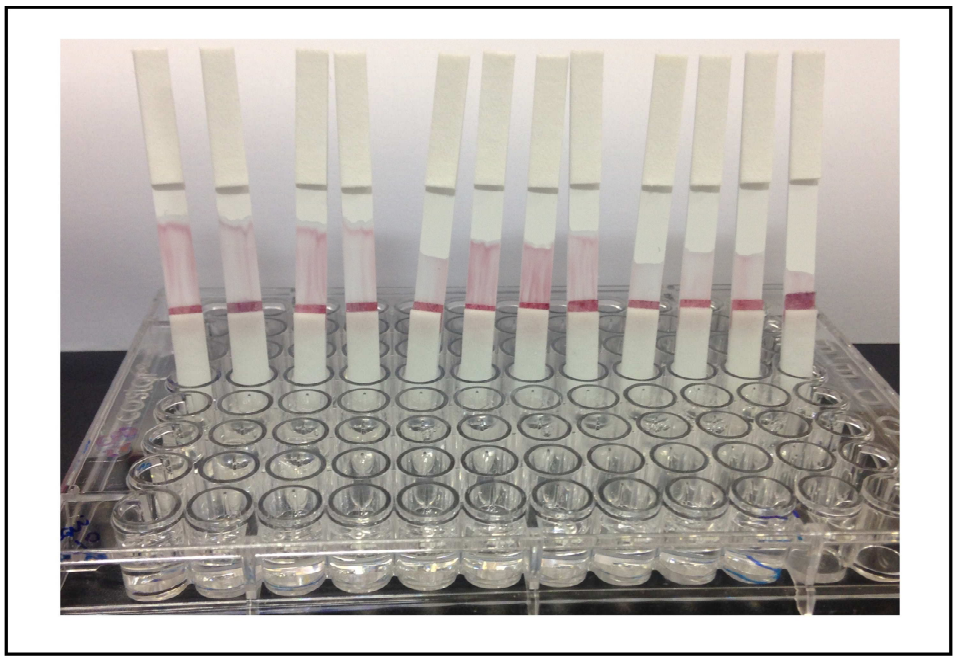
Figura 62 - Teste imunocromatográfico confeccionado em plataforma diagnóstica



Fonte: Gotti (2015)

Para aplicação do teste, as amostras clínicas foram diluídas em tampão de amostra, Tampão Tris-HCL 50 mM pH7,4, NaCL 150 mM, Triton X-100, BSA 1%, EDTA 1 mM; em uma diluição 1:10 em 100 µl de soro. Os soros foram aplicados em placa de ELISA, devido ao grande número de amostras e as fitas foram emergidas no soro durante 20 minutos, com posterior leitura, conforme se observa na figura 63.

Figura 63 - Aplicação do teste imunocromatográfico confeccionado em plataforma diagnóstica em placas de ELISA

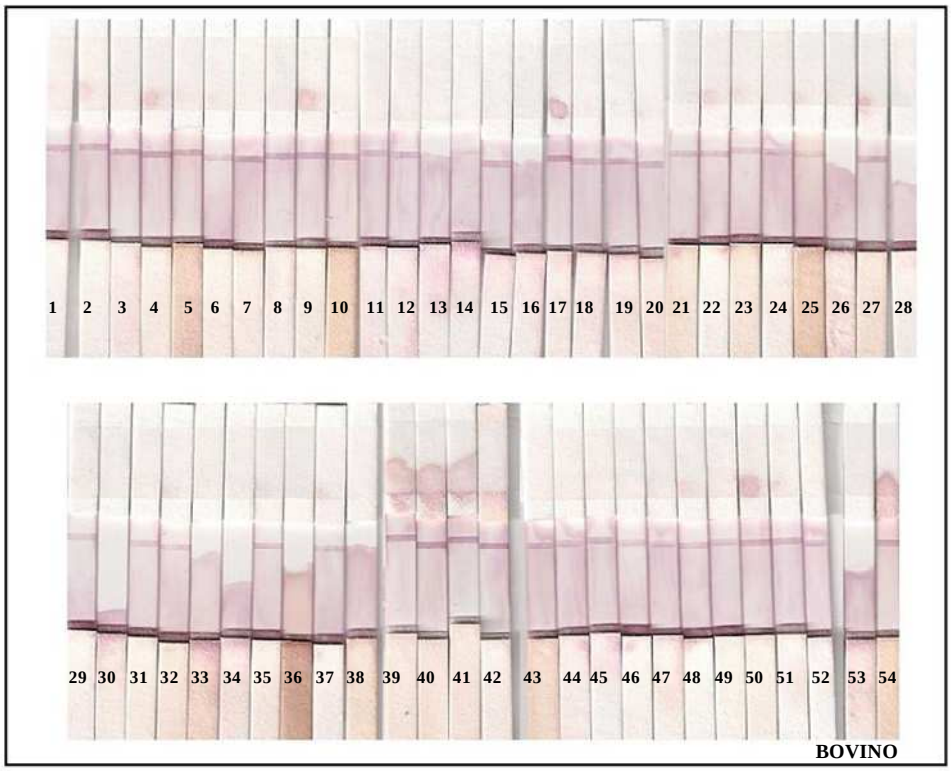


Fonte: Gotti (2015)

O teste imunocromatográfico tipo I foi testado para soro bovino e de coelho para soro bovino foi utilizado o conjugado: ouro coloidal com proteína LipL32; linha teste anti-IgG bovino feito em coelho dialisado em tampão fosfato 10mmM com 5 % sacarose ; linha controle: anti-LipL32, aplicado na máquina e realizado o teste posterior em placa de ELISA, em amostras bovina.

Na figura 64 é possível observar que as amostras reagentes e não reagentes para leptospirose bovina. O teste funcionou, a linha controle acendeu, porém a linha teste não reagiu, necessitando de novas padronizações para o uso deste teste nesta plataforma.

Figura 64 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro bovino em plataforma diagnóstica



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-IgG bovino 2 mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro bovino diluído 1:10. Amostras: 1 a 50: soros bovinos reagentes para leptospirose; 51-54) soros bovinos não reagentes para leptospirose.

Um segundo ensaio utilizando o tipo I, soro de coelho foi realizado (conjugado: ouro coloidal com proteína LipL32; linha teste anti-IgG coelho dialisado em tampão fosfato 10mmM com 5 % sacarose ; linha controle: anti-LipL32). Observa-se na figura 65 que o teste funcionou, a linha controle acendeu, validando o teste e a linha teste também reagiu, mais fracamente, sugerindo a necessita de novas padronizações do teste nesta plataforma automatizada.

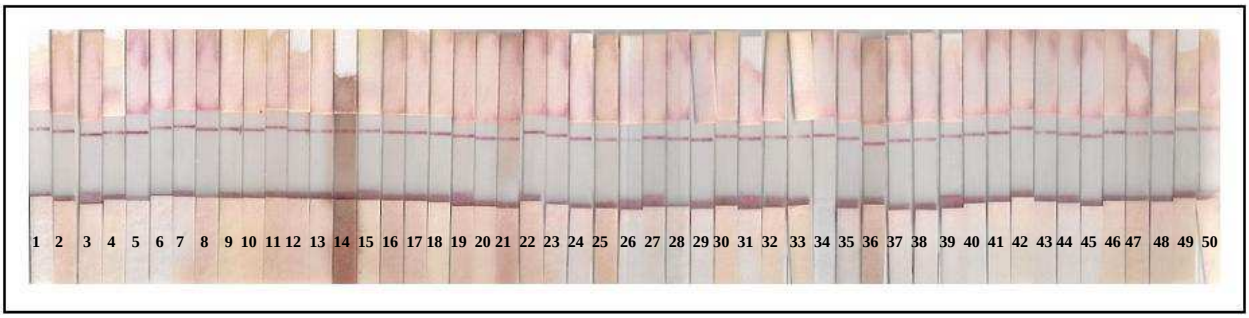
Figura 65 - Teste imunocromatográfico tipo I com soro de coelho em plataforma diagnóstica

Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína recombinante LipL32; anticorpo anti-IgG coelho 2 mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-LipL32 Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro de coelho diluído 1:10. Amostras: 1 a 13 soros hipeirmune de coelhos; 14) soros pré-imune de coelho.

Foi realizado um segundo experimento com o outro teste padronizado, o modelo tipo III (conjugado: ouro coloidal com proteína A; linha teste proteína recombinante LipL32 em dialisado em tampão fosfato 10mmM com 5 % sacarose ; linha controle: anti-IgG coelho) foi aplicado na máquina e realizado o teste posterior em placa de ELISA, em amostras clínicas de bovinos, equinos, cães, coelhos e hamster.

É possível observar na figura 66 as amostras bovinas reagentes e não reagentes para leptospirose. O teste funcionou, a linha controle acendeu, porém a linha teste não reagiu, necessitando de novas padronizações para o uso deste teste nesta plataforma.

Figura 66 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro bovino em plataforma diagnóstica



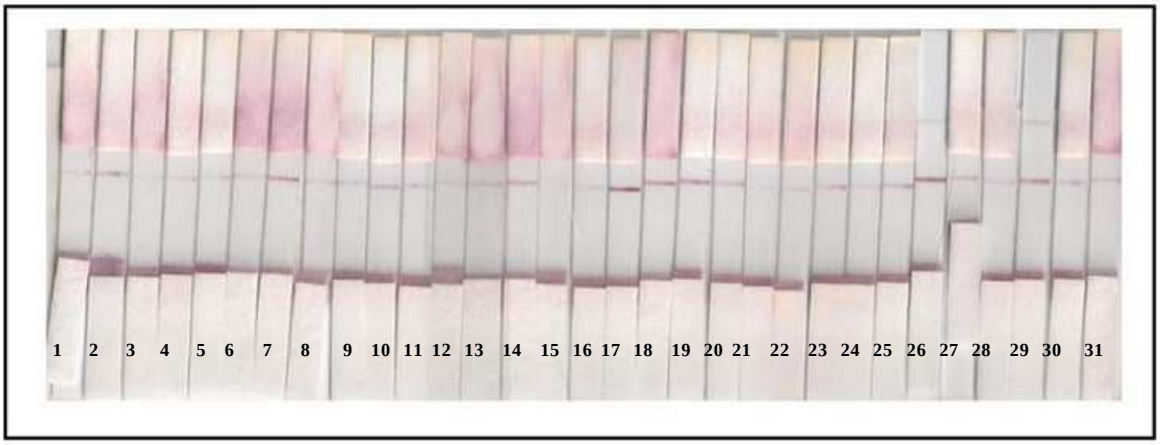
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína A; proteína recombinante LipL32 2mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro bovino diluído 1:10. Amostras: 1 a 50: soros bovinos reagentes para leptospirose; 51-54) soros bovinos não reagentes para leptospirose.

Na figura 67 e 68 é possível observar o teste em amostras reagentes e não reagentes de equinos e cães respectivamente. Assim como com os soros bovinos, o teste foi validado, a linha controle acendeu, porém a linha teste não reagiu.

Figura 67 - Teste imunocromatográfico tipo III com soros equinos em plataforma diagnóstica

Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína A; proteína recombinante LipL32 2mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro eqüino diluído 1:10. Amostras: 1 a 7: soros equinos reagentes para leptospirose; 8) soros equino não reagente para leptospirose.

Figura 68 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro de cães em plataforma diagnóstica

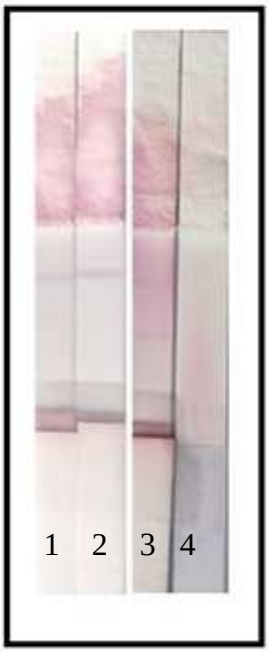


Fonte: Gotti (2015)

Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína A; proteína recombinante LipL32 2mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro de cão diluído 1:10. Amostras: 1 a 29: soros de cães reagentes para leptospirose; 30-31) soros de cães não reagentes para leptospirose.

Com as amostras de coelho, figura 69, foi possível observar ambas as linhas, a linha controle acendeu e a linha teste apareceu bem fraca. A vantagem de se usar este modelo tipo III é que esta configuração de teste, quando devidamente padronizada, é um modelo universal, não necessitando de anticorpos espécies específicos na sua montagem, podendo ser aplicado em diferentes espécies animais.

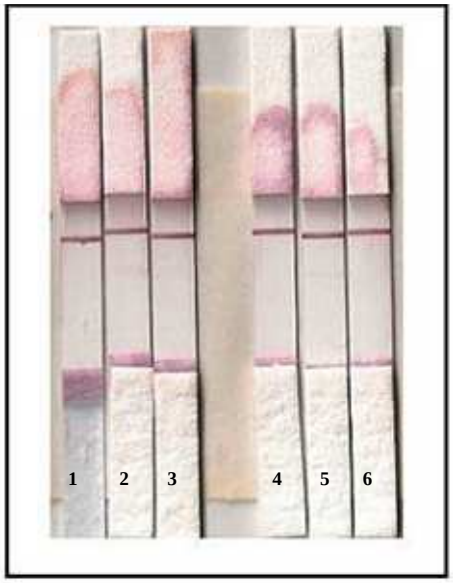
Figura 69 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro de coelhos em plataforma diagnóstica



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína A; proteína recombinante LipL32 2mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro de coelho diluído 1:10. Amostras: 1 a 3 soros hipeirmune de coelhos; 4) soros pré-imune de coelho.

É possível observar na figura 70 as amostras reagentes e não reagentes de hamster para leptospirose. A linha teste acendeu fracamente em duas amostras. O teste foi validado pois a linha controle acendeu, porém necessita de novas padronizações para o uso deste teste nesta plataforma imunocromatográfica.

Figura 70 - Teste imunocromatográfico tipo III com soro de hamsters em plataforma diagnóstica



Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Conjugado: ouro coloidal com a proteína A; proteína recombinante LipL32 2mg/ml na linha teste dialisado em tampão fosfato 10 mM com 5% sacarose; 2 mg/ml de anticorpo anti-IgG coelho na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 100 µl da amostra de soro de hamster diluído 1:10. Amostras: 1 a 6: soros de hamster reagentes para leptospirose; 6) soro de hamster não reagentes para leptospirose.

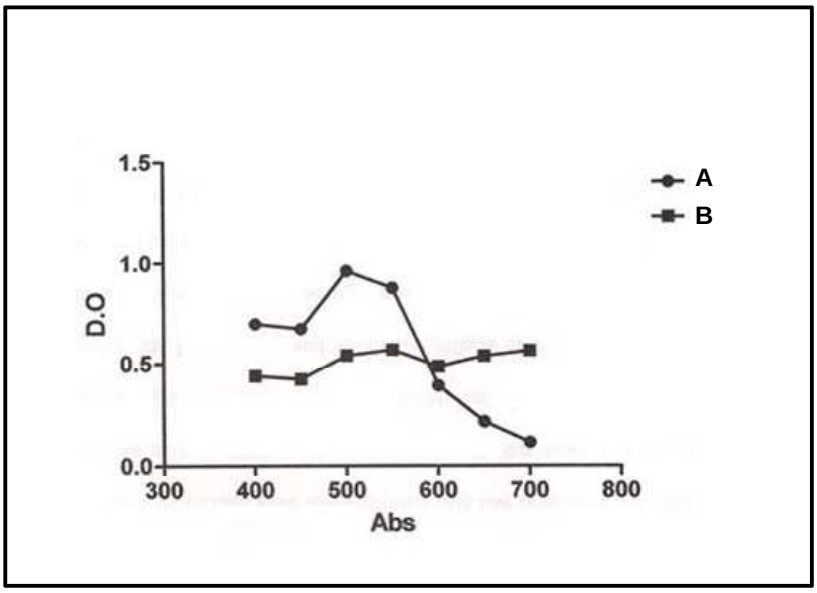
4.8 PRODUÇÃO DO OURO COLOIDAL

A produção do ouro coloidal *in house* foi realizada com o objetivo de eliminar as contaminações presentes na amostra comercial que interferem com o teste imunocromatográfico. Dois lotes de soluções de ouro coloidal foram produzidos, utilizando-se um controle rígido das variáveis, como agitação, limpeza dos frascos e temperatura, pois qualquer interferência durante a preparação pode alterar a uniformidade, tamanho e forma das partículas. No processo de produção à medida que a temperatura da solução aumenta vai ocorrendo à nucleação das partículas de ouro e a coloração inicialmente amarela clara vai se modificando para vermelho escuro, dependendo do tipo de nucleação e tamanho da partícula. A análise da dispersão das partículas de ouro foi realizada através da leitura da absorbância entre os comprimentos de 400-700 nm. Preparações do ouro de melhor qualidade e mais estáveis foram observadas no lote (A), que apresentou um pico de absorção no comprimento

de onda de 522 nm, enquanto o outro lote (B), que possui partículas instáveis, não mostrou um pico definido em nenhum comprimento de onda avaliado, como mostra a figura 71.

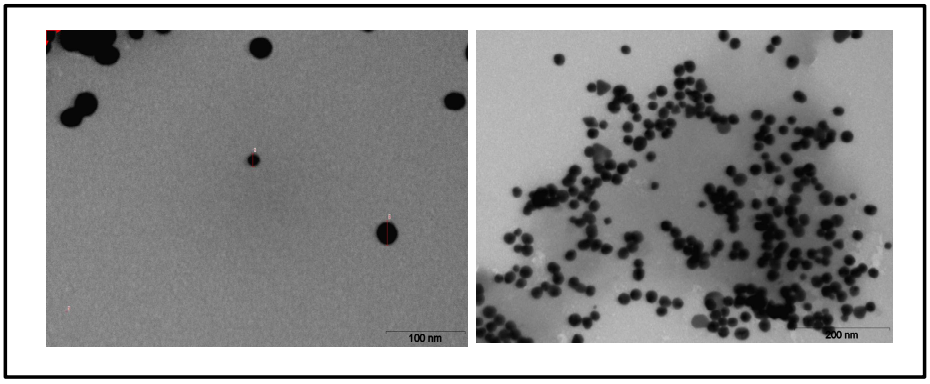
A microscopia de transmissão foi utilizada na avaliação da qualidade das partículas de ouro coloidal presentes nas soluções preparadas. Na figura 72, estão as fotografias obtidas da microscopia realizada com a solução mais estável (solução A), observadas no aumento de 10.000 vezes. A figura 73 apresenta as fotografias obtidas com a solução B, como partículas menos estáveis e menos homogêneas. É possível observar as partículas como pontos elétron-densos negros de tamanho e forma mais homogêneos na preparação A. Como referência foi utilizada a partícula de ouro comercial da BBI 20nm, figura 74.

Figura 71 - Espectro de absorção da luz visível nas soluções de ouro



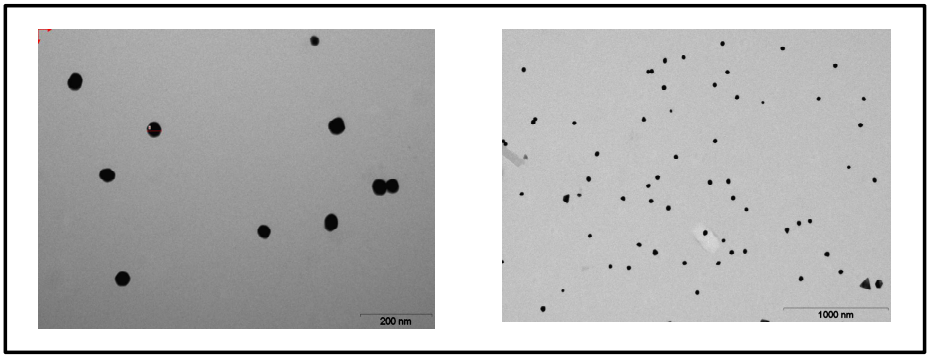
Fonte: Gotti (2015)
Legenda: Espectro de absorção de luz visível das soluções de ouro. Solução A: partículas mais estáveis, comprimento de onda maior e definido; B: partículas mais instáveis, com menor pico.

Figura 72 - Aspecto das partículas de ouro coloidal por microscopia eletrônica de transmissão da solução A: partículas mais homogêneas



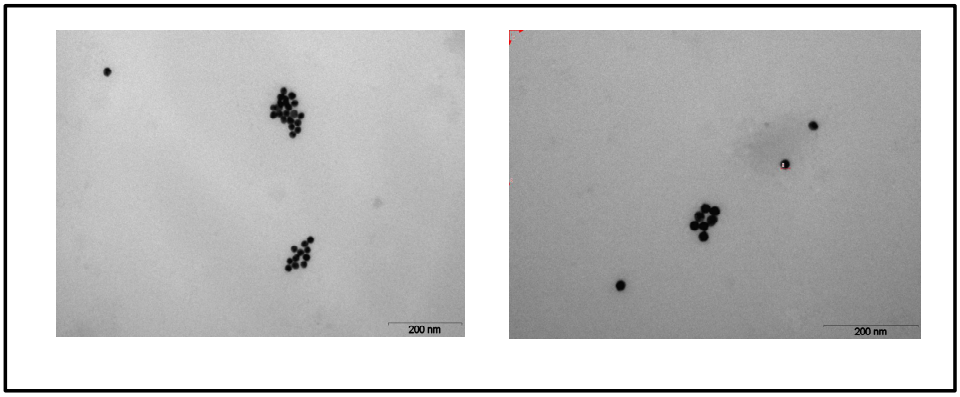
Fonte: Gotti (2015)

Figura 73 - Aspecto das partículas de ouro coloidal por microscopia eletrônica de transmissão da solução B: partículas mais heterogêneas



Fonte: Gotti (2015)

Figura 74 - Aspecto das partículas de ouro coloidal comercial da BBI 20nm por microscopia eletrônica de transmissão



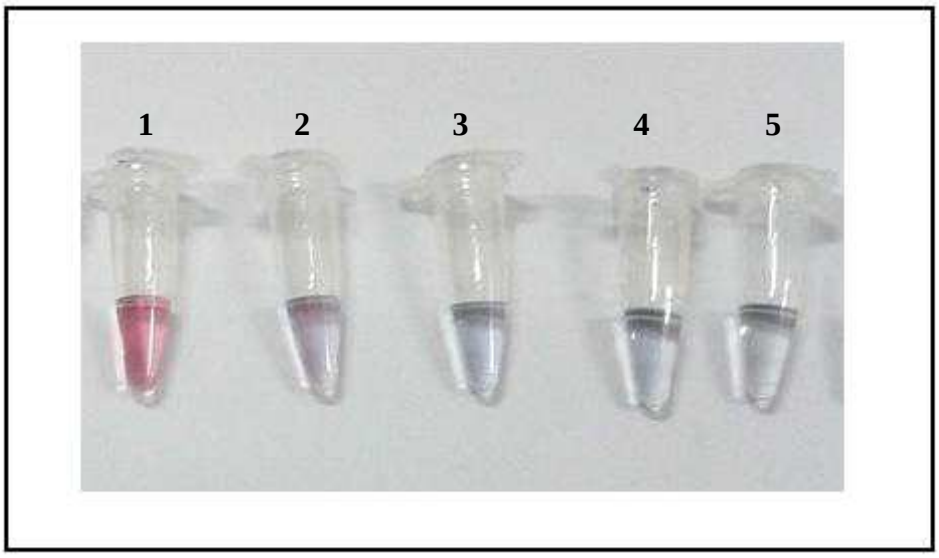
Fonte: Gotti (2015)

4.8.1 Conjugação do ouro coloidal *in house* com a proteína recombinante LipL32

Para a avaliação do ouro coloidal produzido *in house*, foi realizada sua conjugação com a proteína recombinante LipL32. O modelo de configuração testado foi o modelo tipo I com soro de coelho hiperimune.

Na conjugação, a quantidade de proteína recombinante utilizada foi a suficiente para estabilizar o ouro, ou seja, a concentração na qual a solução não sofreu alteração de cor, como observado na figura 75. O ouro foi estabilizado com 3,2 μg de antígeno para cada 100 μL da solução, ou seja, 30,2 μg/ mL de ouro. As concentrações do antígeno menores que 3,2 μg não foram capazes de estabilizar a solução. O volume do antígeno conjugado ao ouro utilizado inicialmente foi de 20 μL.

Figura 75 - Concentração de proteína recombinante necessária para estabilizar o ouro coloidal

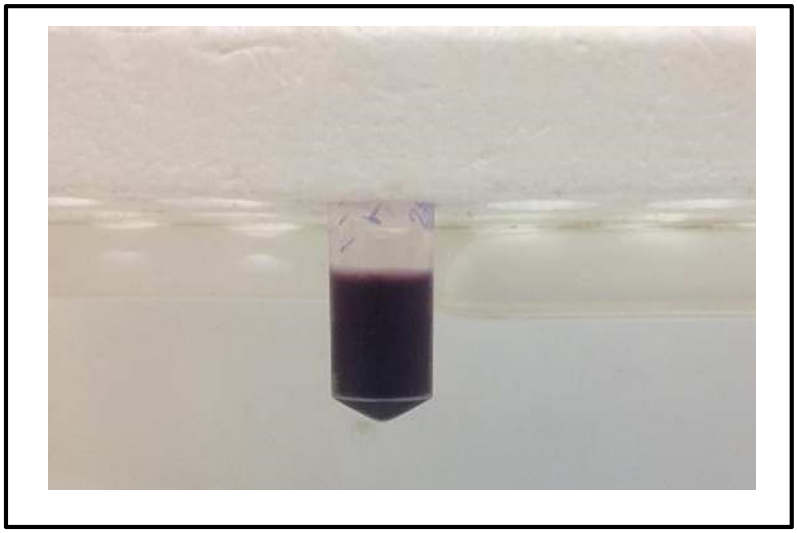


Fonte: Gotti (2015)
Legenda: 100 μL de ouro coloidal 0,01% foi acrescido de 10 μL de diferentes concentrações de LipL32: **1)** 3,2 μg; **2)** 1,6 μg; **3)** 0,8 μg; **4)** 0,4 μg; **5)** 0,2 μg. Após 10 minutos as soluções foram acrescidas de 11 μL de NaCl 10% e a leitura dos resultados realizada visualmente.

A conjugação foi estabilizada com 1% BSA e a solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 2% BSA e centrifugado. Este sedimento foi ressuspendido em tampão de armazenamento e mantido a 4º C até o momento do uso, conforme figura 76. Esta conjugação foi bem sucedida, mostrando as mesmas

características de coloração (vermelho intensa), estabilidade e conjugação, quando comparada ao ouro coloidal comercial, podendo assim ser aplicada no teste imunocromatográfico.

Figura 76 - Conjugação do ouro coloidal 20 nm *in house* com a proteína LipL32



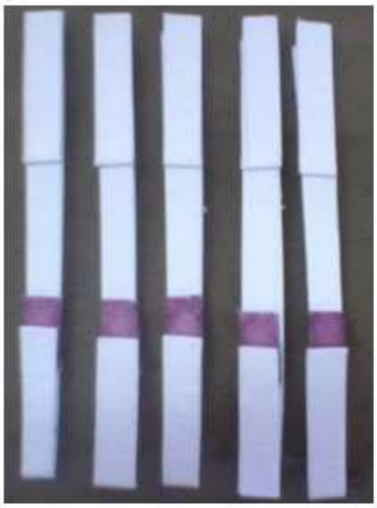
Fonte: Gotti (2015)

4.8.2 Teste Imunocromatográfico modelo tipo I com soro de coelho hiperimune utilizando o conjugado com ouro coloidal *in house*

Após a produção do ouro coloidal e sua conjugação com a proteína recombinante LipL32, foi realizado teste imunocromatográfico modelo tipo I com soro de coelho hiperimune para avaliar a conjugação realizada em questão.

Para isso, a solução da proteína recombinante LipL32 conjugada ao ouro coloidal produzido *in house*, foi aplicada na fibra de vidro (*conjugate pad*). Foi realizado o bloqueio na porção *Sample pad*, utilizando o tampão *pad* tween. No papel de *Nitrocellulose HiFlow Plus* foi aplicada a solução contendo anticorpo anti-IgG Coelho (Sigma) na linha teste, ao lado do controle interno, o anticorpo anti-LipL32. Em seguida, secagem foi realizada em dessecador a vácuo *over nigh* e os papéis foram sobrepostos em uma base plástica e fixados com auxílio de fita adesiva para a montagem do teste como apresentado na figura 77.

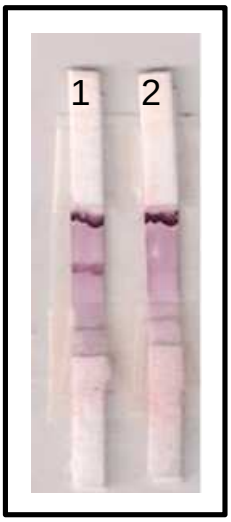
Figura 77 - Fitas de *dipstick* montada após tratamento dos papéis



Fonte: Gotti (2015)

Para a realização do teste, a porção final (*sample pad)* da fita foi colocada em contato com 300 µl de soro diluído 1:10 em PBS e com o tempo de incubação de 20 minutos. A proteína LipL32 conjugada ao ouro produzida *in house* foi aplicada na fibra de vidro; o anticorpo anti-LipL32 feito em coelho aplicado na linha controle e o anticorpo anti-IgG Coelho (2mg/ml) na linha teste. Como amostra reagente para leptospirose foi utilizado soro hiperimune de coelho anti-Hardjobovis e o soro pré-imune como amostra não reagente. Conforme apresentado na figura 78, é possível observar que o teste funcionou, pois a banda avermelhada foi detectada na linha controle, tanto com a amostra de soro negativa quanto positiva e na linha teste com o soro positivo. Estes resultados demonstraram que o ouro coloidal produzido *in house* foi eficiente para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico, podendo ser utilizado na confecção do teste.

Figura 78 - Teste imunocromatográfico modelo tipo I com soro de coelho hiperimune utilizando como conjugado o ouro coloidal produzido *in house*



Fonte: Gotti (2015)

Legenda: anticorpo anti-IgG de coelho 2 mg/ml na linha teste; 2 mg de anticorpo anti-LipL32 na linha controle. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 minutos em 300 µl da amostra de soro diluída 1:10. 1) soro de coelho hiperimune anti-Hardjobovis; 2) soro de coelho pré-imune

5 DISCUSSÃO

O controle das doenças infecciosas, na maioria das vezes, depende de testes diagnósticos com alta especificidade, sensibilidade e praticidade (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007). A disponibilidade de um teste laboratorial adequado para o diagnóstico da leptospirose continua sendo uma barreira para a detecção desta doença e para sua vigilância epidemiológica (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Portanto, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais simples, rápidos e eficientes para a leptospirose se faz necessário.

O diagnóstico da leptospirose é baseado em exames laboratoriais diretos e indiretos. Os testes padrão-ouro são o isolamento e a soroaglutinação microscópica (SAM). A soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste de referência para diagnóstico sorológico e para classificação de leptospiras em sorovares e sorogrupos como preconiza a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1967). Os inconvenientes para este teste são a necessidade de uma infraestrutura laboratorial e a manutenção de repiques das culturas vivas, o que gera a necessidade de mão-de-obra técnica, além de submeter o operador a riscos de contaminação (VASCONCELLOS, 1979; GENOVEZ; YASUDA, 1988).

A caracterização e a identificação da *Leptospira sp.*, presente em rebanho bovino infectado, são passos de grande importância no diagnóstico, na implementação de programas de vacinação adequados e na eficácia das vacinas. A inclusão de sorovariedades realmente presentes nas vacinas utilizadas poderá induzir uma imunidade mais efetiva no rebanho, que promoverão consequentemente, o controle da doença e aumento nos índices de produtividade animal (ELLIS, 1984; MOREIRA, 2004; MINEIRO et al., 2007).

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico utilizando a proteína recombinante LipL32 como diagnóstico da leptospirose é um caminho promissor.

As onze proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho, como modelo de antígeno, foram selecionadas através de análise *in silico* a partir do banco de dados de lipoproteínas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni construído por Setubal et al. (2006). O programa PSORT (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html) foi utilizado para predizer a localização celular destas lipoproteínas na bactéria (BARBOSA et al., 2010).

As proteínas de membrana da *Leptospira* podem ser consideradas antígenos altamente conservados e estáveis e por isso há interesse nesses antígenos para o desenvolvimento de

testes de diagnóstico sorológicos para a leptospirose (HAAKE; MATSUNAGA, 2002). Proteínas de membrana externa como OmpL1, HbpA, LipL 21, LipL36, LipL41, Loa 22, Lig A, Lig B, MPL17, tem sido utilizadas em diferentes métodos diagnósticos como ELISA, PCR, aglutinação em látex, *dipstick*, dot blot, imunoblot O teste de ELISA IgG com LipL32 tem mostrado maior sensibilidade e especificidade quando comparado com a SAM (CHALAYON, 2011).

Métodos sorológicos que utilizam proteínas recombinantes como antígenos podem possibilitar maior sensibilidade e especificidade ao teste devido à maior concentração de antígenos imunoreativos e à ausência de sítios inespecíficos.

Neves et al. (2007) analisaram quatro genes de membrana externa, Lp30 (LIC12880), Lp49, (LIC10793), Lp29 (LIC12892), Lsa24 (LIC12906) e relataram que anticorpos contra as proteínas Lp29 e Lp49 foram detectados para fase inicial da doença indicando seu uso para a fase aguda da leptospirose. Croda et al. (2008) também detectou em soro humano, uma alta sensibilidade (92%) e especificidade (90%) de anticorpos anti-Lig B por ELISA, durante a fase inicial da doença, sugerindo este ser um marcado especifico para fase aguda. Em animais, alta sensibilidade e especificidade também foi encontrada por ELISA IgG (SUBATHRA; SENTHILKUMAR; RAMADASS, 2013) em soro de cães com a OMPL1.

A proteína recombinante LipL32 foi identificada anteriormente ao sequenciamento dos genomas de *Leptospira* (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004; BULACH et al., 2006) por Haake et al. (2000). E, até pouco tempo, era considerada uma das principais proteínas de membrana externa. Mas recentemente, Pinne e Haake (2013) relataram que a LipL32 não é uma proteína de membrana externa, e que seria uma lipoproteína de subsuperfície de *L. interrogans*, cuja expressão é restrita às espécies patogênicas (BISWAS et al., 2005). Picardeau et al. (2008), através do sequenciamento do genoma da espécie *L. biflexa* sorovar Patoc demonstrou a ausência do gene ortólogo para LipL32. Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro à LipL32 é bastante intensa. Sendo assim, a LipL32 se tornou um alvo importante pra o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. Essas características sugerem que a LipL32 seja adequada ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE et al., 2000; FLANNERY et al., 2001).

O teste imunocromatográfico é aplicado para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas. Suas características positivas como resultado rápido, ausência de equipamentos, pessoal especializado, baixo custo e boa reprodutibilidade fazem este método ser bastante vantajoso (MILLIPORE, 2008).

O principal objetivo deste teste é conseguir o máximo de reconhecimento do anticorpo. Este deve ter boa especificidade e sensibilidade e reatividade após de adsorvido e após contato com a amostra, não devendo ocorrer alterações quanto sua natureza e ser reativo no momento do teste.

No caso do diagnóstico da leptospirose humana, tem-se no mercado um teste imunocromatográfico disponível. Porém este teste é feito com lisado total de bactéria de *Leptospira* sorovar Patoc, no qual, além de ser uma variante sorológica saprófita, apresenta reatividade cruzada, com baixa sensibilidade diagnóstica (SMITS et al., 1999; GUSSENHOVEN et al., 1997).

Para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico foram testados três modelos de configuração do teste, aqui definidos, como: modelo tipo I, II e III.

O ouro coloidal como reagente de detecção foi utilizado para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico, pois possui características físicas químicas ideais para este fim. É o mais estável quando comparado a outros marcadores, como enzimas e corantes fluorescentes, sendo menos susceptível à agregação durante a preparação do teste e também por possuir melhor mobilidade nos poros da membrana de nitrocelulose quando comparado a outros marcadores (SHYU et al., 2002; CARNEY et al., 2006).

Por volta de 1980 as partículas de ouro coloidal foram introduzidas em testes rápidos e por causa da superior estabilidade, sensibilidade, precisão e reprodutibilidade as partículas de ouro são idéias para uso nestes ensaios (CHANDLER; GURMIN; ROBINSON, 2000). Usado amplamente ele pode se ligar a várias moléculas com afinidades particulares e características diferentes (BENDAYAN, 2000).

Uma característica desse sistema é a dependência do pH no processo de conjugação. O ouro coloidal é uma solução liofóbica carregada negativamente. A superfície da partícula, não só possui característica eletrostática, como também propriedades hidrofóbicas. Na conjugação do ouro coloidal com proteínas, as interações eletrostáticas devem ser reduzidas de modo a que as interações hidrofóbicas possam prevalecer. Isto é conseguido através do ajuste do pH da solução de ouro coloidal para aproximadamente 0,5 unidade de pH superior ao pI da proteína a ser conjugada. Uma vez que o pH está adequadamente ajustado, a carga líquida da proteína é zero ou ligeiramente negativa. Isto previne a agregação da proteína, devido à atração eletrostática mantendo ao mesmo tempo as interações hidrofóbicas e facilitando a conjugação da proteína com o ouro (OLIVER, 2010).

O primeiro modelo da configuração do ensaio imunocromatográfico testado foi o modelo tipo I, onde o ouro coloidal foi conjugado à proteína recombinante LipL32. Este

modelo destina-se à detecção de anticorpos pela captura dos anticorpos presentes na amostra de soro que se ligam às partículas de ouro coloidal revestidas com antígenos e foi validado para amostras bovinas e soros de coelho. Este apresentou ser um modelo adequado para o desenvolvimento do teste. A limitação de modelo tipo I foi a baixa sensibilidade. Foi possível aumentar a um pouco a sensibilidade do teste, através do uso da sacarose. A adsorção do reagente da linha teste com a presença de sacarose foi fundamental para melhor desempenho do teste, pois a sacarose permite que a amostra dissolva os reagentes secos na área do conjugado instantaneamente, além de manter os reagentes reativos biologicamente (MILLIPORE, 2000).

O ouro utilizado nesta conjugação foi o de 20 nm. Baseados em estudos realizados, as nanopartículas entre 20 e 40 nm são as melhores neste tipo de ensaio, pois as partículas pequenas resultam em coloração clara e as partículas muito grandes são instáveis (LOU et al., 2012).

A concentração de anticorpos necessários para que ocorra a estabilização do ouro coloidal diferencia-se de acordo com cada molécula em questão (antígeno ou anticorpo) e o tamanho da partícula de ouro utilizada (LOU et al., 2012). A falta ou excesso de antígenos desestabilizam as partículas de ouro. Desta maneira determinou-se a concentração mínima de proteína LipL32 necessária para estabilização do ouro coloidal, sendo que, nesta configuração de teste, a concentração ideal de proteína LipL32 foi 30,2 μg para cada mL de ouro coloidal.

Ainda neste processo de conjugação, as etapas de bloqueio, centrifugação e armazenamento são de extrema importância. É preciso realizar o bloqueio, pois após a ligação com o anticorpo ou antígeno, superfícies residuais de ouro coloidal podem sofrer interações entre as partículas e a matriz sólida e entre as próprias partículas. Diversas substâncias usadas podem gerar variações no ambiente químico, causando assim reações inespecíficas no ouro coloidal (PAEK; LEE; CHO, 2000). Os agentes de bloqueios mais comumente aplicados são o polietilenoglicol e a albumina bovina (MILLIPORE, 2008).

As etapas de lavagens por centrifugação e de bloqueio são igualmente importantes para eliminação de anticorpos não ligados para que não venham a interferir na interação entre o conjugado e os anticorpos de detecção e captura durante o ensaio. Ao final da lavagem o conjugado (antígeno e ouro) deve ser acrescido de tampão de armazenamento contendo albumina e sacarose. Os anticorpos podem sofrer mudanças conformacionais estruturais durante o período de desidratação e estocagem; que podem ser prevenidas pela presença de agentes estabilizadores, como a albumina bovina (PAEK; LEE; CHO, 2000). Alguns autores indicam que a membrana de vidro também deve ser igualmente bloqueada antes do conjugado

ser aplicado (MIKAWA, 2006), porém optou-se por não bloquear, baseado em estudo que relatam quando o tratamento é realizado a reação muitas vezes não ocorria ou a intensidade do sinal era muito fraca (MIORANZA, 2009).

Para garantir uma fluidez por capilaridade da amostra a definição do comprimento da tira reagente é importante. Trabalhos realizados demonstram variações de tamanho entre 2,0 a 3,0 cm de comprimento X 0,5 cm de largura (CHUANLAI et al., 2006; MIKAWA, 2006). O tamanho definido foi de 2,0 cm de comprimento X 0,5 de largura.

Em referência ao tratamento dos diferentes papéis que compõem o ensaio em grande parte dos testes imunocromatográficos, a realização do bloqueio da membrana não é essencial, devido às proteínas estranhas presentes na amostra ou nos agentes de bloqueios adicionados no *sample pad* são suficientes para prevenir o reagente detector e analito da não especificidade da nitrocelulose (MILLIPORE, 2008), não necessitando assim realizar o bloqueio na porção *absorbing pad.*

O melhor resultado foi a utilização do bloqueio na porção *sample pad*, visando diminuir as reações inespecíficas e aumentar a especificidade do teste. O melhor tampão foi o tampão *pad* com Tween (20mM Borato de sódio; 0,05% de azida de sódio e 3% Tween 20). A amostra correu mais uniformemente pela tira de nitrocelulose e com velocidade maior.

Para a padronização do teste, a aplicação dos reagentes de detecção foi realizada manualmente com uma pipeta automática. Estes adsorventes podem ser colocados na membrana de nitrocelulose de várias maneiras, tanto manualmente quanto com dispensadores automáticos de ar a jato específicos para este fim, muito utilizados em escala industrial (LIU et al., 2007). Em um segundo momento, estes reagentes foram colocados de forma automatizada em uma plataforma diagnóstica, para pode avaliar a utilização do teste em grande número de amostras.

Após a montagem da fita imunocromatográfica pela sobreposição das membranas, a tira absorvente é colocada em contato com a solução contendo a amostra que dissolve o conjugado e a reação imune entre o analito e o conjugado acontece.

Outros ensaios realizados com a LipL32 tem mostrado resultados satisfatórios. Dey et al. (2007) realizaram um teste rápido em látex (LAT) com a proteína LipL32, para detectar anticorpos específicos para humanos e cães. O teste mostrou uma sensibilidade e especificidade 98,07% e 96% para cães e 93,93% e 96,72% para humanos, confirmando que a LipL32 pode ser um bom candidato a antígeno para uso em diagnóstico. Resultados semelhantes foram apresentados, comparados com o MAT, por Brownlow et al. (2013), onde foi realizado a validação de um teste intitulado *"Leptorapide"* (teste de aglutinação em látex)

no diagnóstico da leptospirose humana. Thaipadungpanit et al. (2011) realizaram PCR em tempo real com os genes rRNA e LipL32 para diagnóstico em humanos da leptospirose e notou alta detecção de leptospiras nas primeiras semanas dos sintomas da doença. Este resultado foi confirmado por Stoddard et al. (2009) que realizaram em pacientes humanos PCR em tempo real com o gene que codifica a proteína LipL 32 e verificou alta sensibilidade do teste e especificidade na fase aguda da infeção.

Para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico no modelo tipo III a conjugação do ouro coloidal foi realizada tanto com anticorpo anti-IgG Bovino feito em coelho *in house,* quanto com proteína A. Este modelo destina-se à detecção de anticorpos pela captura dos mesmos presentes na amostra de soro que se ligam às partículas de ouro coloidal revestidas com antígenos. O melhor resultado obtido na conjugação foi utilizando a proteína A. A escolha da utilização da proteína A na linha teste foi devido a sua natureza não enzimática e sua propriedade de se ligar as frações Fc da imunoglobulina (YANG et al., 2007). Ela tem sido usada há algum tempo para o desenvolvimento de testes imunocromatográficos, tanto como partícula de captura conjugada ao ouro coloidal como na linha teste para a captura de anticorpos no soro (HUANG, 2006).

O modelo tipo III foi testado em soros de coelhos, bovinos, equinos e cães de animais não reagentes e reagentes para leptospirose. Foi possível detectar os anticorpos na amostra. Sendo este modelo outra opção de confecção do teste. A vantagem de se utilizar este modelo, com a conjugação do ouro coloidal a proteína A, é a utilização dos mesmos reagentes para qualquer amostra de soro. Na linha teste utiliza-se a proteína LipL32 e na linha controle o anticorpo anti-IgG coelho. Sua aplicação universal faz deste modelo uma boa escolha para fabricação do teste imunocromatográfico.

Apesar de não ser o foco inicial do trabalho, foi realizado um novo modelo para detecção de antígeno. O ouro coloidal foi conjugado com anticorpo anti-LipL32. Este modelo mostrou alguns resultados satisfatórios, porém necessitando o aprimoramento através da utilização de membranas de nitrocelulose mais específicas para detecção de antígeno e novas padronizações.

Na tentativa de se aumentar a sensibilidade do teste também foi testado a utilização de microesferas Estapor ® conjugadas com a proteína recombinante LipL32. Foram realizados alguns testes, porém com baixa detecção.

Foram realizados ensaios na plataforma diagnóstica automatizada para avaliação do teste em grande número de amostras. Foi realizado o modelo tipo I em amostras bovina e o modelo tipo III em amostras de soros bovinos, equinos, de coelho e cães. O único teste que

mostrou satisfatório, porém com sinal fraco, foi quando utilizado com soro de coelho. Para aplicação deste modelo de teste em grande escala, necessita-se de nova padronização de todos os reagentes.

O teste imunocromatográfico quando devidamente padronizado, é um teste simples, de baixo custo e fácil execução, mostrando ser uma promissora ferramenta na triagem do diagnóstico da leptospirose. Até o momento, nenhum estudo avaliou a LipL32 como antígeno em um teste imunocromatográfico para o diagnóstico da leptospirose. Este estudo, portanto, é inédito e de grande potencial aplicado.

Quadro 6 - Resumo dos resultados obtidos neste trabalho

.

	TIPO I	TIPO II	TIPO III	Detecção de antígeno
Conjugado	Ouro coloidal + LipL32	Ouro coloidal + LipL32	Ouro coloidal + Prot. A	Ouro coloidal + Anti-LipL32
Linha teste	Anti-IgG (espécie animal)	LipL32	LipL32	Anti-LipL32
Linha controle	Anti-LipL32	Anti-LipL32	Anti-IgG coelho	Anti-IgG coelho
Tratamento da fibra de vidro	Não	Não	Não	Não
Tratamento sample pad	Sim	Sim	Sim	Sim
Tamanho da Fita hiflow	HF 240	HF 240	HF 240	HF 240
Linha teste dialisada com 5 % de sacarose	Sim	X	Sim	X
Secagem em dessecador a vácuo	Sim	X	Sim	X
Período de secagem	*Overnight*	X	*Overnight*	X
Diluição do soro teste	1:10	X	1:10	X
Tampões escolhidos (1,2,3 , 4 e PBS)	1	X	1	X
Amostras de soro que reagiram	Coelho e bovino	X	Coelho, bovino, equino e cão	X
Teste realizado em plataforma diagnóstica	Sim	Não	Sim	Não
Amostras que reagiram na plataforma	Nenhuma	X	Coelho	X

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste manuscrito estão resumidos no quadro 6 e demonstraram que:

- A proteína recombinante LipL32 foi a proteína que mostrou maior reatividade com os soros de animais (bovino, hamster, coelho, cão e equino) reagentes para leptospirose nos ensaios de *Western blotting* e ELISA. Estes resultados indicam que esta proteína é a mais adequada para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico dentre as proteínas recombinantes testadas.

- O teste imunocromatográfico no modelo tipo I, onde o ouro coloidal de 20 nm foi conjugado com a LipL32, utilizando o anticorpo da linha teste dialisado e com 5% sacarose mostrou-se satisfatório utilizando soros hiperimunes de coelho e soros bovinos.

- O teste imunocromatográfico no modelo para detecção de antígeno, onde o ouro coloidal de 20 nm foi conjugado com o anti-LipL32, mostrou-se satisfatório utilizando a urina infectada com leptospira.

- O teste imunocromatográfico no modelo Tipo III, onde o ouro coloidal de 20 nm foi conjugado com a proteína A, utilizando a LipL32 na linha teste dialisada e com 5% sacarose mostrou-se satisfatório utilizando soros de bovinos, equinos, cães, coelhos. Mostrou ser possível de utilização em diversas amostras de soros animais, tendo uma configuração universal do teste.

- O ouro coloidal produzido *in house* mostrou ser adequado no teste imunocromatográfico através da análise por microscopia eletrônica de transmissão.

- Não foi possível detectar anticorpos específicos para leptospirose em soros de bovinos, utilizando o teste imunocromatográfico, com a configuração do tipo I, em plataforma diagnóstica. Provavelmente, devido à necessidade de padronização de todos os parâmetros.

- Não foi possível detectar anticorpos específicos para leptospirose em soros de bovinos, equinos, cães e hamster, utilizando o teste imunocromatográfico, com a configuração do tipo

III, em plataforma diagnóstica. Provavelmente, devido à necessidade de padronização de todos os parâmetros.

- Foi possível detectar anticorpos específicos para leptospirose em soros hiperimunes de coelho, utilizando o teste imunocromatográfico do tipo III, em plataforma diagnóstica.

- Estes resultados preliminares demonstram que o teste imunocromatográfico do tipo *dipstick*, tanto para detecção de antígeno quanto anticorpo, com a proteína recombinante LipL32 como antígeno ou com anticorpo anti-LipL32, pode ser uma promissora técnica diagnóstica contra a leptospirose.

7 ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Cabe ressaltar que com objetivo de aprimoramento foram realizadas, atividades complementares, citadas abaixo:

❖ PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

✓ **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia (SBM)**

Local: Mendes Convention Center - Santos - S P - Brasil

Data: 28/10/12 à 01/11/2012

Apresentação: Pôster

a. Título do Trabalho: Desenvolvimento do vetor pLIPO para expressão de lipoproteínas de *Leptospira* spp. na superfície da *E. coli* **Autores:** Gotti, T.B., Monaris, D., Spadafora-Ferreira, M. , Moraes, Z.M., Vasconcellos, S.A., Barbosa, A.S., Abreu, P.A.E.

✓ **8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society - ILS 2013**

Local: Fukuoka/Japão

Data: 08/10/13 a 11/10/13

Apresentação: Pôster

Título do Trabalho: Cell display system for the expression of leptospiral lipoproteins on the surface of *E. coli.* **Authors:** Gotti, TB, Monaris D, Spadafora-Ferreira MS, Souza GO, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Abreu PAE

✓ **XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**

Local: Instituto Butantan / SP

Data: 04/12/2013 à 06/12/13

Apresentação: Pôster

Título do Trabalho: Cell display system for the expression of leptospiral lipoproteins on the surface of *E. coli.* **Authors:** Gotti, TB, Monaris D, Spadafora-Ferreira MS, Souza GO, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Abreu PAE

✓ **Kidney Week – American society of nephrology**

Local: Philadelphia, PA

Data: 11/11/2014 à 16/11/14

Apresentação: Pôster

Título do Trabalho: Lp25 Membrane Protein form pathogenic Leptospires is associated with rhabdomyolisis and oliguric acute kidney injury in Leptospirosis.

Authors: Seguro, AC.; Canale, D.; Abreu, PA.; Monaris, D.; Gotti, TB. ; Matos, LR.; Brito, T.; Magaldi, AJ.

❖ CURSOS E ATIVIDADES DE EXTENSÃO

✓ **Ciclo de Seminários Científicos do Laboratório de Bacteriologia do IBu**
Palestrante do seminário "Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)" **Local:** Instituto Butantan
Data: 06/06/2011 **Carga horária:** 1 hora

✓ **I simpósio interno da Pós Graduação em epidemiologia experimental aplicada às zoonoses.**
Local: Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia – FMVZ- Usp
Data: 05/11/2011

✓ **IV encontro sobre *Escherichia coli* patogênica "Luiz Rachid Trabulsi"**
Local: Instituto Butantan / SP **Data:** 05/08/2012

✓ **Ciclo de Seminários Científicos do Laboratório de Bacteriologia do IBu**
Palestrante do seminário "Leptospirosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein"
Local: Instituto Butantan,
Data: 06/08/2012 **Carga horária:** 1 hora

✓ **XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM)**
Local: Mendes Convention Center - Santos - S P - Brasil

Data: 28/10/12 à 01/11/2012

- ✓ **III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica (III SIMC)**
  Local: Mendes Convention Center - Santos - S P - Brasil
  Data: 28/10/12 à 01/11/2012

- ✓ **XIV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**
  Local: Instituto Butantan / SP
  Data: 05/12/2012 à 07/12/1
- ✓ "**Roadshow agilent Technologies: descobertas indo além da sequência"** realizado pelo USP – ICB II, oferecido pelo GE Healthcare Life Science e Agilent Genomics
  Local: Instituto de ciências biomédicas III
  Data: 17/04/13

- ✓ **II Curso de Biossegurança do Laboratório de Bacteriologia do IBu**
  Local: IBu - Instituto Butantan
  Período: 30/04/2013 – 07/08/2013 – 18/11/2013 **Carga horária:** 06 horas

- ✓ **Seminários promovidos pela GE Healthcare Life Science no instituto Adolfo Lutz**
  Local: Instituto Adolfo Lutz - **Carga horária:** 04 horas
  Data: 09/05/13

- ✓ **8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society - ILS 2013**
  Local: Fukuoka/Japão
  Data: 08/10/13 a 11/10/13

- ✓ **Workshop Uso e cuidados Éticos em Animais de Laboratório**
  Local: Instituto Butantan
  Data: 30/10/13

- ✓ **XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**
  Local: Instituto Butantan / SP
  Data: 04/12/2013 à 06/12/13

- ✓ "**Biologia de sistemas de doenças infecciosas e vacinas. Uma visão holística de nosso sistema imune"** pelo Programa de seminários s da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade
  de São Paulo.
  Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
  Data: 25/3/14

- ✓ **Curso de aperfeiçoamento sobre a técnica de imunocromatografia**
  Technical Seminar – Lateral Flow Test development: a hands-on experience
  Local: Londres
  Data: 03/06/2014

- ✓ **Avaliadora de relatório de aluno PIBIC/CNPQ**
  Local: Instituto Butantan / SP
  Data: 07/10/2014

- ✓ "**Método lógico para redação científica"**
  Local: Instituto Butantan / SP **Carga horária:** 08 horas
  Data: 20/10/2014

- ✓ **XVI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**
  Local: Instituto Butantan / SP
  Data: 01/12/2014 à 05/12/14

- ✓ **Treinamento interno- "Rótulos e procedimentos de segurança" e" Normas gerais sobre contenção de infectantes"**
- ✓ **Local:** IBu - Instituto Butantan
  Período: 05/05/2015 **Carga horária:** 02 horas

❖ **<u>DISCIPLINAS CURSADAS</u>**

- ✓ Recursos de Profilaxia Aplicados ao Controle e à Erradicação de Zoonoses. Situação Atual e Perspectivas (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP)
- ✓ Patogenicidade Bacteriana (Instituto de Ciência Biomédicas – USP)

- ✓ Técnicas Sorológicas e de Biologia Molecular no Diagnóstico de Agentes Infecciosos (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP)
- ✓ Procedimentos Especiais Aplicados ao Estudo da Etiologia das Zoonoses. I. Bactérias Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP)
- ✓ Estatística Aplicada à Biotecnologia (Pós-graduação Toxicologia – Instituto Butantan)

Créditos obtidos, totalizando 100% dos mínimos exigidos para depósito de tese.

❖ **Colaborações**

- ✓ **Trabalho realizado como colaboradora:** Trabalho feito em colaboração. Realização do Teste ELISA para confirmação dos resultados obtidos anteriormente por nosso grupo. Título do trabalho: Desenvolvimento do vetor pLIPO para expressão de lipoproteínas de *Leptospira* spp. na superfície da *E. coli.*

- ✓ **Trabalho realizado como colaboradora:** Trabalho feito em colaboração com Universidade de Medicina de São Paulo. Realização de teste de funcionalidade com a proteína recombinante LipL32 em cobaias.

❖ Possibilidade de registro de patente do teste diagnóstico imunocromatográfico para leptospirose animal.

REFERÊNCIAS

ABDO J.; KRISTERSSON, T.; SEITZER, U.; RENNEKER, S.; MERZA, M.; AHMED J. Development and laboratory evaluation of a lateral flow device (LFD) for the serodiagnosis of Theileria annulata infection. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1241–1248, 2010. DOI 10.1007/s00436-010-1994-8. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-010-1994-8>. Acesso em: 9 maio 2011.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and Leptospirosis. **Veterinary Microbioly**, v. 140, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum, anti-Brucella abortus e anti- Leptospira spp. em bovinos da zona rural do Município de Monte Negro, Rondônia**: estudo de possíveis fatores de risco. 2004. 120 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Immunochromatographic lateral flow test for detection of antibodies to Equine infectious anemia virus. **Journal of Virological Methods**, v. 167, p. 152–157, 2010.

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 45, n. 12, p. 875-891, 1975.

BABU, M. M.; SANKARAN, K. DOLOP- Database of bacterial lipoprotein. **Bioinformatics**, v. 18, p. 641-643, 2002.

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.

BALASSIANO, I. T.; VITAL-BRAZIL J. M.; PEREIRA M. M.; Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: A new tool for early diagnosis and epidemiology surveillance. Diagn. **Microbiology Infection Disease**, v. 74, p. 11-15, 2012.

BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of Leptospira spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.

BENDAYAN, M. A review of the potential ande versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 75, n. 5, p. 203-42, 2000.

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

BISWAS, D.; ROY, S.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; NARARAJASEENIVASAN, K.; SEHGAL, S. C. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of Leptospira in Andaman Islands, India. **Indian Journal Medical Research**, v. 121, p. 151-158, 2005.

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 89-94, 2005.

BOQVIST, S.; MONTGOMERY, J. M.; HURST, M.; THU, H. T. V.; OLSSON, E.; ENGVALL, E.; GUNNARSSON, A.; MAGNUSSON, U. Leptospira in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 361-368, 2003.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGER, F.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and servovars in the family Leptospiracea with a proposal for Leptospira alexanderi sp now and four new Leptospira genomospecies. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839-858, 1999.

BROWNLOW, T.; KAVANAGH, O. V.; LOGAN E. F.; HARTSKEERL, R. A.; SAVAGE R.; PALMER M. F.; KRAHL M.; MACKIE D. P.; ELLIS W. A. “Leptorapide” – a one-step assay for rapid diagnosis of human leptospirosis. **Epidemiology Infection,** v. 142, n. 6, p 1182-1187, 2013.

BULACH, D. M.; ZUERNER; R. WILSON, P., SEEMAN, T.; McGrath A.; CULLEN, P.; DAVIS, J.; ALT, D. V.; ROOD, J.; ADLER, B. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potencial. **PNAS**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BURNETTE, W. N. Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

CARNEY, J.; BRAVEN, H.; SEAL, J; AND WHITWORTH, E. present and future applications of gold in rapid assays. **IVD Technology**, v. 12, p. 41-49, 2006.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A. E.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC. L.; BARBOSA. A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins Interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal Infectious Diseases**, v. 205 p. 995-1004, 2012.

CASTRO, V. **Estudo da prevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil**. 2006, 104 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of Leptospira strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 760-768, 2009.

CHALAYON, P.;CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.; KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transaction Royal Society Troppical Medicine Hygiene**, v. 105, p. 289–97, 2011.

CHAMPAGNE, M. J.; HIGGINS, R.; FAIRBROTHER, J. M.; DUBREUIL, D. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. **Canadian Journal of Veterinary Research**, n. 55, p. 239-245, 1991.

CHANDLER, J.; GURMIN, T.; ROBINSON, N. The place gold in rapid tests**. IVD Technology Magazine**, v. 6, n. 2, p. 37-49, 2000. IVDT Article Index.

CHIRATHAWORN, C.; CHANTARAMALAI, T.; SEREEMASPUN, A.; KONGTHONG, NSUWANCHAROEN, D. Detection of Leptospira in urine using anti-Leptospira-coated gold nanoparticles. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 34. n. 1, p. 31–34, 2011.

CHUANLAI, X.; HUTING, W.; CHIFANG, P.; ZHENGYU, J.; LIQIANG, L. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 12, p. 1390-94, 2006.

CORREA, M. O. A.; VERONESI, R.; BRITO, T.; HYAKUTAKE, S.; SANTA ROSA, C. A.; EDELWEISS, E. L. Leptospiroses. In: VERONESI, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 573-589.

CÔRTES, J. A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** 1993. p. 53-57.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic Leptospira species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection Immunity**, v. 76, p. 5826–33, 2008.

DAHER, E. F.; BRUNETTA, D. M.; SILVA JÚNIOR, G. B.; PUSTER, R. A.; PATROCINIO, R. M. S. V. Pancreatic involvement in fatal human leptospirosis: clinical and histological features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 307-313, 2003.

DEY, S.; MOHAN, C. M.; RAMADASS, P.; NACHIMUTHU, K. Recombinant Antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of Leptospirosis. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 9-15, 2007.

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

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A. Effect of Leptospira interrogans serovar Hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 319-320, 1996a.

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A. Reduced conception rates in dairy cattle associated with sorological evidence of Leptospira interrogans serovar hardjo infection. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 110-114, 1996b.

ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 411-421, 1984.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982.171 p. (WHO off set publications, 67).

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 353, 1994.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999. p. 272.

FERNANDES, E. C. **Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela Leptospira spp. sorovar Hardjo**: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos. 2009. [78 p.]. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009.

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

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. P.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazialian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GENOVEZ, M. E. **Leptospirose**: uma doença além da época das chuvas. 2007. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/leptospirose/index.htm. 2007>. Acesso em: 9 maio 2011.

GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C.; CASTRO, V.; GOTTI, T. B.; DIB, C. C.; POZZI, R. C.; ARCARO, J. R. P.; MIYASHIRO, C.; NASSAR, A. F. C.; CIRRILO, S. L. Leptospirosis outbreak in dairy cattle due to Leptospira spp. serovar Canicola: reproductive rates and serological profile after treatment with streptomycin sulfate. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 4, p.389-393, 2006b.

GENOVEZ, M. E.; YASUDA, P. H. Avaliação da eficiência de estirpes de Leptospira biflexa no diagnóstico de triagem da leptospirose animal. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 399-405, 1988.

GENOVEZ, M. E.; CASTRO,V.; GREGORY, L.; DEL FAVA, C.; FERRARI,C. I. L.; LANÇA NETO, P.; SOUZA, M. R.; GOTTI, T.; OLIVEIRA, J. C. F.; PITUCO, E. M. Effetive of Leptospira spp. Serovar Hardjo infection reproduction of two beef nelore herds with different serological status. In: WORLD BUIATRIC CONGRESS, 24., 2006, Nice, FR. Nice, 2006a.

GOARANT, C.; BOURHY, P.; D'ORTENZIO, E.; DARTEVELLE, S.; MAURON, C.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; CHANTEAU, S. Sensitivity and Specificity of a New Vertical Flow Rapid Diagnostic Test for the Serodiagnosis of Human Leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis**., v. 7, n. 6, p. e2289, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002289. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002289>. Acesso em: 9 maio 2011.

GONÇALVES, C. A. **Zoonoses**. São Paulo: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. CATI, 1995. p. 121.

GOTTI, T. B. **Avaliação de três protocolos de associações antibióticas na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da Leptospira spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 35, p. 92-97, 1997.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infection Immunity**, v. 70, p. 4936–45, 2002.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J.; 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 Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–2285, 2000.

HANSON, L. E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1977.

HANSON, M. A.; TRIPATHY, D. N. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1988. p. 237.

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

HATHAWAY, S. C.; BLACKMORE, D. K.; MARSHALL, R. B. Leptospirosis in free-being species in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, p. 189-196, 1981.

HAUK, P.; GUZZO, C. R.; RAMOS, H. R.; HO, P. L.; FARAH, C. S. Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic Leptospira sp. **Journal Molecular Biology**, v. 24, p. 722–36, 2009.

HUANG, S. H.; Gold nanoparticle-based immunochromatografic test for identification of *Staplhylococcus aureus* from clinicl specimens. **Clinica Chimica Acta**, v. 373, p. 139-143, 2006.

JIN, Q.; YANG, J.; LU, Q.; GUO J.; DENG, R.; QANG, Y.; WANG, S.; WANG, S.; CHEN, W.; ZHI, Y.; WANG, L.; YANG, S.; ZHANG, G. Development of an immunochromatographic strip for the detection of antibodies against Porcine circovirus-2. **J VET Diagn Invest**., v. 24, n. 6, p. 1151, 2012. doi:10.1177/1040638712462374. Disponível em: < http://vdi.sagepub.com/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23051825>. Acesso em: 9 maio 2011.

JIN, Y.; JANG, J. W.; HAN, C. H.; LEE, M. H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7639-43, 2005.

KAZAMI, A.; WATANABE, H.; HAYASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OGAWA, Y.; YAMAMOTO, K.; ADACHI, Y. Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan . **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 8, p. 735-737, 2002.

KEE, S.; KIM, I.; CHOI, M.; CAANG, W. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptosira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reveiws Microbioloty**, v. 7, p. 736-747, 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, 2004.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

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

LIN, L. R.; FUA Z. G.; DANA, B.; JING, G .J.; TONGA, M.; CHEND, D. T.; YUE, Y.; ZHANGF, C. G.; YANGA, T. C.; ZHANGA, Z. Y. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to Treponema pallidum with TPN17 and TPN47. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 193–200, 2010.

LI, X.; WANG, L.; SHI, X.; ZHAO, D.; YANG, J.; YANG, S.; ZHANG, G. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of antibodies against classical swine fever virus. **Journal of Virological Methods**, v. 180, n. 1, p. 32-37, 2012.

LIU, L.; PENG, C.; JIN, Z.; XU, C. Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 8, p. 861-6, 2007.

LOU, S.; YE, J. Y.; LI, K. Q.; WU, A. A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: the influence of nanoparticulate size. **Analyst**, v. 137, p. 1174-1181, 2012.

MAGAJEVSKI, F. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de Leptospira interrogans sorovar hardjo em sêmen e urina de touros (Bos taurus) sorologicamente reagentes**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

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.

McKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **Journal Immunological Methods**, v. 96, n. 2, p. 271-278, 1987.

MIKAWA, A. Y. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C**. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em análises clínicas, Imunologia Clínica) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, 2006.

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips**: considerations for product. Billerica, 2008. 39 p.

MINEIRO, A. L. B. B.; VASCONCELLOS, S. A.; BEZERRA, E. E. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N. A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

MIORANZA , S. L. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG anti-Toxoplasma Gondii**. 2009. 220 f. Tese. (Doutorado em Ciências , Biologia da relação patógeno-hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

MOREIRA, E. C. Leptospirose: difícil erradicação. **Cultivar Bov**., v. 10, p. 25-28, 2004.

MOREIRA, E. C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospirose em bovinos leiteiros**. 1994, 94 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MURRAY, C. K.; GASSER JR., R. A.; MAGILL, A. J.; MILLER, R. S. Update on rapide diagnostic testing for malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 97-110, 2008.

NABITY, S. A.; RIBEIRO, G. S.; AQUINO, C. L.; TAKAHASHI, D.; DAMIÃO, A. O.; GONÇALVES, A. H. O.; MIRANDA, D. B.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.;

LYASHCHENKO, K. P.; REIS, M. G.; MEDEIROS, M. A.; KO, A. I. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of human Leptospirosis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1878, 2012.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. & 43 COLABORADORES. Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-72, 2004a.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.. DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004b.

NEVES, F. O.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Archives Microbiology**, v. 188, p. 523–32, 2007.

NIELSEN, K.; YU, W. L.; KELLY, L.; BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T.; DAJER, A.; TORIONI DE ESCHAIDE, S. Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to Anaplasma marginale. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2007.

OLIVER, C. Immunocytochemical methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 588, p. 369-373, 2010.

PAEK, S. H.; LEE, S. H.; CHO, J. H. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, v. 22, p. 53-60, 2000.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; JUSUF, S. S.; 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 Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

PARMA, A. E.; FERMANDEZ, A. S.; SANTISTEBAN, C. G.; BOWDEN, R. A.; CERONE, S. I. Tears and aqueous humor from horses inoculated with Leptospira contain antibodies which bind to cornea. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, p. 181-185, 1987.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZA DRI, S.; DAVIS, J. C.; MC GRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A. l.; DAVIES, J. K.; ME´DIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1607, 2008.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, ´. e51025, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0051025.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569-82, 2009. doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.

PREECHAKASEDKIT, P.; PINWATTANA, K.; DUNGCHAI, W. et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of Salmonella typhi in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 562–566, 2012.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. Spain: Grafos, p. 292-303, 1994.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF. K. W. Veterinary medicine. 9. ed. W.B. Saunders, p. 1877, 2000.

RAJERISON, M.; DARTEVELLE, S.; RALAFIARISO, A. L. A.; BITAM, I.; TUYET, D. T. N.; ANDRIANAIVOARIMANANA, V.; NATO, F.; RAHALISON, L. Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of Yersinia pestis Antibodies in Humans and Reservoirs. **PLoS One**, v.3:e421, 2009.

RAMADAS, P.; JARVIS, B. D.W.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetics characterization of pathogenic Leptospira species by DNA hybridization. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 215-219, 1992.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

REBHUN, W. C. **Disease of dairy cattle**. Baltmore: Willians & Wilkins, 1995. p. 625.

REN, S.-X.; FU, G.; JIANG, X.-G.; ZENG, R.; MIAO, Y.-G.; XU, H.; ZHANG, Y.-X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.-F.; JIANG, H.-Q.; JIA, J.; TU, Y.-F.; JIANG, J.-X.; GU, W.- Y.; ZHANG, Y.-Q.; CAI, Z.; SHENG, H.-H.; YIN, H.-F.; ZHANG, Y.; ZHU, G.-F.; WAN, M.; HUANG, H.-L.; QIAN, Z.; WANG, S.-Y.; MA,W.; YAO, Z.-J.; SHEN, Y.; QIANG, B.-Q.; XIA, Q.-C.; GUO, X.-K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y.-M.; SHI, M.-H.; CHEN, Z.; XU, J.-G.; ZHAO, G.-P. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, p. 888–893, 2003.

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; MATTHIAS, M. A. Whole Genome Analysis of Leptospira licerasiae Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1853, 2012. doi:10.1371/journal.pntd.0001853.

ROSE, A. M.; MUELLER, J. E.; GERSTL, S.; NJANPOP-LAFOURCADE, B. M.; PAGE, A. L.; NICOLAS, P.; GUERIN, P. J. Meningitis Dipstick Rapid Test: Evaluating Diagnostic Performance during an Urban Neisseria meningitides Serogroup A Outbreak, Burkina Faso, 2007. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11086, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0011086.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Press, 1989.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, v. 1, n. 9, p. 97-109, 1970.

SATO, Y.; COWELL, J. R.; SATO, H.; BURSTYN, D. G.; MANDARCK, C. R. Separation and purification of the hemagglutinins from Bordetella pertussis. **Infection Immunity**, v. 41, p. 313-320, 1983.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR – Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira Reproidução Animal**, v. 28, n. 1, p.23-27, 2004.

SETUBAL, J. C.; REIS, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v. 152, p. 113-121, 2006.

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; NAGAKURA, N.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, Y. Chemical properties of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from Leptospira interrogans serovar Canicola strain Moulton. **Microbiology Immunology**, v. 31, n. 8, p. 717-25, 1987.

SHYU, R. H.; SHYU, H. F.; LIU, H. W.; TANG, S. S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 255-258, 2002.

SLEE, K. J.; McORIST, S.; SKILLBECK, N. W. Bovine abortion associated with Leptospira interrogans serovar Hardjo infection. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 60, p. 204- 206, 1983.

SMITH, C. R.; KETTERER, P. J.; McGOWAN, M. R.; CORNEY, B. G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of Leptospira interrogans serovar Hardjo infection in cattle. **Australian Veterinary Veterinary Journal**, Brunswick, v. 71, n. 9, p. 290-295, 1994.

SMITS, H. L.; ANANYINA ,Y. V.; CHERESHSKY, A.; DANCEL, L.; LAI-A-FAT, R. F. M.; CHEE, H. D.; LEVETT, P. N.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; MUTHUSETHUPATHI, M. A.; SANDERS, E. J.; SASAKI, D. M.; DOMEN, H.; YERSIN, C.; AYE, T.; BRAGG, S. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; GORIS, M. G. A.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. International Multicenter Evaluation of the Clinical Utility of a Dipstick Assay for Detection of Leptospira-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Serum Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2904-2909, 1999.

SMITS, H. L.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; GUSSENHOVEN, G. C.; YERSIN, C.; SASAKI, D. M.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1272-1275, 2000.

SOUZA, N. M.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO A. L. T. O. Lsa 30, a novel adhesin of Leptospira interrogans binds human plasminogen and the complemente regulator C4bp. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, p. 125-134, 2012.

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 Infectious Disease**, v. 64, p. 247–255, 2009.

SUBATHRA, M.; SENTHILKUMAR, T. M.; RAMADASS, P. Recombinant OmpL1 protein as a diagnostic antigen for the detection of canine leptospirosis. **Applied Biochem Biotechnol**., v. 169, p. 431–7, 2013.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 216-223, 1974.

SUTCLIFFE, I. C.; HARRINGTON, D. J. Putative lipoproteins of Streptococcus agalactiae identified by bioinformatic genome analysis. **Antonie VanLeeuwenhoek**, v. 85, n. 4, p. 305, 2004.

THAIPADUNPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; PEACOCK, S. J. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. **PLoS One**, v. 6, p. e16236, 2011.

TOMICH, R. G. P.; JULIANO, R. S.; PELLEGRIN, A. O.; BOMFIM, M. R. Q.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; KOURY, M. C. **Ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante para triagem de bovinos positivos para leptospirose**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 6 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 86). Disponível em:<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php? arq_pdf=CT86>.Acesso em: 31 dez. 2009.

TURNER, L. H. Leptospirosis II serology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 62, p. 880-889, 1970.

VAN EYS, G. J. J. M.; GRAVEKAMP, C.; GERRISTSEN, M. J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M. T. E; TER SCHEGGE, J.; TERPSTRA, W. J. Detection of Leptospirosis in urine by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.

VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico laboratorial de leptospirose. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 189-195, 1979.

VIEIRA, M. L.; D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A. M.; BARBOSA, A. S.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ABREU, P. A. E.; GÓMEZ, R. M.; NASCIMENTO, A. L. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, n. 2, p. 172-180, 2007.

WANG, Y.; DOU, H., CHEN, K.; ZHANG, H.; HU, C. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic test strip for the rapid, on-site detection of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 329-338, 2011.

WARTHIN, A. S.; CHONISTER, A. C. "A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues (Warthin and Starry's cover-glass method)". **American Journal of Syphilis**, v. 4, p. 97–103, 1920.

WIDIYANTI, D.; KOIZUMI, N.; FUKUI, T.; MUSLICH, L.T.; SEGAWA, T.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; SAITO, M.; MASUZAWA, T.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S.I. Development of Immunochromatography-Based Methods for Detection of Leptospiral Lipopolysaccharide Antigen in Urine. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 20, n. 5, p. 683–690, 2013.

WOO, T. H. S.; PATEL, B. K. C.; SMYTHE, L. D.; SYMONDS, M. L.; NORRIS, M. A.; DOHNT, M. F. Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans. **FEMS Microbiologyl Letters**, v. 155, p. 169-177, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). **Report of a WHO expert group. Current problems in leptospirosis research**. Geneva: World Health Organization Technical Report, 1967. p. 1-32. (Series, 380).

YANG, J.; JIN, M.; CHEN, J.; YANG Y.; ZHENG, P.; ZHANG, A.; SONG, Y.; ZHOU, H.; CHEN, H. Developement and evaluation of an immunochromatographic strip for detection os Streptococcus suis type 2 antibody. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 4, p. 355-361, 2007.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGER, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serougroups and sorovars for seven new Leptospira species. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ZHANG, G.; GUO, J.; WANG, X. Immunochromatographic lateral flow strip test. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. (Ed.). **Methods in molecular biology – Biosensors and Biodetection**: methods and protocols. [S.l.]: Humana Press, 2009. v. 2, p. 169-83, 2009.

APÊNDICE

Apêndice A – *Soros bovinos reagentes para leptospirose através da SAM*

Nºde Ordem	**Código do Animal**	**Resultado**
1	2016	15 A=100;15C=800
2	1027	2 A=100;15 A=400;15B=800
3	8979	15B=800
4	1985	15 A=800;15B=400;16=200
5	1008	15 A=1.600;15B=400;16=400
6	1024	15 A=3.200;15B=400
7	691	15 A=1.600;15B=1.600;16=400
8	3643	15 A=3.200;15B=800
9	8620	2 A=400;14=100;15 A=1.600;15B=400
10	9009	15 A=800;15B=200
11	3751	2 A=200;15 A=800;15B=400;16=400
12	1199	15 A=3.200;15B=3.200
13	1204	9=3.200;15 A=3.200;15B=1.600;16=400
14	3829	9=1.600
15	8997	15 A=1.600;15B=800;16=400
16	1005	15 A=1.600;15B=1.600
17	2805	15 A=1.600;15B=1.600
18	3857	15 A=800;15B=400
19	3410	15 A=3.200;15B=1.600
20	8669	10B=200;15 A=800;15B=400
21	1014	15 A=6.400;15B=3.200
22	1187	15 A=3.200;15B=400
23	3361	8=100;15 A=3.200;15B=1.600
24	7792	2 A=200;8=800;10B=200;15 A=3.200;15B=1.600;16=1.600
25	3664	9=1.600;15 A=3.200;15B=1.600
26	8978	3=100;15 A=1.600;15B=400
27	8569	15 A=3.200;15B=1.600
28	7702	2 A=100;15 A=1.600;15B=400;15C=200
29	9033	15 A=800;15B=400
30	8648	9=400;15 A=1.600;15B=800
31	1028	9=400;15 A=1.600;16B=1.600;20=100
32	1016	8=1.600;15 A=800;15B=400
33	8965	1B=200;15 A=3.200;15B=1.600;15C=200
34	3667	9=800;15 A=1.600;15B=1.600;
35	9127	8=200;9=800;15 A=3.200;15B=800

36	8583	9=400;15 A=800;15B=400;15C=100
37	9025	15 A=1.600;15B=800
38	3830	15 A=800;15B=200
39	9001	15 A=1.600;15B=400
40	8993	9=400;15 A=6.400;15B=3.200
41	1061	15 A=800;15B=400
42	2976	15 A=800;15B=200
43	9040	9=400;15 A=1.600;15B=800
44	1040	8=400;9=800;15 A=6.400;15B=3.200
45	1009	15 A=1.600;15B=800
46	3642	15 A=3.200;15B=1.600
47	1011	15 A=400;15B=200
48	7780	15 A=1.600;15B=800
49	1017	15 A=800;15B=400
50	3694	1B=800;2A=100;3=100;8=200;10A=200;13A=200;15c=400;16=100
51	3805	8=800,10A=200,16=100
52	3735	8=1600,10A=400,13A=400,14=200,15A=100,15B=100
53	3037	8=800,10A=200,10B=100,15A=200,15B=200
54	3787	3=100,8=800
55	2962	1B=400,8=800,13A=100,16=1600,15C=200
56	2308	8=800,10B=200,13A=200,15A=200,15B=200
57	3013	8=800,9=200,10A=400,13A=400,14=200,15A=800,15B=200,16=800
58	2948	8=800,13A=800,16=800
59	2888	8=200,9=200,10A=200,13A=1600,15A=200,15B=200
60	3201	8=3200,10A=400,13A=200,15A=200,15B=200,15C=800
61	3692	2A=100,8=400,10A=200,16=400,15C=800
62	150	13A=200,16=200,15C=3200
63	3634	8=800,15C=3200
64	2642	14=100,15A=100,16=200,15C=3200
65	3282	8=200,10A=800,13A=200,14=200,16=200,15C=3200
66	3058	8=200,9=100,10A=200,15A=100,16=800,15C=400
67	2743	8=800,10A=400,13A=200,14=100,15A=200,15B=100
68	3747	8=800
69	2620	8=3200,10A=400,13A=400,14=200,15A=400,15B=200
70	2645	1B=200,8=1600,9=200,13A=200,15A=200,15B=100
71	3545	8=800,9=100,13A=200
72	3837	8=1600,10A=400,14=200,15A=200,15B=100,16=200
73	3278	8=800,9=200,13A=400,15A=400,15B=400

74	2936	1B=800,8=800,9=100,10B=200,14=200,15A=400,15B=400,15C=400
75	1162	8=3200,9=400,10B=200,13A=100,14=400,15A=400,15B=200
76	3340	8=800,10A=800,14=100,15A=400,15B=200
77	3322	8=1600,9=200,13A=200,14=100,15A=200,15B=100,16=100
78	3475	8=400,9=200,10A=1600,10B=100,13A=400,15A=200, 16=400
79	618	8=100,15C=100,16=1600,17=100
80	2696	8=400,,10A=800,10B=200,13A=200,15A=200,15B=200,16=200
81	3399	8=800,10A=400, 13A=400,14=200,15A=200,15B=400,15C=200
82	3012	8=400,9=400,10A=400, 13A=1600,15A=400,15B=200,16=1600
83	1465	8=400,9=200,10A=400,10B=200,13A=800,15A=800,15B=400
84	0603	6=1600,15C=200
85	2985	5=100,8=800,10A=200,10B=100,15A=200,15B=200,16=100
86	253	5=100,8=800,10B=100,13A=200,14=200,16=400,15C=100
87	3514	8=800,10B=200,13A=200,14=800,15A=800,15B=800
88	3017	1A=800,8=1600,10A=800,13A=800,14=800,15A=400,15B=400
89	2747	8=800,9=400,13A=400,14=200,15A=800,15B=400,16=400
90	0921	8=800,13A=100,15A=100,15B=100
91	3854	8=800,10A=1600,10B=400,13A=800,14=800,15A=200,,16=400
92	2727	8=400,9=800,10B=100,13A=400,15A=800,15B=800
93	0537	9=200,10B=200,13A=400,15A=200,15B=200,16=100
94	0117	8=400,10A=800,10B=400,13A=200,14=800,16=400,15C=200
95	1774	2A=100,8=400,10A=200,10B=100,13A=800,15A=400
96	3759	3=100,8=800,9=100,10A=800,10B=200,13A=400,14=800
97	3087	8=100,15C=1600
98	3231	8=800,9=100,10A=400, 15A=200,15B=100,16=200,15C=800
99	1506	9=100; 15A=3200; 15B=1600
100	18	9=400; 15A=1600;15B=800

Código	**Sorogrupo**	**Variante Sorológica**	**Código**	**Sorogrupo**	**Variante Sorológica**
1-A	Australis	australis	**10-B**	Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae
1-B	Australis	bratislava	**11**	Javanica	Javanica
2-A	Autumnalis	autumnalis	**12**	Panama	Panamá
2-B	Autumnalis	butembo	**13A**	Pomona	Pomona
3	Ballum	castellonis	**14**	Pyrogenes	Pyrogenes
4-A	Batavia	bataviae	**15-A**	Sejroe	hardjo (*hardjoprajitno*)
5	Canicola	canicola	**15-B**	Sejroe	Wolffi
6	Celledoni	whitcombi	**15-C**	Sejroe	hardjo (*hardjobovis*)
7	Cynopteri	cynopteri	**16**	Shermani	Shermani
8	Grippotyphosa	grippotyphosa	**17**	Tarassovi	Tarassovi
9	Hebdomadis	hebdomadis	**20**	Seramanga	Patoc
10-A	Icterohaemorrhagiae	copenhageni	**21**	Djasiman	Sentot

Legenda: variantes sorológicas utilizadas na SAM

Apêndice B – ***Soros bovinos não reagentes para leptospirose através da SAM***

Nº de Ordem	**Código do Animal**	**Resultado**
1	9966	NEGATIVO
2	2142	NEGATIVO
3	2057	NEGATIVO
4	9933	NEGATIVO
5	9832	NEGATIVO
6	9967	NEGATIVO
7	99720	NEGATIVO
8	9925	NEGATIVO
9	2047	NEGATIVO
10	9990	NEGATIVO
11	2030	NEGATIVO
12	9863	NEGATIVO
13	2156	NEGATIVO
14	2106	NEGATIVO
15	99620	NEGATIVO
16	2213	NEGATIVO
17	9914	NEGATIVO
18	2113	NEGATIVO
19	2177	NEGATIVO
20	9976	NEGATIVO
21	9911	NEGATIVO
22	2011	NEGATIVO
23	99610	NEGATIVO
24	2024	NEGATIVO
25	9997	NEGATIVO
26	99170	NEGATIVO
27	2044	NEGATIVO
28	2075	NEGATIVO
29	2056	NEGATIVO
30	2027	NEGATIVO
31	2131	NEGATIVO
32	9980	NEGATIVO
33	2137	NEGATIVO
34	2118 A	NEGATIVO

35	2008	NEGATIVO
36	2135	NEGATIVO
37	2069	NEGATIVO
38	9939	NEGATIVO
39	9947	NEGATIVO
40	9942	NEGATIVO
41	99820	NEGATIVO
42	2160	NEGATIVO
43	2116	NEGATIVO
44	2231	NEGATIVO
45	9993	NEGATIVO
46	9869	NEGATIVO
47	2043	NEGATIVO
48	2165	NEGATIVO
49	2114	NEGATIVO
50	2204	NEGATIVO
51	99490	NEGATIVO
52	272	NEGATIVO
53	274	NEGATIVO
54	494	NEGATIVO
55	365	NEGATIVO
56	532	NEGATIVO
57	618	NEGATIVO
58	552	NEGATIVO
59	462	NEGATIVO
60	597	NEGATIVO
61	538	NEGATIVO
62	583	NEGATIVO
63	556	NEGATIVO
64	373	NEGATIVO
65	504	NEGATIVO
66	650	NEGATIVO
67	535	NEGATIVO
68	385	NEGATIVO
69	426	NEGATIVO
70	441	NEGATIVO
71	366	NEGATIVO
72	600	NEGATIVO

73	484	NEGATIVO
74	479	NEGATIVO
75	424	NEGATIVO
76	636	NEGATIVO
77	589	NEGATIVO
78	572	NEGATIVO
79	554	NEGATIVO
80	599	NEGATIVO
81	524	NEGATIVO
82	563	NEGATIVO
83	611	NEGATIVO
84	492	NEGATIVO
85	586	NEGATIVO
86	531	NEGATIVO
87	581	NEGATIVO
88	557	NEGATIVO
89	511	NEGATIVO
90	601	NEGATIVO
91	356	NEGATIVO
92	640	NEGATIVO
93	508	NEGATIVO
94	497	NEGATIVO
95	539	NEGATIVO
96	368	NEGATIVO
97	510	NEGATIVO
98	380	NEGATIVO
99	476	NEGATIVO
100	528	NEGATIVO