

UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES
CANDIDATOS PARA O DESENVOLVIMENTO
DE VACINA PARA LEPTOSPIROSE**

ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA

15.371



003398

Salvador - Bahia - Brasil
2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação de Antígenos Recombinantes Candidatos para o
Desenvolvimento de Vacina para Leptospirose

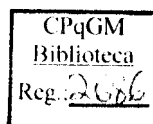
ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA

Orientador: Mitermayer Galvão dos Reis

Dissertação apresentada para obtenção do Grau
de Mestre em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil

2003



Siqueira, Isadora Cristina de

S628

Avaliação de Antígenos Recombinantes Candidatos para o desenvolvimento de vacina para leptospirose. / Isadora Cristina de Siqueira. _ Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2003.
73p.:ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia, 2003.

1. Leptospirose. 2. Vacina. 3. Antígenos Recombinantes.
I. Título.

CDU 616.986.7: 615.371

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ, Salvador-Bahia

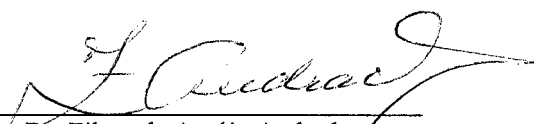
1912
M.F. 1912

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES CANDIDATOS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA LEPTOSPIROSE

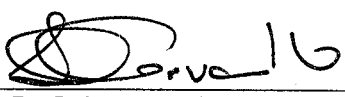
ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

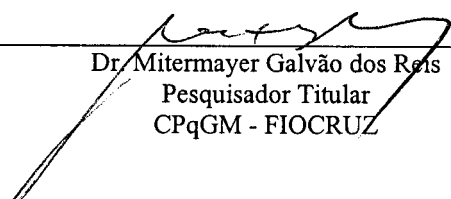
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Lain Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

- A Elves Anderson Pires Maciel, marido, colega de profissão e pesquisa, pelo carinho e companheirismo constante.
- Aos orientadores Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Dr. Albert Icksang Ko pelo desenvolvimento intelectual e constante orientação, desde a iniciação científica.
- Aos estudantes de iniciação científica Julio Henrique R. Croda e Vinicius Carrera Souza, pela dedicação e entusiasmo com a pesquisa científica.
- A Fabiana Galvão e Andréia Carvalho, pelo auxílio na realização dos experimentos.
- Aos componentes da banca, Dr. Zilton Andrade e Dr. Lain Pontes, pelas correções e sugestões feitas a esta dissertação.
- Aos pesquisadores do CPqGM, Dr. Eduardo Ramos e Dr. Ricardo Ribeiro, pela ajuda nas análises e documentações de imunohistoquímica e imunofluorescência.
- Aos colegas do curso de pós-graduação, especialmente Cristian Petter, Almério Noronha e Lucas Carvalho, pela amizade, e, à secretária do curso, Sra. Rosália Oliveira, pela dedicação que vem exercendo suas atividades.
- Aos colegas do Lab. Patologia e Biologia Molecular (LPBM)/ CPqGM, especialmente Soraia Cordeiro, Josilene Lima e Adriano Queiroz, pelo companheirismo diário.
- Ao Dr. David Haake, da UCLA-EUA, pela colaboração e sugestões dadas ao projeto.
- Ao Dr. Henrique Lenzi e Ester Mota, do Laboratório de Patologia do I.O.C./Fiocruz, pelo treinamento em técnicas histopatológicas.
- Ao Dr. Odir Dellagostin, da UFPel e Ana Lúcia Nascimento, do Instituto Butantan, pelo envio de proteínas recombinantes utilizadas neste projeto.
- A Fapesb, Fiocruz e CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado no período de 2001 a 2002.

ÍNDICE

1-Introdução	1
1.1-Aspectos históricos	1
1.2-Biologia	2
1.3-Membrana externa	5
1.4-Patologia	6
1.5-Patogênese	7
1.6-Epidemiologia	8
1.7-Manifestações Clínicas	8
1.8-Diagnóstico Laboratorial	10
1.9-Tratamento	11
1.10-Vacinas	11
1.11-Identificação de proteínas Ligs	13
2-Objetivos	16
2.1-Objetivo Geral	16
2.2-Objetivos Específicos	16
3-Racional e Relevância	17
4-Metodologia	21

4.1-Manutenção e Padronização das culturas de Leptospiras	21
4.1.1-Cepas utilizadas	21
4.1.2-Manutenção das culturas	21
4.1.3-Crescimento e contagem	21
4.1.4-Atenuação	21
4.1.5-Infecção em modelo experimental e recuperação de virulência	22
4.1.6-Histopatologia	22
4.1.7-Teste de virulência em modelo experimental	22
4.1.8-Congelamento	23
4.1.9-Produção de antígeno bruto para western blot	23
4.1.10-Produção de antígeno bruto para imunização	23
4.2-Seleção dos antígenos recombinantes	24
4.3-Purificação de proteínas recombinantes	25
4.3.1-Pureza e concentração	25
4.4-Estudo de antigemicidade	26
4.4.1-Soros testados	26
4.4.2-Western blot	27
4.5-Estudo de imunogenicidade dos antígenos recombinantes	28
4.5.1-Imunização de ratos e camundongos	28
4.5.2-Coleta de soros pré-ímmunes e pós-ímmunes	28
4.5.3-Western blot para testar imunogenicidade	29
4.6-Avaliação da expressão de antígenos durante a infecção	30
4.6.1-Imunohistoquímica	30
4.7-Localização de antígenos na superfície da leptospira	31

4.7.1- Imunofluorescência com leptospiras fixadas	31
4.7.2 - Imunofluorescência com leptospiras vivas em suspensão	32
4.8- Expressão diferencial de antígenos em leptospiras virulentas	32
4.8.1- Imunofluorescência	32
4.8.2- Imunoblot com cultura virulenta e atenuada	33
5- Resultados	34
5.1- Padronização das culturas	34
5.2- Pureza e concentração das proteínas recombinantes	36
5.3- Experimentos de antigenicidade	38
5.4- Histopatologia e imunohistoquímica	40
5.5- Experimentos de imunogenicidade	43
5.6 -Caracterização de LigB	44
5.6.1- Expressão de LigB durante a infecção	45
5.6.2- Expressão de LigB em cultura virulenta e atenuada	45
5.6.2.1- Western blot comparando antígeno de cultura virulenta com atenuada	46
5.6.2.2- Imunofluorescência comparando cultura virulenta com atenuada	47
5.6.3- Localização de LigB na superfície da Leptospira	49
6- Discussão	50
7- Conclusões	54
8- Referências bibliográficas	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Micrografia eletrônica de varredura de <i>L. interrogans</i> sorovar <i>icterohaemorrhagiae</i> cepa RGA. (fonte: CDC, Atlanta ,EUA)	04
Figura 2 Modelo da arquitetura da dupla membrana das leptospiras	05
Figura 3. Proteína “Bacterial Ig-Like” de leptospira e outras espécies.....	14
Figura 4. Mapa das regiões de LigB.....	15
Figura 5. Estratégias e cronograma para desenvolvimento de vacina.....	19
Tabela 1. Proteínas selecionadas para este projeto.....	24
Tabela 2. Experimento de dose letal 50%.....	34
Figura 6. Dose letal 50%, curva de sobrevida (animais sexo=F).....	35
Figura 7. Dose letal 50%, curva de sobrevida (animais sexo=M).....	35
Figura 8 SDS-PAGE mostrando eletroforese das proteínas recombinantes purificadas.....	36
Tabela 2. Avaliação de pureza e concentrações dos antígenos recombinantes de leptospira...37	37
Figura 9. Western blot utilizando antígenos recombinantes.....	39
Figura 10. Fígado de hamster infectado com <i>L. interrogans</i> , coloração HE.....	40
Figura 11. Fígado de hamster infectado com <i>L. interrogans</i> , coloração WS.....	41
Figura 12. Fígado de hamster infectado com <i>L. interrogans</i> , imunohistoquímica.....	41
Figura 13. Imunohistoquímica em fígados de hamsters infectados.....	42
Tabela 3. Ensaio de imunogenicidade dos antígenos recombinantes de <i>L.interrogans</i>	43
Figura 14. Western blot com antígeno recombinante LipL41 testando imunogenicidade.....	44
Figura 15. Western blot com antígeno bruto e antígeno recombinante LigB.....	45
Figura 16. Western blot com antígeno bruto de <i>L.interrogans</i> , cepa virulenta e cepa atenuada.....	46

Tabela 4. Imunofluorescência com leptospiras fixadas	47
Figura 17. Imunofluorescência de culturas de <i>L.interrogans</i>	48
Tabela 5. Imunofluorescência em leptospiras fixadas e em suspensão para localização de LigB.....	49

Resumo

AValiação DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES CANDIDATOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA LEPTOSPIROSE. ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA.

A leptospirose, causada pela espiroqueta patogênica *Leptospira interrogans*, é a zoonose de maior distribuição mundial (WHO 1999), atingindo principalmente países tropicais, onde representa um problema importante para saúde pública. Abordagens preventivas, como vacinas eficazes para seres humanos precisam ser desenvolvidas urgentemente. Estratégias baseadas em antígenos recombinantes oferecem uma alternativa custo-efetiva e têm sido usadas para desenvolver vacinas licenciadas para uso na prevenção de outras doenças bacterianas. Proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* têm sido caracterizadas e induzem resposta protetora parcial em modelo experimental de imunização para leptospirose. Com isso, surge a necessidade de avaliação e identificação de antígenos recombinantes candidatos para uma vacina segura e efetiva contra leptospirose. Com o recente sequenciamento do genoma de *Leptospira*, novas proteínas serão identificadas, tomando-se necessário a avaliação destas proteínas para seleção daquelas que possam representar potenciais alvos para uso em vacina e métodos diagnósticos. Nesta dissertação, padronizamos e validamos ensaios de antigenicidade, imunogenicidade e localização, para caracterização de proteínas de *Leptospira*. Além disso, caracterizamos uma nova proteína, LigB, que possui homologia com outras proteínas como intimina e invasina, fatores de virulência de *E. coli* enteropatogênica e *Yersinia pseudotuberculosis*, respectivamente. A expressão de LigB está presente em cepa virulenta de *L. interrogans* e não é detectada em cepa atenuada, demonstrando que sua expressão está correlacionada com a virulência. Além disso, a expressão de LigB está aumentada durante a infecção do hospedeiro e sua localização parece ser na superfície da membrana externa de bactéria. A caracterização de LigB aponta esta proteína como uma candidata promissora para uso no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra leptospirose.

Palavras-chaves: Leptospirose, Vacina, Antígenos Recombinantes.

Abstract

EVALUATION OF RECOMBINANT ANTIGENS AS POTENTIAL TARGETS FOR DEVELOPMENT OF LEPTOSPIROSIS VACCINE. ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA.

Leptospirosis, caused by the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*, is the zoonosis of widespread distribution in the world, attaining principally tropical countries, where represents an important public health problem. Preventive approaches, such as effective vaccines for human beings need to be developed urgently. Strategies based on recombinant antigens offer a cost-effective alternative and has been used to develop approved vaccines to prevention of other bacterial diseases. Recombinant proteins from *Leptospira interrogans* has been characterized and shown partial protective response in an experimental model of leptospirosis immunization. Because this, its necessary evaluate e identify recombinant antigens candidates for a safe and effective vaccine against leptospirosis. With the recent *Leptospira* genome sequencing, new leptospiral proteins will be identified, and its evaluation will be necessary, to select those with potential target for vaccine and diagnostic tests. In this thesis, we standardized and validated antigenicity, localization and immunogenicity assays to characterize leptospiral proteins. In addition, we characterized a new protein, LigB, witch has homology to proteins like intimin and invasin, virulence factors from enteropathogenic *E. coli* and *Yersinia pseudotuberculosis*, respectively. The expression of LigB is present in virulent strains of *L. interrogans*, but not in attenuated strain, showing a relationship with virulence. Furthermore, the LigB expression is up regulated during host infection, and this protein is probably located on surface of the outer membrane of bacteria. The characterization of LigB, point out this protein as a promising candidate to development of an effective leptospirosis vaccine.

Key Words: Leptospirosis, vaccine, Recombinant Antigen

1- Introdução

1.1-Aspectos Históricos

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, causada por espécies patogênicas de *Leptospira*. A primeira descrição clínica da doença foi realizada em 1886 por Adolf Weil na Alemanha, e a primeira descrição do organismo em 1907 por Stimson, que, através de impregnação com prata, pelo método de Levaditi, observou a presença de espiroquetas em túbulos renais de um paciente que supostamente havia morrido de febre amarela. Stimson nomeou o novo agente de *Spirochaeta interrogans* devido sua morfologia ser semelhante a um ponto de interrogação (Faine *et al.*, 1999).

Apesar da confusão clínica entre febre amarela e leptospirose, a etiologia da síndrome de Weil foi definida em 1915 no Japão, onde Inada e Ito detectaram espiroquetas e anticorpos específicos em sangue de pacientes com leptospirose e simultaneamente na Alemanha, onde Uhlenhuth e Fromme, e Huber e Reiter, detectaram espiroquetas em sangue de cobaios inoculados com sangue de pacientes. Em 1916, Inada e colaboradores cultivaram leptospiros patogênicas pela primeira vez, descreveram a distribuição das espiroquetas em vários tecidos de animais infectados experimentalmente, o modo de infecção através de pele abrasada e mucosas e a excreção do agente na urina de animais e pacientes. A cepa isolada por Inada foi designada de Ictero N° I (ATCC 43782), e atualmente é a cepa padrão do gênero *Leptospira* (Kobayashi, 2001).

O grupo japonês liderado por Inada descreveu ainda o papel dos ratos como reservatórios da doença. Esta observação importante facilitou o entendimento dos princípios epidemiológicos da transmissão da doença através de vetores animais. Após alguns anos, outros animais domésticos e

silvestres foram identificados como carreadores da doença, e o caráter zoonótico amplo da leptospirose foi então estabelecido (Faine *et al.*, 1999).

1.2 – Biologia

A família *Leptospiraceae*, pertencente à ordem Spirochaetales, está dividida em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneria*. Tradicionalmente, o gênero *Leptospira* tem sido dividido em duas espécies, *L. interrogans* e *L. biflexa*, contendo as cepas patogênicas e saprófitas, respectivamente (Faine *et al.*, 1999).

Leptospiras são bactérias aeróbicas, com crescimento adequado em temperaturas de 28°C a 30°C. Necessitam de meio para cultura enriquecido com vitaminas B₂ e B₁₂, ácidos graxos de cadeias pesadas e sais de amônio. Rotineiramente, o meio de cultura mais utilizado para leptospiras patogênicas é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde (Faine, 1982).

As leptospiras, de acordo com suas características fenotípicas, são divididas em mais de 200 sorovares. Esta classificação é definida por aglutinação após absorção cruzada com antígenos homólogos, sendo o lipopolissacarídeo (LPS) o antígeno aglutinante. Sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em 24 sorogrupos distintos. Apesar de não possuir uma base taxonômica, essa classificação tem sido útil para fins epidemiológicos, uma vez que determinados sorogrupos são mais encontrados em determinados reservatórios (Faine *et al.*, 1999).

Recentemente, uma classificação baseada nas semelhanças genéticas entre as leptospiras foi proposta e as agrupa em 17 genomoespécies. Apesar de promissora, tal modalidade taxonômica ainda não substituiu a classificação fenotípica, pois ainda tem pouca utilidade clínica e

epidemiológica, além de poder ser realizada apenas em laboratórios de pesquisa (Faine *et al.*, 1999; Plank & Dean, 2000; Levett, 2001; Vinetz, 2001).

Até o momento, não são conhecidos mecanismos de transferência horizontal de material genético em leptospiros patogênicos, impossibilitando sua manipulação genética e dificultando o estudo dos seus mecanismos patogênicos e a identificação de fatores de virulência (Zuerner *et al.*, 2000; Levett, 2001). Por isso, tem sido utilizado métodos indiretos, como clonagem de DNA e expressão de genes de leptospira em sistemas com hospedeiros heterólogos (Zuerner *et al.*, 2000; Levett, 2001).

O genoma da leptospira tem aproximadamente 5000 kb, possuindo um cromossomo de 4400 kb e um cromossomo menor com 350 kb. Até recentemente, as informações baseadas na sequência do genoma não estavam disponíveis. Entretanto, um grande avanço foi o recente sequenciamento de *L. interrogans* sorovar Lai (Ren *et al.*, 2003).

As leptospiros são espiroquetas helicoidais, medindo aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e de 6 µm a 20 µm de comprimento, com extremidades em forma de gancho (Figura 1). Dois filamentos axiais estão localizados no espaço periplasmático (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

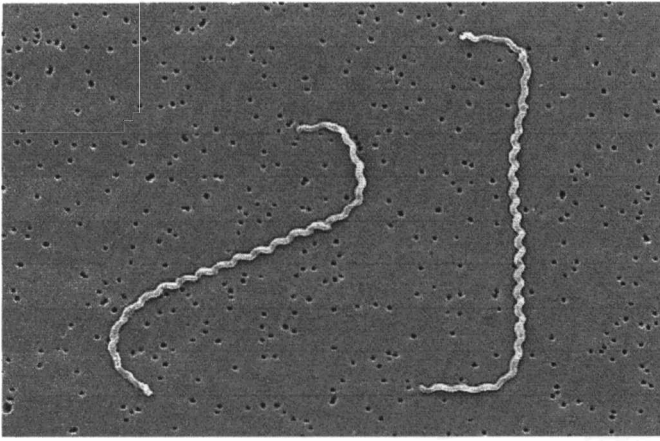


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae cepa RGA (fonte: CDC, Atlanta, EUA).

As leptospiros possuem uma dupla membrana, como as outras espiroquetas, com características tanto de bactérias Gram-positivas, como de Gram-negativas. A membrana citoplasmática está em contato com a parede celular composta de peptidoglicano, assim como nas bactérias Gram-positivas, e uma membrana externa funciona como uma barreira de proteção para antígenos como os do endoflagelo (Figura 2). A superfície externa está coberta predominantemente por LPS, que possui composição similar ao de bactérias Gram-negativas sendo, no entanto, 10 vezes menos tóxico para animais e células (Zuerner *et al.*, 2000; Levett, 2001).

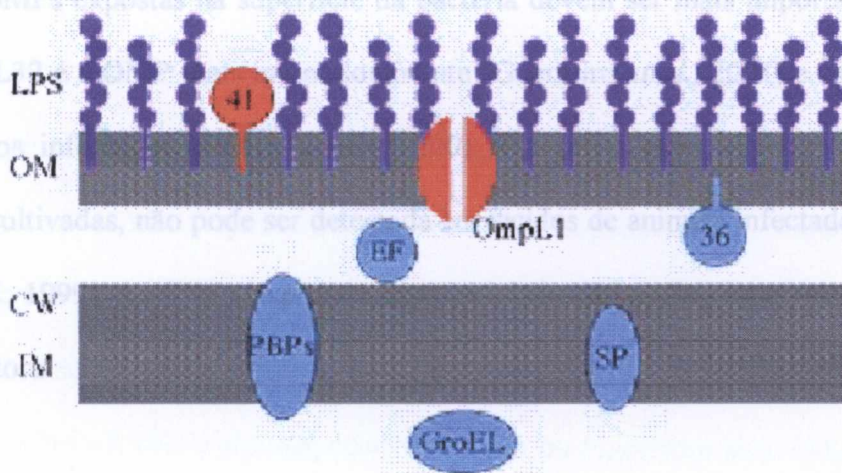


Figura 2. Modelo da arquitetura da dupla membrana das leptospiros. OM=membrana externa, IM=membrana interna, CW=parede celular, EF=endoflagelo, 41=LipL41, 36=LipL36, SP=peptidase sinal (Zuerner *et al.*, 2000).

1.3- Membrana externa

Atualmente, um dos maiores focos de pesquisa com relação às leptospiros tem sido a identificação de proteínas de membrana externa (OMPs), que podem representar fatores de virulência e potenciais candidatos para uso em vacina e métodos diagnósticos (Zuerner *et al.*, 2000).

A primeira OMP descrita em leptospiros patogênica, denominada OmpL1, foi isolada a partir de estudos de imunoprecipitação e caracterizada como uma porina (Haake *et al.*, 1993; Shang *et al.*, 1995). Algumas lipoproteínas já foram identificadas e caracterizadas, como a LipL41, LipL32 e LipL36. Com relação à localização destas lipoproteínas, LipL41 e LipL32 estão expostas na superfície da membrana externa (Shang *et al.*, 1996), LipL36 está localizada no espaço periplasmático (Haake *et al.*, 1998), e LipL31 na membrana interna (Haake & Matsunaga, 2002) (Figura 2).

As OMPs expostas na superfície da bactéria devem ser mais importantes na patogênese da doença. LipL32 é a OMP mais imunodominante (Guerreiro *et al.*, 2001) e está presente em tecidos de mamíferos infectados (Haake *et al.*, 2000). Por outro lado, LipL36, que está presente em leptospiros cultivadas, não pode ser detectada em tecidos de animais infectados (Haake *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 1999). As OMPs expressas durante a infecção podem estar relacionados com resposta imune protetora.

1.4. Patologia

Estudos anatomo-patológicos em seres humanos (Arean, 1962; Brito *et al.*, 1967; De Brito *et al.*, 1967) e estudos em patologia experimental (De Brito *et al.*, 1966; Brito, 1968) ajudaram no entendimento da doença. Os principais efeitos patológicos parecem ser causados pela resposta imune do hospedeiro. Vasculite, lesão endotelial e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear são achados encontrados em diversos órgãos (De Brito *et al.*, 1979).

Os órgãos mais comprometidos são rim e fígado, porém pulmão, coração, meninges, músculo esquelético, baço e pâncreas também são acometidos. No rim os achados característicos são necrose de túbulos, principalmente proximais e infiltrado intersticial (Davila De Arriaga *et al.*, 1982). No fígado a lesão preponderante é a destrabeculação de hepatócitos, pouco encontrada em outras patologias e a deposição de pigmentos biliares, além da hipertrofia de células de Kupffer. Necrose hepática extensa não ocorre, podendo no entanto, ser observado a apoptose (De Brito *et al.*, 1967). Miocardite intersticial, necrose de músculo esquelético em panturrilhas e hemorragias em diversos órgãos, como hemorragia alveolar, também são comuns na síndrome de Weil (De Brito *et al.*, 1987).

1.5- Patogênese

A patogênese da leptospirose ainda é pouco conhecida. A rápida disseminação da espiroqueta no hospedeiro infectado é o único fato definido e provavelmente favorece a evasão do patógeno em relação à resposta imune inata do hospedeiro. Em modelos experimentais, as leptospiras podem ser localizadas em todos os tecidos, incluindo SNC e meninges, logo após a infecção experimental (Levett, 2001).

A aderência à célula do hospedeiro, invasão ou fagocitose com indução de citotoxicidade, são interações que as bactérias comumente usam no processo de patogênese. Para as leptospiras patogênicas, a identificação destas interações *in vitro* e em modelos animais de virulência tem sido retardada pelos obstáculos no isolamento e manutenção das leptospiras, uma vez que sua virulência é rapidamente perdida após múltiplas passagens *in vitro*, requerendo passagens intermitentes em animais susceptíveis (Faine *et al.*, 1999).

Tem sido demonstrado que as leptospiras aderem a várias linhagens celulares em experimentos *in vitro*, incluindo células Vero (Merien *et al.*, 1997), MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) e células endoteliais de cordão umbilical humano. Este fenótipo *in vitro* parece estar associado com a virulência, uma vez que cepas atenuadas ou leptospiras não patogênicas saprófitas, não possuem esta capacidade de adesão (Merien *et al.*, 1997).

Em estudo recente, foi demonstrado que leptospiras *in vitro* rapidamente translocam-se através de monocamada de células epiteliais polarizadas (Barocchi *et al.*, 2002). Entretanto, fatores de virulência de leptospira, incluindo os que possam mediar a aderência em células do hospedeiro e invasão, ainda não foram identificados.

1.6-Epidemiologia

A leptospirose é considerada a zoonose de maior distribuição mundial, devido à habilidade das espiroquetas estabelecerem um estado de portador crônico renal em uma variedade de animais domésticos e silvestres. As leptospiras patogênicas colonizam o epitélio tubular renal dos reservatórios e são excretadas na urina, contaminando o ambiente externo, onde podem sobreviver por longos períodos, favorecendo assim a contaminação humana acidental (Levett, 2001).

Considerada tradicionalmente uma doença esporádica e associada a exposições ocupacionais, no Brasil a leptospirose expandiu-se de sua base rural típica para tornar-se a causa de epidemias urbanas com alta letalidade (10-15%) (Correa, 1975; Caldas *et al.*, 1978; Ko *et al.*, 1999; Lomar *et al.*, 2000). Atualmente, até 10.000 casos são notificados a cada ano à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA/MS). Em Salvador, o padrão epidemiológico responsável por mais de 1500 casos de leptospirose grave, identificados durante cinco anos de vigilância ativa com base populacional (Ko *et al.*, 1999), foi o de epidemias urbanas anuais associadas a altas intensidades pluviométricas.

1.7-Manifestações Clínicas

Classicamente, a leptospirose pode ocorrer em duas formas clínicas bem caracterizadas. A forma mais comum, que corresponde a 85%-90% dos casos, é a forma anictérica, enquanto 10-15% dos casos se apresentam na forma grave e ictérica da doença, conhecida como síndrome de Weil.

A leptospirose anictérica é uma doença febril sistêmica benigna e autolimitada. Seu período de incubação varia de 7-14 dias e a doença é caracterizada por febre, cefaléia e mialgias. Anorexia, náuseas, vômitos e dor abdominal podem ocorrer. Os achados físicos mais comuns são sufusão

conjuntival e dor à palpação de panturrilhas. Meningite linfomonocitária pode ocorrer assim como uveíte, caracterizando uma fase imune da doença. No entanto, a maioria dos casos apresenta-se de forma sub-clínica (Farr, 1995).

A forma grave da doença, conhecida como síndrome de Weil, é caracterizada por disfunção hepática, renal e fenômenos hemorrágicos, com taxas de mortalidade variando de 5% a 40%, podendo ultrapassar 50% nos casos com envolvimento pulmonar (Marotto *et al.*, 1999). O período de incubação pode variar de 1 a 24 dias, sendo usualmente de 7 a 14 dias. A doença tem início súbito caracterizado por febre, cefaléia e dores musculares. A primeira semana da doença corresponde à fase leptospirêmica, com disseminação de leptospiras para órgãos como fígado, rins, musculatura esquelética e cardíaca, sendo descrito o isolamento de leptospiras em sangue e liquor. Na segunda fase da doença, a fase imune, com duração de 4 a 30 dias, aparecem anticorpos da classe IgM e a sintomatologia é semelhante a da fase septicêmica (Farr, 1995; Levett, 2001).

Na síndrome de Weill, o envolvimento hepático é caracterizado por elevação de bilirrubinas e presença de icterícia rubínica ao exame físico. Há aumento discreto a moderado das transaminases, sem sinais de insuficiência hepática. O comprometimento renal é caracterizado por insuficiência renal aguda (IRA), com níveis elevados de uréia e creatinina, muitas vezes responsável pela admissão do paciente em unidade de tratamento intensivo e realização de diálise, sendo uma das causas de óbito da síndrome. Diferente do habitual, a IRA da leptospirose cursa com hipocalcemia, devido ao aumento da excreção urinária de potássio (Abdulkader *et al.*, 1996; Abdulkader, 1997). Os níveis de creatino-fosfoquinase (CPK) podem estar aumentados, devido à presença de rabdomiólise, favorecendo o diagnóstico diferencial de outras doenças ictericas febris (Johnson *et al.*, 1975).

Hemorragias como epistaxis, gengivorragia, hemorragia digestiva alta e hemoptise podem contribuir para a letalidade da doença. A principal causa destes fenômenos hemorrágicos são

vasculites e plaquetopenia. A plaquetopenia, em graus variados, é comum, e não está associada à coagulação intra-vascular disseminada (Edwards *et al.*, 1986; Nicodemo *et al.*, 1990).

O comprometimento pulmonar pode ocorrer, levando a insuficiência respiratória secundária à pneumonite ou hemorragia alveolar e atualmente representa uma causa importante de óbito, chegando a 50% nos casos com síndrome da angústia respiratória (SARA) e hemorragia alveolar maciça (Km *et al.*, 1991; Marotto *et al.*, 1999; Bethlem & Carvalho, 2000; Yersin *et al.*, 2000). Comprometimento cardio-vascular, devido a miocardite e arritmias, pode ocorrer, levando muitas vezes a hipotensão, choque e parada cardíaca (Farr, 1995; Levett, 2001).

1.8-Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico definitivo é feito por meio do isolamento da leptospira do sangue, liquor ou urina em meio de cultura apropriado, como os meios de Fletcher, Stuart, EMJH ou por sorologia positiva em paciente com quadro clínico compatível. Para confirmação sorológica é preciso um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos entre a fase de doença aguda e a fase de convalescença (após duas semanas) quando utilizada a reação de microaglutinação microscópica (MAT). No Brasil, tem-se empregado a reação de soroaglutinação macroscópica como teste de triagem e a soroaglutinação microscópica para confirmação e determinação do sorogrupo envolvido, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (Ms, 1989).

O MAT é considerado o teste sorológico “padrão-ouro”, porém esta reação é de positividade tardia, sendo de maior utilidade para vigilância epidemiológica do que para o diagnóstico clínico inicial. Além disso, o MAT necessita de amostras pareadas e, devido a dificuldades inerentes ao teste, só é realizado em laboratórios de referência.

Novos testes como o ELISA IgM, baseado em antígeno bruto (Terpstra *et al.*, 1985) ou antígenos recombinantes (Terpstra *et al.*, 1985; Flannery *et al.*, 2001), são mais sensíveis do que o MAT, mas ainda em nível insuficiente para ajudar nas decisões clínicas.

1.9-Tratamento

A terapia específica no início da doença tem eficácia comprovada, evitando a evolução para as formas graves da doença (Mcclain *et al.*, 1984). Para casos leves, o tratamento pode ser feito com 100 mg de doxiciclina de 12/12 horas ou 500 mg de amoxicilina de 8/8 horas, via oral, por cinco a sete dias. Nos casos moderados ou graves, o antibiótico recomendado é a penicilina G, 1 a 2 milhões de unidades, de 4/4 horas, por via endovenosa, por 7 a 10 dias e a terapia de suporte é fundamental. Hidratação, transfusão de sangue e/ou plaquetas, internamento em unidade de terapia intensiva, diálise e ventilação mecânica podem ser necessários (Levett, 2001).

1.10-Vacinas

A imunidade na leptospirose é principalmente humoral (Adler & Faine, 1977) e sorovar específica, assim as imunizações protegem contra doença causada apenas por sorovar homólogo. Com isso, vacinas baseadas em antígeno bruto de leptospira precisam conter os sorovares representativos de cada região (Levett, 2001).

Atualmente, vacinas licenciadas para leptospirose, baseadas em antígeno bruto, só estão disponíveis para uso em seres humanos, em grupos de risco específicos, como veterinários, devido aos efeitos adversos, como reações locais, necessidade de reforços em curtos períodos de tempo e

dificuldade para controle de qualidade das culturas de leptospiras utilizadas para produção de antígeno bruto (Levett, 2001).

Cuba desenvolveu recentemente uma vacina contendo os três sorovares mais prevalentes do país, Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae (Martinez Sanchez *et al.*, 2000). China também utiliza uma vacina polivalente para imunização de trabalhadores das plantações de arroz (Levett, 2001). No entanto, estas vacinas não foram testadas em ensaios clínicos controlados de eficácia e há considerações sérias com respeito a reações adversas e medidas de controle de qualidade.

Esforços para diminuição das reações adversas causadas por vacinas baseadas em antígeno bruto têm sido direcionados para eliminação de proteínas dos meios de culturas (Bey & Johnson, 1978; Christopher *et al.*, 1982) e utilização de frações subcelulares. Estudos demonstram que a membrana externa isolada possui a maioria ou todos os antígenos protetores encontrados em vacinas preparadas com antígeno bruto, fortalecendo, assim, o interesse na superfície das leptospiras (Auran *et al.*, 1972; Glosser *et al.*, 1974).

Imunizações com preparações utilizando antígenos brutos têm induzido proteção contra infecção com leptospira em modelos experimentais (Adler & Faine, 1978). Acredita-se que esta proteção é dada pela resposta imune humoral induzida contra o lipopolissacarídeo (Midwinter *et al.*, 1990) da leptospira, tendo como mecanismos efetores a fagocitose e ativação de complemento. Porém, uma vez que o LPS é o principal determinante antigênico dos diferentes sorovares, a proteção conferida normalmente é sorovar específica, não conferindo proteção cruzada contra os diversos sorovares. Um estudo recente de imunoproteção, em modelo experimental de leptospirose, avaliou diferentes extratos de leptospira (Sonrier *et al.*, 2000) e embora a fração contendo LPS não tenha produzido proteção para desafios com cepas heterólogas, quando testada a fração protéica, a mesma conferiu proteção parcial para sorovares heterólogos.

Estratégias baseadas em antígenos recombinantes oferecem uma alternativa custo-efetiva e têm sido usadas para desenvolver vacinas para uso na prevenção de outras doenças bacterianas, como doença de Lyme (Sigal *et al.*, 1998; Sigal, 1999; Thanassi & Schoen, 2000) e doença meningocócica (grupo B)(Pizza *et al.*, 2000). Em modelos experimentais, imunizações com determinantes protéicos, principalmente os associados com a membrana externa, têm induzido respostas protetoras contra infecções por outras espiroquetas, como sífilis e doença de Lyme. Uma vacina com proteína recombinante, baseada na proteína de superfície de *Borrelia*, Osp A, é efetiva contra doença de Lyme e licenciada para uso em seres humanos e animais (Thanassi & Schoen, 2000).

Proteínas recombinantes de *L. interrogans* têm sido caracterizadas nos últimos anos, como as lipoproteínas LipL32 (Haake *et al.*, 2000), LipL41 (Shang *et al.*, 1996), LipL36 (Haake *et al.*, 1998) e a porina OmpL1 (Haake *et al.*, 1993; Shang *et al.*, 1995). Em experimentos de imunoproteção em modelo experimental utilizando hamsters, não foi observada proteção induzida por LipL41 ou OmpL1, entretanto quando em associação, os dois antígenos recombinantes conferiram 71% de proteção sinérgica, comparada com 25% para os controles ($p < 0.001$)(Haake *et al.*, 1999), sugerindo que o estudo das proteínas de membrana externa pode ser promissor para identificação de candidatos para uso em vacina de sub-unidade.

1.11 Identificação de proteínas Ligs

Em projeto anterior, realizado no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (LPBM-CPqGM), foi realizada triagem de biblioteca genômica de *L. interrogans* utilizando pool de soros de pacientes com leptospirose, com intuito de identificar clones expressos durante a infecção. Foram identificados 24 clones, sendo que alguns possuíam genes para

proteínas conhecidas como GroEL e DnaK, duas proteínas de choque térmico (Ballard *et al.*, 1993; Ballard *et al.*, 1998), e LipL31, uma lipoproteína de membrana interna (Haake 2002). Entretanto, cinco clones contendo insertos não conhecidos foram seqüenciados e identificados como contendo regiões repetidas de aproximadamente 90 aminoácidos. Através de programas de bioinformática, foram identificados três genes pertencentes à família de Bigs (Bacterial Immunoglobulin - Like) e denominados Lig A, Lig B e Lig C (Matsunaga, 2003).

Por homologia, as proteínas Ligs (Leptospiral Ig-like) apresentam domínios repetitivos semelhantes a fatores de virulência de outras bactérias previamente descritos, como a intimina de *E. coli* enteropatogênica (Frankel *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 2000), a invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg *et al.*, 1987; Hamburger *et al.*, 1999) e BipA de *Bordetella sp* (Stockbauer *et al.*, 2001) (figura 3), sugerindo que as proteínas Ligs possam representar fatores de virulência de leptospiros.

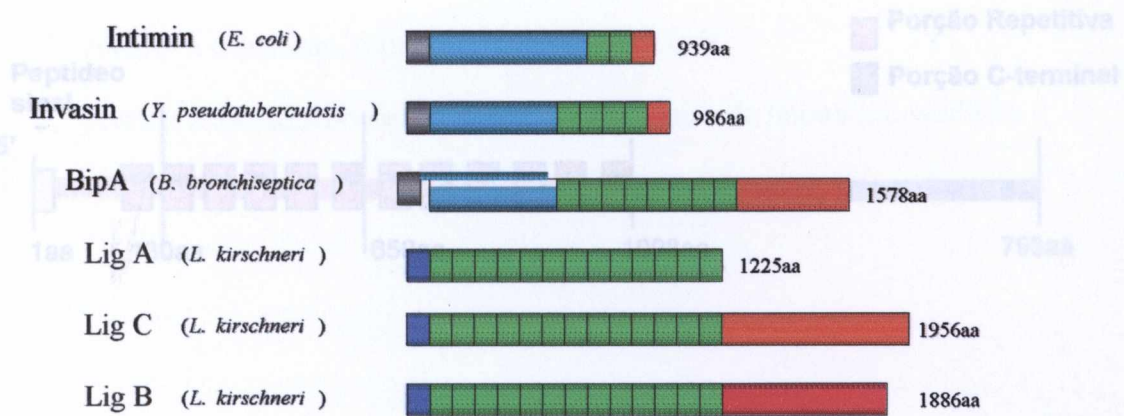


Figura 4. Mapa das regiões de Lig B, proteína que possui aproximadamente 1886 aminoácidos, dividida em uma parte inicial de 1098 aminoácidos, repetitiva, hereditária, e uma porção de

Figura 3: Proteínas “Bacterial Ig-like” de *Leptospira* e outras espécies.

(verde: domínios repetitivos; vermelho: porção carboxi-terminal).

Utilizando PCR, foi detectada a presença dos genes Ligs em *Leptospiras* patogênicas, mas não em *Leptospiras* saprofiticas. Lig C e Lig B possuem um domínio não repetitivo, carboxi-terminal, Lig C parece ser um pseudogene e todos os três genes codificam peptídeos sinais e sítios de clivagem para peptidase sinal, de acordo com o “lipobox” de espiroquetas previamente definidos (Zuerner *et al.*, 2000), sugerindo que as proteínas Ligs são lipoproteínas.

Duas porções do gene Lig B, uma contendo uma parte inicial de 1098 aminoácidos, repetitiva, e outra carboxi-terminal com 793 aminoácidos (Figura 4 abaixo), foram clonadas em vetor pRSETa (Invitrogen) e expressas como proteínas de fusão, His₆-LigB (porção repetitiva) e His₆-LigB (porção c-terminal). Após purificação, as proteínas foram armazenadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, para uso no presente projeto.

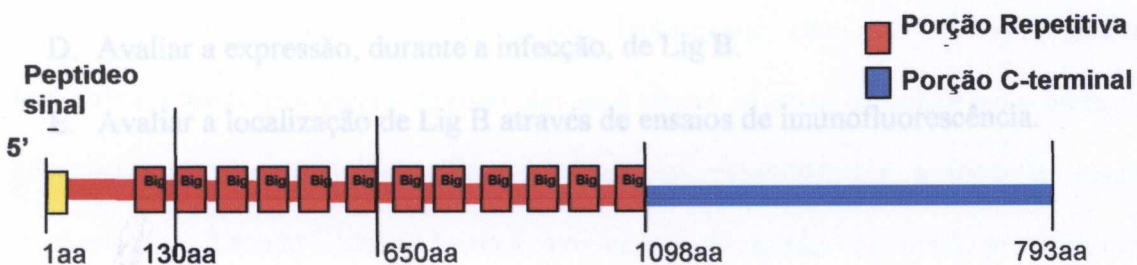


Figura 4. Mapa das regiões de Lig B, proteína que possui aproximadamente 1891 aminoácidos, dividida em uma parte inicial de 1098 aminoácidos, repetitiva, homóloga aos domínios de Imunoglobulinas e outra c-terminal de 793 aminoácidos.

2-Objetivos

2.1- Geral:

Avaliar antígenos recombinantes de leptospira com uso potencial para vacina.

2.2- Específicos:

- A. Padronizar e validar ensaios de antigenicidade, imunogenicidade e localização, utilizando antígenos recombinantes previamente caracterizados.
- B. Avaliar a antigenicidade do recombinante Lig B.
- C. Avaliar a imunogenicidade do recombinante Lig B.
- D. Avaliar a expressão, durante a infecção, de Lig B.
- E. Avaliar a localização de Lig B através de ensaios de imunofluorescência.

3-Racional e relevância

A leptospirose é a zoonose de maior distribuição mundial, atingindo principalmente países tropicais, onde representa um problema importante para saúde pública, com elevada taxa de letalidade (10%-50%) (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

A maior parte da letalidade acontece nas primeiras 24 horas de internação hospitalar, por isso, medidas terapêuticas ainda causam pouco impacto. Assim, tornam-se necessárias a implementação de medidas de saúde pública focalizadas em prevenção. As medidas preventivas tradicionais, como controle de roedores, são difíceis de implementar e outras medidas preventivas direcionadas aos problemas de infra-estrutura urbana, provavelmente não poderão ser desenvolvidas a curto ou médio prazo. Portanto, novas abordagens preventivas, como vacinas eficazes para seres humanos precisam ser desenvolvidas urgentemente.

Atualmente, vacinas licenciadas para leptospirose, para uso em seres humanos, estão disponíveis apenas para grupos de risco, devido a efeitos adversos comuns e a discordância quanto à eficácia destas vacinas. Além disso, em modelos experimentais, a proteção conferida com imunizações utilizando antígeno bruto é sorovar específica, não conferindo proteção cruzada para os diversos sorovares existentes (Adler & Faine, 1978).

Estratégias baseadas em antígenos recombinantes oferecem uma alternativa custo-efetiva e têm sido usadas para desenvolver vacinas licenciadas para uso na prevenção de outras doenças bacterianas. Em modelos experimentais, imunizações com determinantes protéicos, principalmente os associados com a membrana externa, têm mostrado respostas protetoras contra infecções com outras espiroquetas, como sífilis e doença de Lyme (Thanassi & Schoen, 2000). Em modelo experimental de leptospirose, a imunização com associação de antígenos recombinantes de

leptospira, LipL41 e OmpL1, conferiu resposta protetora parcial (Haake *et al.*, 1999). Com isso, surge a necessidade de avaliação e identificação de novos antígenos recombinantes, que possam representar candidatos para uma vacina segura e efetiva contra leptospirose.

O desenvolvimento de vacinas é um processo complexo que requer grande período de tempo e abordagem multidisciplinar. Para se conseguir uma vacina eficaz e segura para uso humano, várias etapas são necessárias durante seu desenvolvimento (Ellis, 2001).

Desde 1995, um grupo multidisciplinar do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz-Bahia, vem realizando vários projetos de pesquisa em leptospirose, tanto em epidemiologia (Ko *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2002), como em relação aos mecanismos imunobiológicos da doença (Flannery *et al.*, 2001; Guerreiro *et al.*, 2001; Barocchi *et al.*, 2002) criando assim as ferramentas necessárias para o desenvolvimento das etapas 1 e 2 do processo de desenvolvimento de uma vacina, conforme descrito na figura 5 abaixo.

Nesta dissertação de mestrado, será desenvolvida a etapa de seleção da tecnologia e dos antígenos para o desenvolvimento da vacina (etapa 3), que faz parte de um projeto bem mais extenso com as etapas seguintes programadas para o desenvolvimento subsequente.

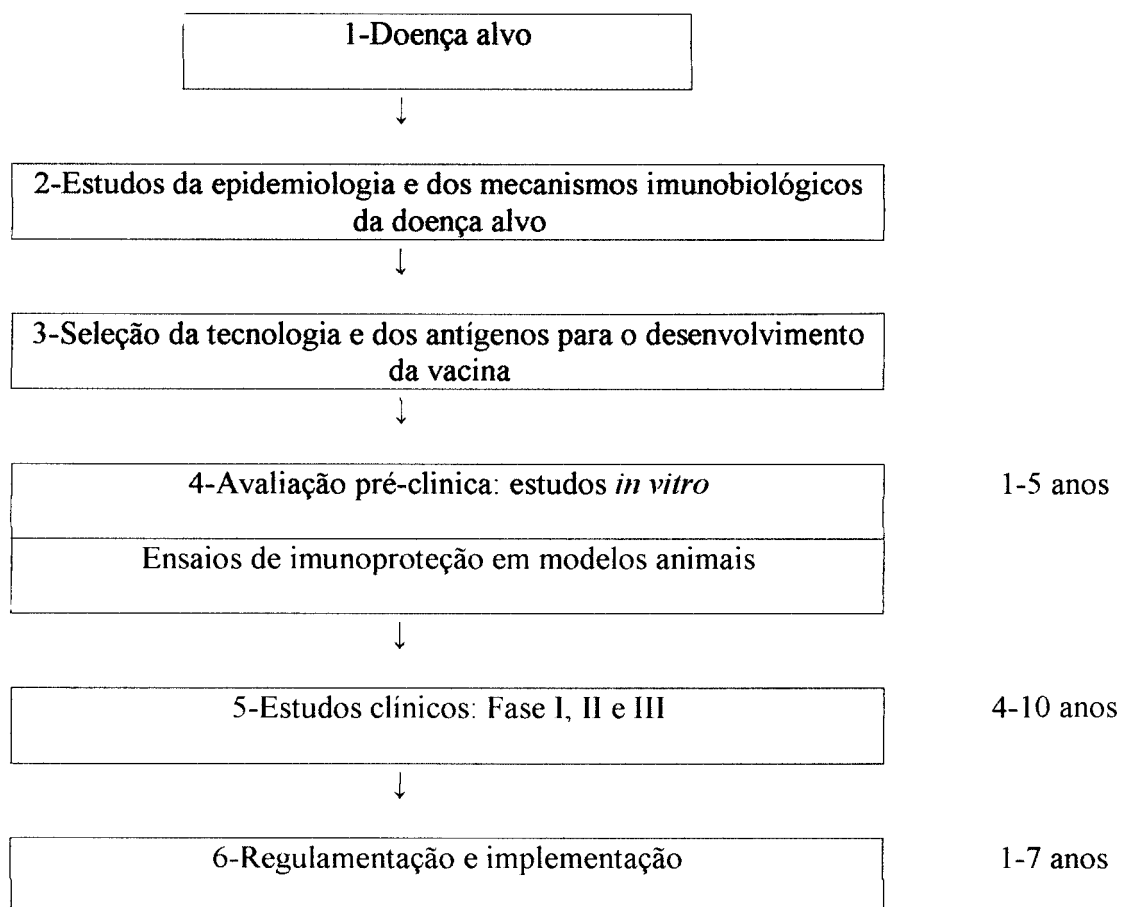


Figura 5: Estratégias e cronograma para desenvolvimento de vacina. Adaptado de Ellis, 2001.

Com o projeto genoma de *Leptospira* em andamento, ORFs (“open reading frame”) tem sido identificadas, e proteínas de superfície, alvos para vacina, podem ser selecionadas. Outras estratégias, como triagem de biblioteca genômica, têm sido utilizadas para identificação destes alvos. Em projeto anterior, no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, foram utilizados soros de pacientes com leptospirose para triagem de biblioteca genômica de leptospira, com intuito de identificar apenas clones expressos durante a infecção, sendo identificados genes que codificam proteínas Ligs (Leptospiral Ig-like).

Com a possibilidade de identificação de um grande número de antígenos, surge a necessidade da caracterização dos mesmos para seleção dos que possuem potencial para uso em vacina. Abordagens tipo “High Throughput” têm obtido sucesso na seleção de antígenos para desenvolvimento de vacina de sub-unidade, como no caso da *N.meningitidis* sorogrupo B (Pizza *et al.*, 2000).

Preferencialmente, antígenos imunodominantes e expressos na superfície são os principais candidatos. Em projeto anterior foi demonstrado que algumas proteínas, como LipL32 e GroEl , são imunodominantes, quando avaliados soros de pacientes com leptospirose, utilizando Western Blot contra antígeno bruto de *Leptospira* (Guerreiro *et al.*, 2001).

No presente projeto propomos realizar ensaios de antigenicidade e imunogenicidade em algumas proteínas já identificadas e caracterizadas, com as proteínas de superfície LipL32 e LipL41 e proteínas de choque térmico como GroEL e DNA K, validando assim os ensaios necessários para a caracterização de novos alvos, como a proteína Lig B identificada recentemente. Antígenos caracterizados através destes ensaios de antigenicidade e imunogenicidade serão selecionados posteriormente para testes de imunoproteção em modelo animal.

4-Metodologia

4.1 Manutenção e padronização de culturas de leptospira

4.1.1. Cepas utilizadas

Foi utilizada a cepa Fiocruz L1-130HRB4 de *L.interrogans* sorovar *Copenhageni*, isolada originalmente em hemocultura de paciente com leptospirose, do Hospital Couto Maia, em 1996. A cultura original foi mantida com sucessivos repiques e com recuperações sucessivas de virulência.

4.1.2. Manutenção das culturas

A manutenção das culturas de *Leptospira interrogans* foi realizada em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), em estufa BOD, à 29°C, conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde (Faine, 1982).

4.1.3. Crescimento e contagem

As culturas foram analisadas quanto ao crescimento e à ausência de contaminantes em microscopia de campo escuro. A contagem de leptospiros foi realizada em câmara de Petroff-Housser, utilizando leptospiros vivos e contagem de campos padronizados da câmara, com média de três contagens sucessivas para obtenção da concentração de leptospiros.

4.1.4. Atenuação

Para obtenção de cepa atenuada, sucessivos repiques em meio EMJH, na diluição de 1:10, foram realizados a cada sete dias.

4.1.5. Infecção em modelo experimental e recuperação de virulência

Para obtenção de cepa virulenta, foi realizado infecção de 06 hamsters (Golden Syrian), com 4 semanas de idade, com 1 ml de cultura de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, em meio líquido EMJH, na concentração de 10^8 leptospiras/ml, por via intraperitoneal. Os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas com microisoladores, segundo as normas de biossegurança para animais e observados diariamente para sinais de doença. No quinto dia, quando os animais apresentaram sinais de doença, como tremores, taquipnéia, dificuldade para deambulação, edema de pálpebras e queda de pelos, os mesmos foram anestesiados com associação de ketamina (200 mg/kg) com xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Foi realizado reisolamento da leptospira através de cultura de sangue (2 gotas de sangue em 5 ml de meio de cultura) e de tecido renal (deixado o rim macerado em 5 ml de meio de cultura por 1 hora e utilizado 1 ml do sobrenadante para semear em outro tubo contendo 5 ml de meio EMJH). Foi realizada também a retirada de fragmentos de rim e fígado, que foram fixados em formalina neutra a 10%, com posterior processamento e obtenção de blocos de parafina.

4.1.6. Histopatologia

Foram realizados cortes com 5 μ m dos blocos de parafina e coloração com hematoxilina e eosina para análises de alterações histológicas e coloração específica de Warthin-Starry, para visualização das leptospiras nos tecidos, segundo protocolo da Organização Mundial de Saúde (Faine, 1982).

4.1.7. Teste de virulência em modelo experimental

Para teste de virulência das cepas, foi utilizado experimento de dose letal 50%, em modelo animal utilizando hamsters. Grupos de 12 animais (6 fêmeas e 6 machos), infectados por via intra-

peritonal, com $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ leptospiras, foram mantidos em gaiolas com microisoladores por 28 dias, para observação diária. Os dados de mortalidade e sobrevivência foram analisados em curva de sobrevida, pelo método de Kaplan-Mayer, no programa estatístico SPSS.

4.1.8. Congelamento

Foi realizado o congelamento, em EMJH com glicerol a 10%, de 200 alíquotas destas cepas padronizadas, as quais foram congeladas e estocadas em nitrogênio líquido para uso futuro.

4.1.9. Produção de antígeno bruto para western blot

Para obtenção de antígeno bruto, foram utilizados 1000 ml de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, cepa virulenta L1.130HRB4, em meio EMJH. Foi realizada contagem das leptospiras em câmara de Petroff-Housser e após três centrifugações a 25.000 g por 15 min, a 4°C, o “pellet” formado foi ressuspensão em PBS diluído 1:1 em “tampão da amostra”, em volume para concentração final de 10^8 leptospiras em 5µl. A solução foi fervida por 10 min, com posterior acréscimo de Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) a 500 mM na diluição de 1:40 e as alíquotas foram estocadas a -20°C.

4.1.10. Produção de antígeno bruto para imunizações

Para obtenção de antígeno bruto, foram utilizados 1000 ml de cultura de *L. interrogans* sorovar copenhageni, cepa virulenta L1.130HRB4, em meio EMJH. Foi realizada contagem das leptospiras em câmara de Petroff-Housser e após três centrifugações a 25.000 g por 15 min, a 4°C, o “pellet” formado foi ressuspensão em PBS em volume para concentração final de 10^9 leptospiras/ml, colocado em banho-maria a 52°C por 20min, e estocada as alíquotas a -20°C.

4.2 Seleção dos antígenos recombinantes

Para este projeto foram utilizados antígenos recombinantes previamente identificados, clonados e purificados em projetos anteriores, no LPBM/Fiocruz-Bahia ou em outras instituições através de projetos em colaboração. Selecionamos algumas proteínas caracterizadas previamente, tanto de superfície, como proteínas de choque térmico, para servirem de controles na validação dos ensaios propostos, conforme descrito na tabela 1 abaixo.

Antígeno	Origem	Natureza	Nº do Genbank	Extensão do gene (pares de bases)	Peso molecular (kd)
LipL 31	CPqGM	Lipoproteína	*	2130	29
LipL 32	UFPel	Lipoproteína	AF245281	819	30
LipL 41	CPqGM	Lipoproteína	L46794	1068	39,1
GroEl	CPqGM	Proteína de choque térmico	L14682	1681	60,1
DnaK	I. Butantan	Proteína de choque térmico	AF007813	1476	54,1

Tabela 1. Proteínas selecionadas para este projeto. CPqGM: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; UFPel: Universidade Federal de Pelotas; I. Butantan: Instituto Butantan.

* ainda não depositado no genbank

Além disso, foram utilizados dois antígenos recombinantes de LigB: LigB–rep (porção repetitiva inicial) e LigB-ctd (porção c-terminal), com pesos moleculares de 57,2 kd e 22 kd, respectivamente, ainda não caracterizados.

4.3 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes LipL32 e Dna K foram enviadas pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e pelo Instituto Butantan, respectivamente, já purificadas, solubilizadas em tampão fosfato (PBS) e armazenadas a -20°C . As proteínas LipL31, LipL41, GroEl, LigB-rep e LigB-ctd foram purificadas anteriormente no LPBM-CPqGM, através de cromatografia de afinidade, utilizando Ni^{2+} -ácido nitrilotriacético-agarose (Pharmacia). Todas as amostras foram mantidas em PBS, contendo glicerol a 10% (v/v) e azida sódica a 0,025% (v/v) e armazenadas a -70°C .

4.3.1. Pureza e concentração

As proteínas purificadas foram avaliadas quanto à pureza através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e coloração com Comassie blue.

A determinação de suas concentrações foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford, onde em placa de ELISA foram colocados 10 μl das amostras a serem testadas e 10 μl de albumina sérica bovina (BSA) em concentrações conhecidas (1000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 62,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 31,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e acrescentado 200 μl de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) diluído 1:50 em PBS. Após 15 min, foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA a 570nm e calculadas as concentrações das amostras a partir da curva das densidades ópticas. Além disso, também foram determinadas as concentrações protéicas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, comparando visualmente as amostras, com concentrações sucessivas de BSA (1000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 62,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 31,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

4.4 Estudo de antigenicidade

Para caracterização dos antígenos purificados, realizamos experimentos de antigenicidade, através de imunoblots, onde o reconhecimento diferencial dos antígenos recombinantes por soro de pacientes infectados e soro de animais imunizados com leptospira cultivada, pôde identificar os antígenos expressos exclusivamente durante a infecção, e portanto, de maior interesse.

4.4.1. Soros testados

Foi realizado Western blot para cada antígeno recombinante, através do qual foram testados os seguintes soros:

- A. Pool de soros de 10 pacientes com diagnóstico confirmado para leptospirose (MAT \geq 800 ou aumento de 4 vezes nos títulos entre soro agudo e convalescente), diluído 1:100.
- B. Soro de indivíduo americano saudável (MAT negativo), diluído 1:100.
- C. Pool de soros de 05 ratos ou camundongos imunizados com antígeno bruto de leptospira, diluído 1:500.
- D. Soro pré-imune de rato ou camundongo, diluído 1:100.
- E. Pool de soros de 05 ratos capturados com cultura de urina positiva para leptospira e MAT positiva.
- F. Pool de soros de 05 ratos capturados com cultura de urina negativa para leptospira e MAT negativa.

4.4.2. Western blot

Foi realizada eletroforese, em gel unidimensional de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), onde as amostras, contendo 1 µg de antígeno para cada poço, foram solubilizadas em um “tampão da amostra”, contendo 62.5 mM de Tris-ácido clorídrico (pH6.8), glicerol a 10% (v/v), 2-mercaptoetanol a 5% (v/v), e Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% (p/v), fervidas por 10 minutos e separadas em sistema descontínuo, com posterior transferência para membranas de nitrocelulose com 0,45 µm (Osmonics). Foram utilizados 7 µl de uma solução com marcadores de peso molecular (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder- Invitrogen).

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em tampão TBS-T (0,05 M Tris pH 7.4 em associação com Tween 20 a 0,05% (v/v)) e incubadas por 1h em temperatura ambiente, com soros diluídos em TBS com leite desnatado a 5% (p/v). Após três lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários, diluídos a 1:1000 em TBS com leite a 5%, por 1 h, em temperatura ambiente. Utilizamos anti-IgG de rato, anti-IgG de camundongo e anti- IgG humano, conjugados com fosfatase alcalina (Sigma). Após duas lavagens com TBS-T e uma com TBS, a reação foi revelada utilizando NBT (Nitroblue Tetrazolium em dimetilformamida associado a cloreto de magnésio) e BCIP (5-Bromo 4-cloro 3-Idolil fosfato em dimetilformamida) (Bio-Rad) diluídos 1:300 em tampão de revelação (AP Development Buffer –Bio-Rad).

4.5 Estudo de imunogenicidade dos antígenos recombinantes

Para avaliar a capacidade de indução de produção de anticorpos e para produção de anticorpos policlonais que serão utilizados em outros experimentos, realizamos ensaio de imunogenicidade.

4.5.1 Imunização de ratos e camundongos

Para cada antígeno recombinante foram imunizados 05 camundongos Swiss e 02 ratos Wistars, de idade adulta. Foram utilizados 40 μg e 20 μg da proteína purificada, para ratos e camundongos respectivamente. Independente da concentração enviada de cada proteína, os volumes correspondentes a 40 μg e 20 μg foram homogeneizados com igual volume de adjuvante de Freund (Sigma), sendo utilizado o adjuvante completo na primeira imunização e o adjuvante incompleto nas doses subseqüentes. As imunizações foram realizadas nos dias 0, 15 e 30, com coleta de sangue pré-imune no dia 0 e imune no dia 40.

4.5.2 Coleta de soros pré-ímenes e pós-ímenes

Foram coletados soros pré-ímenes e pós-ímenes de todos os animais imunizados. Para coleta de soros pré-ímenes dos camundongos, foi utilizada punção do plexo ocular, sob anestesia com éter, e coleta de aproximadamente 300 μl de sangue e para os ratos, punção da veia dorsal da calda, com coleta de aproximadamente 500 μl de sangue. Para coleta de sangue pós-imune, foi realizado anestesia dos animais com associação de ketamina (25 mg/kg para rato e 50 mg/kg para camundongos) com xilazina (10 mg/kg para ratos e 50 mg/kg para camundongos) por via intra-

peritonal e posterior coleta do sangue total por punção cardíaca. O sangue coletado foi centrifugado a 56 g por 15 min a 4° C, para separação do soro, que foi aliqotado e estocado a -20° C.

4.5.3 Western blot para testar imunogenicidade

Para testar a imunogenicidade das proteínas recombinantes, testamos os soros pré e pós-
imunes, em diferentes diluições, em imunoblots utilizando membranas de nitrocelulose com os
respectivos antígenos recombinantes e com antígeno bruto de leptospira.

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%(SDS-PAGE), onde as amostras
foram solubilizadas e fervidas por 10 min em “tampão da amostra”, separadas em sistema
descontínuo, com transferência para membranas de nitrocelulose com 0,45 µm (Osmonics). Para os
géis com antígeno bruto foram utilizados volumes correspondentes a 10⁸ leptospiras para cada poço,
e para os géis com antígeno recombinante, 1 µg de antígeno para cada poço. Foram utilizados 7 µl
de uma solução com marcadores de peso molecular (BenchMark Pré-stained protein Ladder-
Invitrogen).

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em tampão
TBS-T e incubadas por 1h em temperatura ambiente, com soros diluídos em TBS acrescido de leite
a 5%. Os soros pré-imunes foram diluídos 1:50 e 1:100 e para os soros imunes foram realizadas
diluições seriadas de 1:50 até 1:5000. Após três lavagens com TBS-T, as membranas foram
incubadas com anticorpos secundários, diluídos 1:1000 em TBS associado a 5% de leite desnatado,
por 1 h em temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos anti-IgG de rato e anti-IgG de
camundongo conjugados com fosfatase alcalina (Sigma). Após duas lavagens com TBS-T e uma
com TBS, a reação foi revelada utilizando NBT (Nitroblue Tetrazolium em dimetilformamida com
cloreto de magnésio) e BCIP (5-Bromo 4-cloro 3-Idolil fosfato em dimetilformamida) (Bio-Rad)
diluídos a 1:300 em tampão de revelação (AP Development Buffer –Bio-Rad).

4.6. Avaliação da expressão de antígenos durante a infecção

Estudos prévios de Haake e colaboradores demonstraram que lipoproteínas de membrana externa de *Leptospira kirschineri* podem ser expressas durante a infecção em mamífero, como a LipL32 (Haake *et al.*, 2000) ou expressas apenas em cultura, com regulação negativa durante a infecção, como a LipL36 (Haake *et al.*, 1998).

Para avaliação da expressão durante a infecção dos antígenos em avaliação, foi realizado ensaio de imunohistoquímica em tecidos de animais infectados, utilizando anticorpos policlonais produzidos conforme descrito no item 4.5.1.

4.6.1. Imunohistoquímica

Foram realizados os cortes seriais de 5 µm dos blocos em parafina e colocados em lâminas com Poli-l-lysina (Sigma). A desparafinização e a hidratação dos cortes foram realizadas segundo os procedimentos recomendados. Os tecidos foram tratados com peróxido de hidrogênio a 5% em álcool metílico, por 20 minutos, para remoção da peroxidase endógena, seguido pelo tratamento para recuperação antigênica, utilizando tampão citrato por 30 minutos, a 90°C. Ligações não específicas foram bloqueadas com soro de cabra a 10% (v/v) em PBS, em temperatura ambiente por 30 minutos. A incubação com anticorpo primário durou 1 hora, em temperatura ambiente e foi utilizado soro imune de camundongos imunizados com os diversos antígenos recombinantes, em diluições em soro cabra a 10%(v/v) em PBS (soro pré-imune 1:100, soro anti- leptospira 1:1000, soro anti-GroEl 1:100, soro anti-LipL41 1:100, soro anti-LipL32 1:100, soro anti- LipL 31 1:100 e soro anti –LigB-Rep 1:50). Após três lavagens com PBS, realizou-se uma incubação com anti- IgG de camundongo biotilado (Vector) por 30 min em temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens

com PBS e incubação com conjugado streptavidina-peroxidase (Zymed) por 30 min em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS e posterior revelação com 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB kit - Zymed) por 3 min, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Haris por 30 segundos, desidratadas com álcool etílico e montadas.

4.7 Localização de antígenos na superfície da leptospira

Para demonstrar a localização de antígenos na superfície da leptospira, utilizamos os soros policlonais em dois experimentos de imunofluorescência. Em um experimento incubamos os soros com leptospiras vivas em suspensão, onde apenas os antisoros para proteínas de superfície serão positivos e no outro experimento, utilizamos leptospiras fixadas, onde qualquer antisoro pode ser positivo, independente da localização da proteína.

4.7.1 Imunofluorescência com leptospiras fixadas

Foram utilizados 300 µl de cultura de *L. interrogans* cepa L1.130HRB4.6 em meio EMJH, com 5-6 dias de crescimento. Após centrifugação a 1400 g, por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspenso com 1000 µl de soro fetal bovino (SFB) a 10% em PBS. Foram colocados 20 µl em lâminas cobertas com 5 µl de poly-L-lysina (Sigma) e deixados secar por 2 hs em temperatura ambiente, com posterior fixação das lâminas com metanol, por 10 min. Após secagem, as lâminas foram bloqueadas com 50 µl de SFB a 10% por 30 min e adicionados 50 µl de soro de rato ou camundongo, policlonal para os antígenos recombinantes, diluídos a 1:50 em SFB a 10% e deixados incubando por 1 h. Para controles negativos, foram utilizados soros pré-*imunes* diluídos a 1:50 e para controle positivo soro de rato ou camundongo anti-leptospira, diluído

a 1:100. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas, por 30 min, com anti-IgG de rato ou camundongo, conjugado com FITC, na diluição de 1:200 em PBS. Após três lavagens com PBS, foi utilizado p-fenilenodiamina em PBS a 10% (p/v) em glicerol a 10% (v/v) para montagem e conservação das lâminas.

4.7.2 Imunofluorescência com leptospiras vivas em suspensão

Foram utilizados 1000 µl de cultura de *L. interrogans* cepa L1.130HRB4.6, em meio EMJH, com 5-6 dias de crescimento. Após centrifugação a 1400 g, por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspenso com 100 µl de EMJH. Foram colocados 10 µl de cultura em lâminas com poli-L-lisina e sem deixar secar, incubados com 10 µl de soro policlonal de rato ou camundongo para os antígenos recombinantes, diluídos a 1:50 em EMJH por 1 hora. Para controles negativos, foram utilizados soros pré-ímmunes diluídos 1:50 e para controle positivo soro de rato ou camundongo, anti-leptospira diluído a 1:100. As lâminas foram lavadas levemente com meio EMJH, deixadas secar e fixadas com metanol, por 10 min. Foram Incubadas por 30 min com anti-IgG de rato ou camundongo, conjugado com FITC, na diluição de 1:200 em PBS. Após três lavagens com PBS, foi utilizada p-fenilenodiamina em PBS a 10%(p/v) em glicerol a 10% (v/v) para montagem e conservação das lâminas.

4.8 Expressão diferencial de antígenos em leptospiras virulentas

Para avaliação da expressão diferencial dos antígenos em leptospiras virulentas e atenuadas, foram utilizadas as duas metodologias descritas a seguir:

4.8.1 Imunofluorescência

Foi realizado experimento com leptospiRAS fixadas, conforme descrito no item 4.7.1. Foram comparadas uma cultura virulenta, com 6 repiques, com uma cultura atenuada, com mais de 50 repiques. Foram testados soros policlonais de camundongos ou ratos e soros pré-ímenes como controles negativos.

4.8.2 Imunoblot com cultura virulenta e atenuada

Foram realizados imunoblots utilizando antígeno bruto da cultura virulenta e antígeno bruto de cultura atenuada. As membranas de nitrocelulose foram testadas com os mesmos soros e os respectivos soros pré-ímenes como controles negativos. O anticorpo secundário e a revelação da reação estão descritos no item 4.5.3 acima.

5- Resultados

5.1– Padronização das culturas

Para padronização de culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni a serem utilizadas em experimentos de imunofluorescência e para produção de antígeno bruto, foi realizada recuperação de virulência, com obtenção de cepa virulenta e repiques semanais, para obtenção da cepa atenuada.

Para a cepa virulenta, realizaram-se quatro passagens em hamster, sendo denominada L1.130HRB4.3 e testado sua virulência, em experimento de dose letal 50% (DL50%). Neste experimento, os animais foram a óbito a partir do 4º dia de infecção, até o 18º dia e a DL 50% ficou entre 10^4 e 10^5 , conforme demonstrado na tabela 2 e nas figuras 6 e 7, a seguir.

Tabela 2 - Experimento de dose letal 50%

Concentração de Leptospiras	Sexo/Nº	letalidade	Sexo/Nº	letalidade
10^7	F/6	100%	M/6	100%
10^6	F/6	100%	M/6	100%
10^5	F/6	100%	M/6	100%
10^4	F/6	0%	M/6	50%

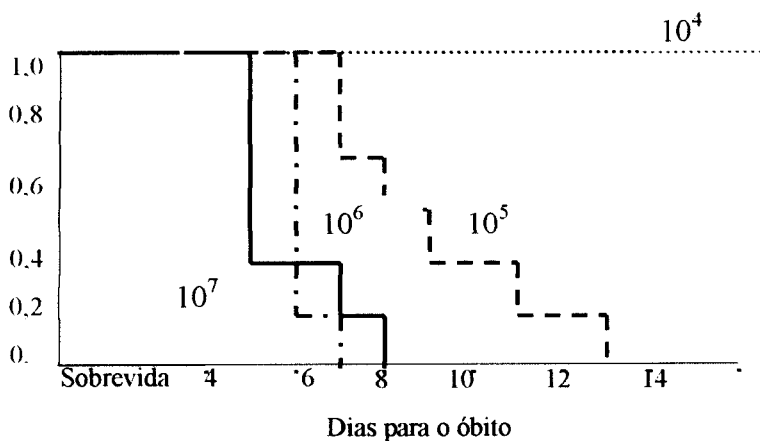


Figura 6. Dose letal 50%, curva de sobrevivida (fêmeas).

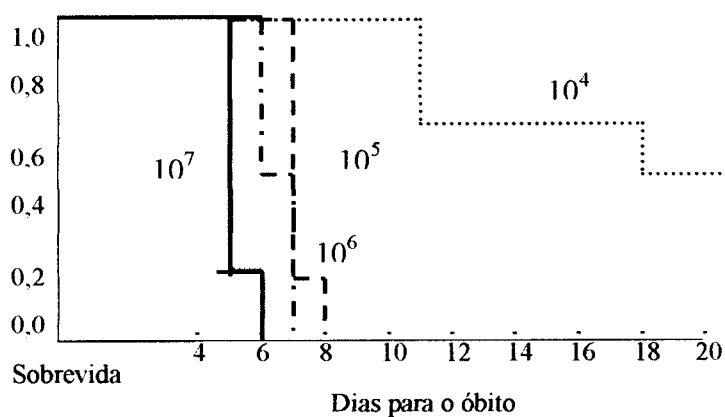


Figura 7. Dose letal 50%, curva de sobrevivida (machos).

A cepa atenuada foi obtida após 50 repiques, sendo denominada L1.130HRB4.50. Em experimento de dose letal 50%, a infecção de hamsters com esta cepa não causou óbito, em animais infectados com dose de 10^7 leptospira, após 28 dias de observação.

5.2 – Pureza e concentração das proteínas recombinantes:

Com relação à pureza, todos antígenos testados foram visualizados em gel de poliacrilamida corado com Comassie blue e continham apenas uma banda bem delimitada, conforme demonstrado na figura 8.

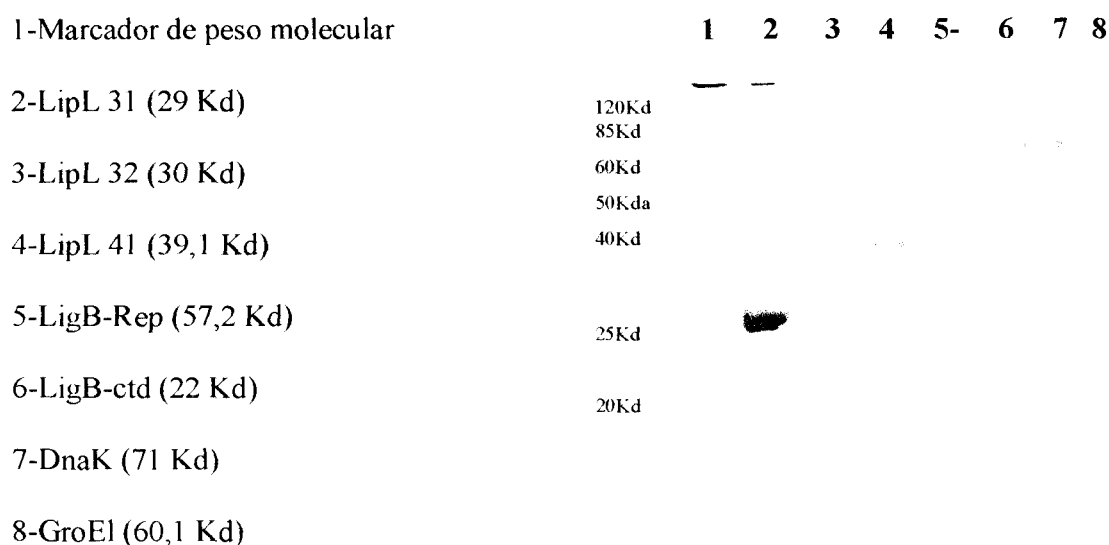


Figura 8: SDS-PAGE mostrando eletroforese das proteínas recombinantes purificadas, coradas com Comassie blue para avaliação da pureza.

A quantificação das concentrações das proteínas recombinantes purificadas está demonstrada na tabela 2.

Tabela 2: – Avaliação de pureza e concentração de antígenos recombinantes de *Leptospira*.

Ag. Recomb.	Local da purificação	Lote	Dosagem Protéica por Bradford	Dosagem Protéica por SDS-PAGE	Peso molecular estimado	Peso meolecular observado
LipL 31	LPBM	1	200 µg/ml	200 µg/ml	29	30
LipL 41	LPBM	1	200 µg/ml	200 µg/ml	39,1	58
	LPBM	2	540µg/ml	500µg/ml	39,1	45
LipL 32	UFPcl	1	900 µg/ml	1000µg /ml	30	38
	LPBM	2	1021µg/ml	1000µg/ml	30	40
	UFPcl	3	996µg/ml	1000µg/ml	30	35
GroEL	LPBM	1	200 µg/ml	250µg/ml	60,1	61
DNA K	I.Butantan	1	335µg/ml	300µg/ml	71	92
LigB- Rep	LPBM	1	150 µg/ml	100 µg/ml	57,2	72
	LPBM	2	200 µg/ml	250µg/ml	57,2	58
	LPBM	3	517,8µg/ml	500µg/ml	57,2	58
LigB-ctd	LPBM	2	121µg/ml	125µg/ml	22	25
	LPBM	3	59,33µg/ml	31µg/ml	22	25

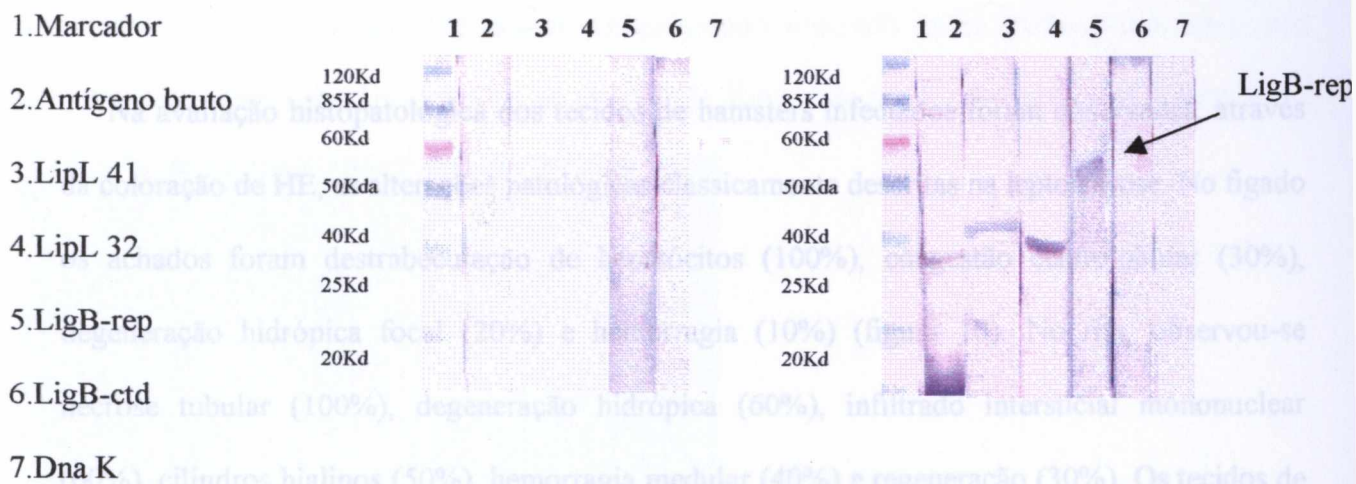
5.3 – Experimentos de antigenicidade

Todos os antígenos recombinantes foram testados em ensaio de antigenicidade utilizando *Western blot*, testando soros de pacientes com leptospirose para demonstração de expressão durante a infecção e soros de ratos imunizados com antígeno de leptospirosas cultivadas para demonstrar a expressão “*in vitro*”.

Conforme mostrado na figura 9 a seguir, o soro humano normal e soro de rato pré-imune não reconheceram nenhum antígeno. Os antígenos recombinantes LipL31, LipL32, LipL41, GroEl e DnaK foram reconhecidos tanto pelos soros de ratos imunizados, como pelos soros de pacientes com leptospirose. No entanto, LigB-rep só foi reconhecida por soros de pacientes, sugerindo que esta proteína deve ser expressa diferencialmente durante a infecção natural. LigB-ctd não foi reconhecida por nenhum soro.

A- Soro humano normal

B- Soro de paciente com leptospirose



C- Soro de rato pré-imune

D- Soro de rato imunizado com leptospiros

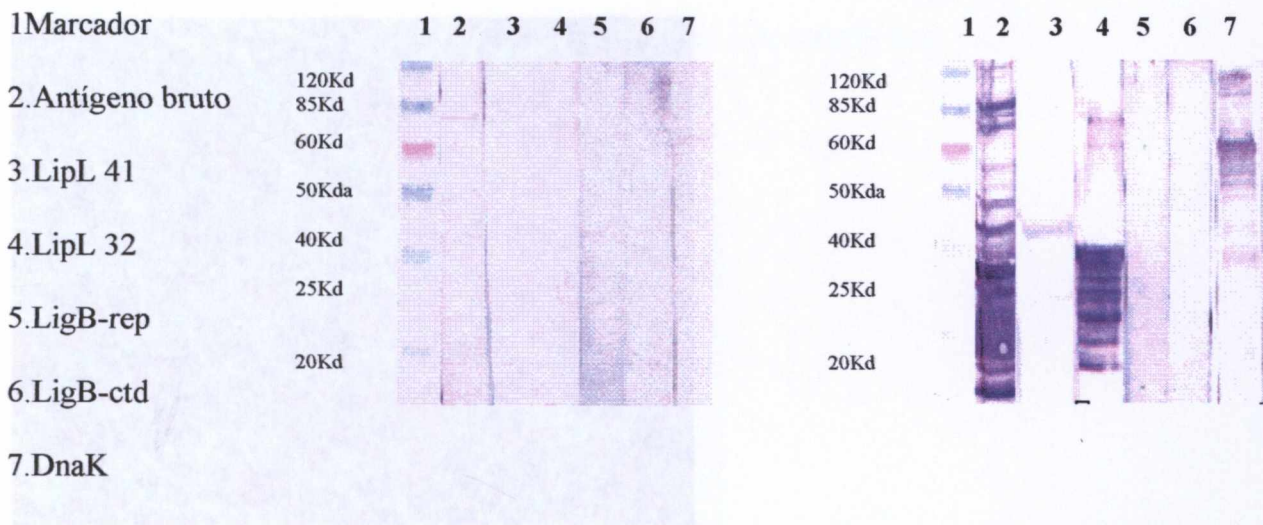


Figura 9: *Western blot* utilizando antígenos recombinantes e os seguintes soros: soro humano normal (A), pool de soros de pacientes com leptospirose (B), soro de rato pré-imune e pool de soros de ratos imunizados com antígeno bruto.

5.4- Histopatologia e imunohistoquímica

Na avaliação histopatológica dos tecidos de hamsters infectados foram observadas, através da coloração de HE, as alterações patológicas classicamente descritas na leptospirose. No fígado os achados foram destrabeculação de hepatócitos (100%), congestão centrolobular (30%), degeneração hidrópica focal (20%) e hemorragia (10%) (figura 10). No rim, observou-se necrose tubular (100%), degeneração hidrópica (60%), infiltrado intersticial mononuclear (60%), cilindros hialinos (50%), hemorragia medular (40%) e regeneração (30%). Os tecidos de hamster não infectado (controle negativo) não apresentaram nenhuma das alterações descritas acima.

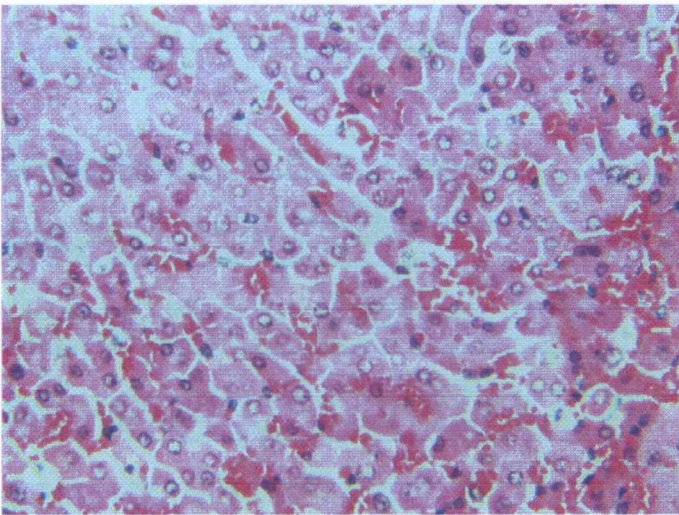


Figura 10: Fígado de hamster infectado com *L. interrogans*. Coloração de HE evidenciando destrabeculação de hepatócitos e congestão. Microscopia óptica, 20x.

Em lâminas de fígado coradas com Warthin-Starry foi observada a presença de *Leptospiras* em 100% dos casos (figura 11), assim como quando utilizado imunohistoquímica com soro policlonal anti-leptospira (antígeno bruto) (figura 12). Em tecido renal, a bactéria não foi detectada.

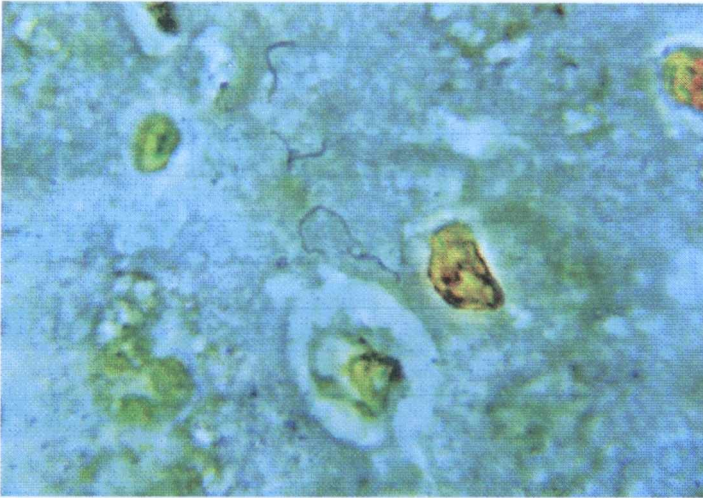


Figura 11: Fígado de hamster infectado com *L. interrogans*, coloração de Warthin-Starry, evidenciando presença de leptospiras. Microscopia de contraste de fase, 1250x.

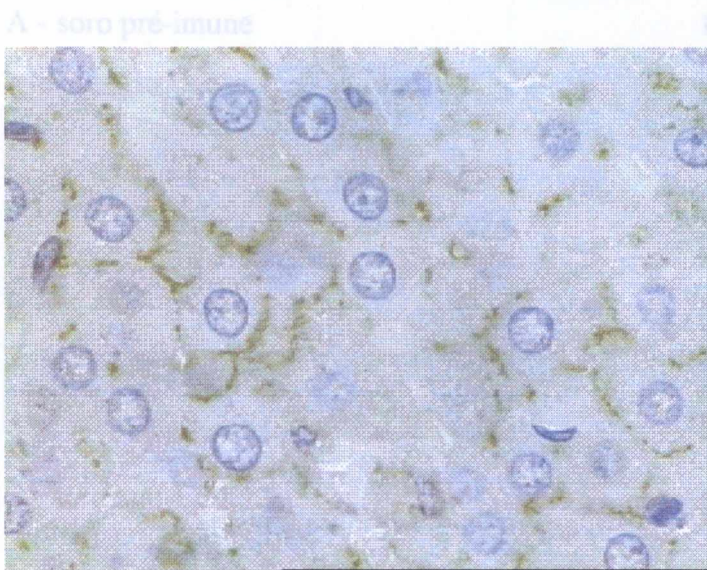
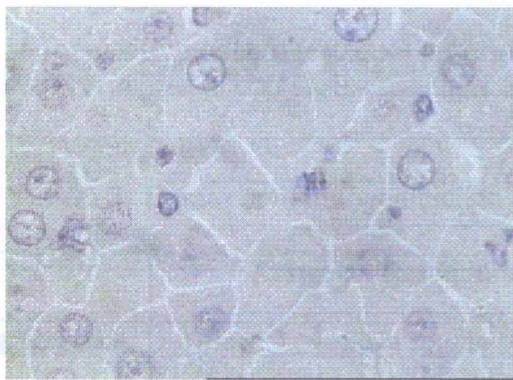


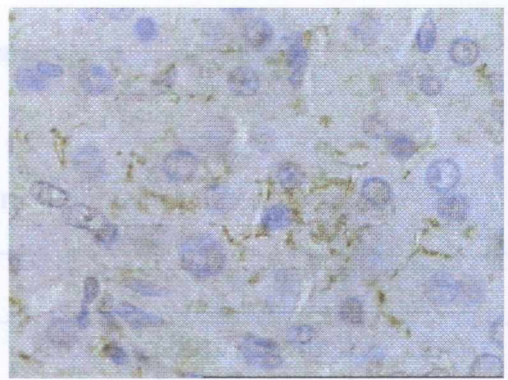
Figura 12: Fígado de hamster infectado com *L. interrogans*. Imunohistoquímica utilizando soro policlonal anti-leptospira, 100x.

3.5- Após a detecção de leptospiros no tecido hepático, foi realizado imunohistoquímica em lâminas de fígado, utilizando anti-soros para os antígenos recombinantes, com intuito de detectar a presença das referidas proteínas durante a infecção animal.

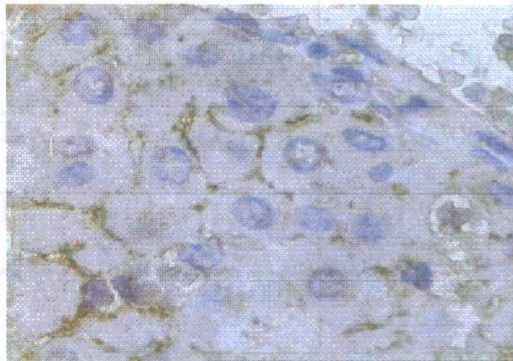
Os antisoros para LipL32 e LipL41 foram positivos, no entanto anti-LigB-rep e anti-LigB-ctd foram negativos neste experimento, conforme mostra a figura 13 abaixo.



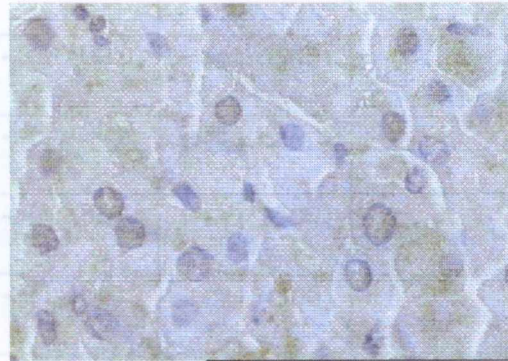
A - soro pré-imune



B - soro anti-LipL41



C - soro anti-LipL32



D - soro anti-LigB-rep

Figura 13: Imunohistoquímica em fígados de hamsters infectados. A-soro pré-imune, B- soro anti-LipL41, C-soro anti-LipL32 e D- soro anti-LigB-rep. 100x

5.5- Experimentos de imunogenicidade

Para avaliação de imunogenicidade dos antígenos recombinantes, os soros de ratos e camundongos imunizados e pré-ímenes foram testados em *western blot*. Todos os antígenos foram imunogênicos, com altos títulos de detecção de anticorpos, conforme demonstrado na tabela 3 e figura 14 abaixo. Quando testados usando antígeno bruto de leptospira, também houve reconhecimento da banda específica de cada antígeno recombinante, com exceção de LigB-ctd que só foi positivo quanto testado o próprio antígeno recombinante.

Tabela 3- Ensaio de imunogenicidade dos antígenos recombinantes de *L.interrogans*.

Ag. Recomb.	Antígeno. Recombinante			Antígeno. Bruto de Leptospira		
	Soro Pré-ímine	Soro Imune	Peso molecular observado	Soro Pré-ímine	Soro Imune	Peso molecular observado
LipL 31	- (1:100)	+ (\geq 1:6500)	38	- (1:100)	+ (\geq 1:6500)	37
LipL 41	- (1:100)	+ (\geq 1:6500)	45	- (1:100)	+ (\geq 1:6500)	45
LipL 32	- (1:100)	+ (\geq 1:2500)	28	- (1:100)	+ (\geq 1:2500)	36
GroEL	- (1:100)	+ (\geq 1:9500)	67	- (1:100)	+ (\geq 1:9500)	68
LigB-rep	- (1:100)	+ (\geq 1:2500)	65	- (1:100)	+ (\geq 1:2500)	63
LigB-ctd	- (1:100)	+ (\geq 1:5000)	27	- (1:100)	- (1:100)	NSA
DnaK	- (1:100)	+ (\geq 1:6500)	86	- (1:100)	+ (\geq 1:6500)	87

* As diluições utilizadas aparecem entre parênteses. NSA: não se aplica.

5.6.1 – Expressão de LigB durante a infecção

1- Marcador de peso molecular

2- Soro de rato pré-imune para LipL41 (1:100)

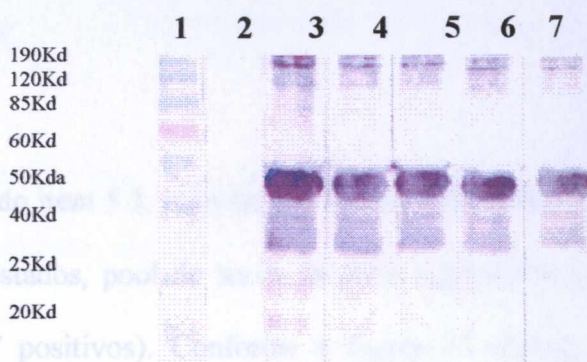
3- Soro de rato imune para LipL41 (1:2500)

4- Soro de rato imune para LipL41 (1:3500)

5- Soro de rato imune para LipL41 (1:4500)

6- Soro de rato imune para LipL41 (1:5500)

7- Soro de rato imune para LipL41 (1:6500)



1-Pool de soro de pacientes com leptospirose.

Figura 14: Western Blot com antígeno recombinante LipL41, testando imunogenicidade com soros anti- LipL41 em diluições crescentes.

4-Pool de soros de ratos capturados com

5.6 – Caracterização de LigB

5-Pool de soro de ratos imunizados com

antígeno bruto de *L. interrogans*

6-Soro de rato pré-imune

Como observado no experimento de antigenicidade 5.3, o antígeno recombinante LigB-rep, foi reconhecido apenas pelo soro de pacientes com leptospirose, sugerindo que esta proteína deve estar sendo expressa diferencialmente durante a infecção. Para reforçar esta hipótese, realizamos novos experimentos de western blot e ensaios de imunofluorescência.

5.6.2 – Expressão de LigB em cultura virulenta e atenuada

Para avaliação da expressão de LigB em cultura virulenta e atenuada, foram realizados experimentos comparativos, de *Western blot* e imunofluorescência.

5.6.1 – Expressão de LigB durante a infecção

Para reforçar o experimento de antigenicidade do item 5.3, repetimos o *Western Blot* com o recombinante LigB-rep e acrescentamos aos soros testados, pool de soros de ratos capturados e infectados com leptospira (cultura de urina e MAT positivos). Conforme a figura 15 abaixo, obtivemos reconhecimento de LigB-rep, apenas nos soros de pacientes e ratos infectados, reforçando a idéia da expressão aumentada desta proteína durante a infecção.

- 1-Pool de soro de pacientes com leptospirose.
- 2- Pool de soro de pacientes com leptospirose.
- 3-Soro de indivíduo sadio.
- 4-Pool de soros de ratos capturados com cultura de urina positiva para *L. interrogans*.
- 5-Pool de soro de ratos imunizados com antígeno bruto de *L. interrogans*.
- 6-Soro de rato pré-imune.

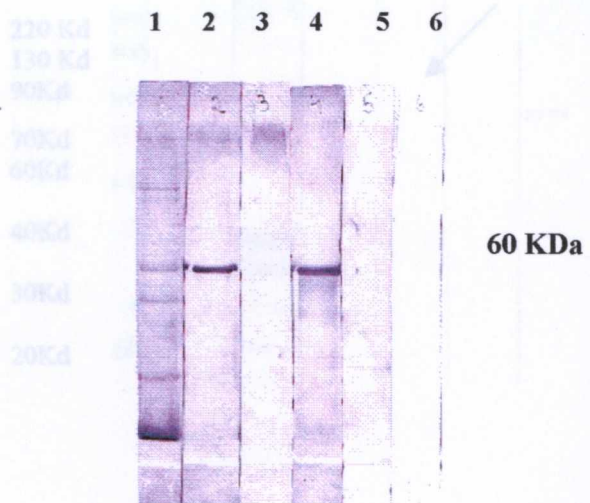


Figura 15. *Western Blot* com antígeno bruto (1) e LigB-rep (2-6), mostrando que LigB-rep só é reconhecida pelo pool de soros de pacientes e ratos infectados.

5.6.2 – Expressão de LigB em cultura virulenta e atenuada

Para avaliação da expressão de LigB em cultura virulenta e atenuada, foram realizados experimentos comparativos, de *Western blot* e imunofluorescência.

5.6.2.1 Western blot comparando antígeno de cultura virulenta com atenuada

Conforme a figura 16 abaixo, quando comparamos o experimento utilizando antígeno bruto de leptospira virulenta com antígeno de leptospira atenuada, observamos a detecção de LigB-rep apenas na *western blot* com a cepa virulenta.

Tabela A-Cultura virulenta com *L.interrogans* fixadas B-Cultura atenuada

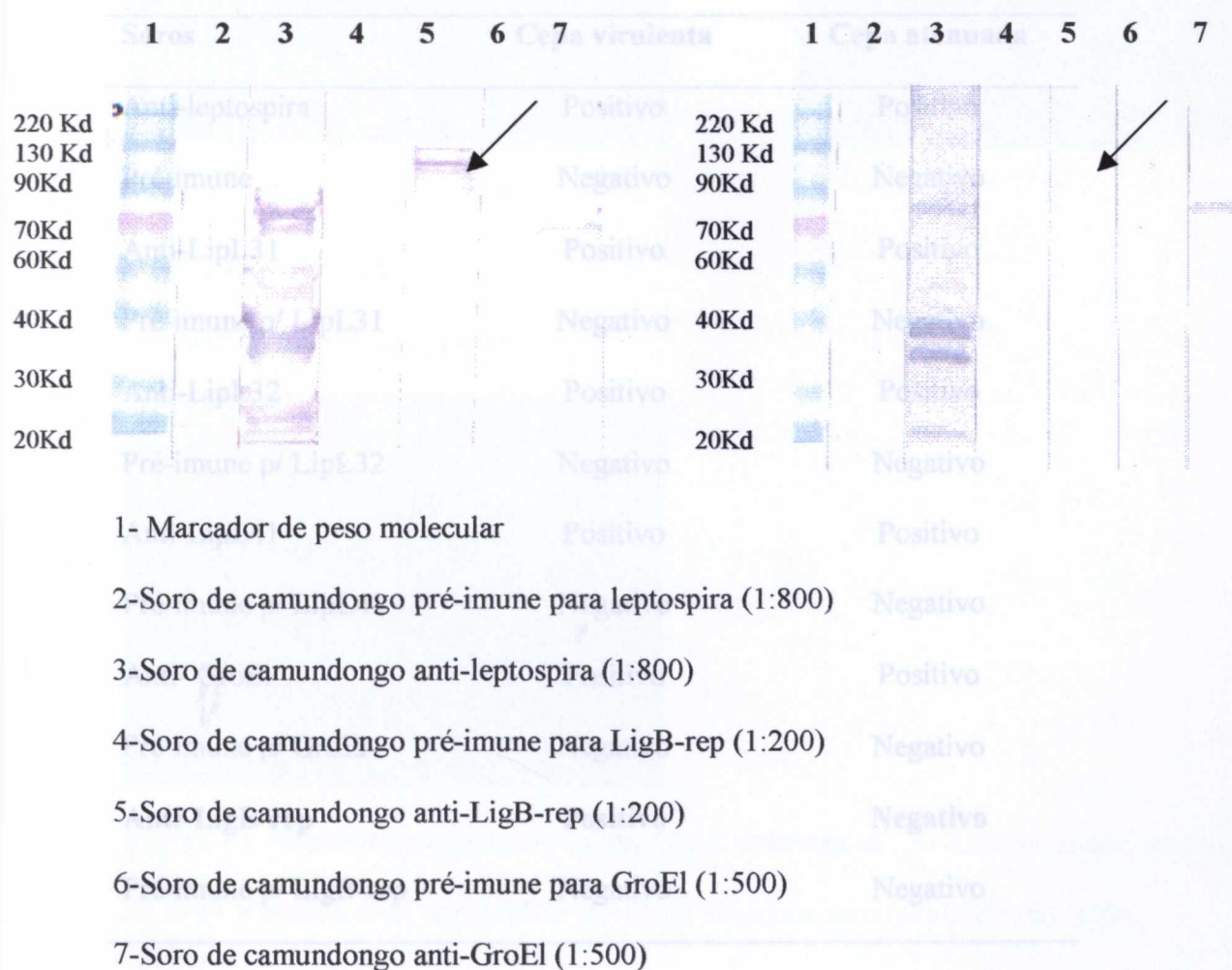


Figura 16. Western blot com antígeno bruto de *L.interrogans* cepa virulenta (A) e cepa atenuada (B), mostrando expressão de LigB-rep apenas em antígeno de cultura virulenta.

5.6.2.2 Imunofluorescência comparando cultura virulenta e cultura atenuada.

O mesmo resultado foi confirmado utilizando imunofluorescência (IF) com culturas de *L.interrogans* cepa virulenta e cepa atenuada, fixadas com metanol, conforma demonstrado na tabela 4 abaixo e figura 17 a seguir.

Tabela 4: Imunofluorescência com *L.interrogans* fixadas com metanol.

Soros	Cepa virulenta	Cepa atenuada
Anti-leptospira	Positivo	Positivo
Pré-imune	Negativo	Negativo
Anti-LipL31	Positivo	Positivo
Pré-imune p/ LipL31	Negativo	Negativo
Anti-LipL32	Positivo	Positivo
Pré-imune p/ LipL32	Negativo	Negativo
Anti-LipL41	Positivo	Positivo
Pré-imune p/ LipL41	Negativo	Negativo
Anti- GroEl	Positivo	Positivo
Pré-imune p/ GroEl	Negativo	Negativo
Anti-LigB-rep	Positivo	Negativo
Pré-imune p/ LigB-rep	Negativo	Negativo

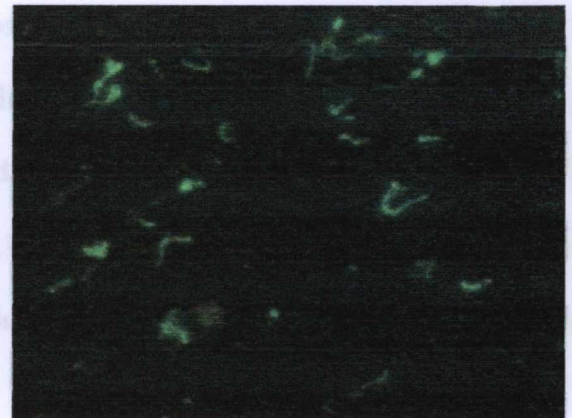
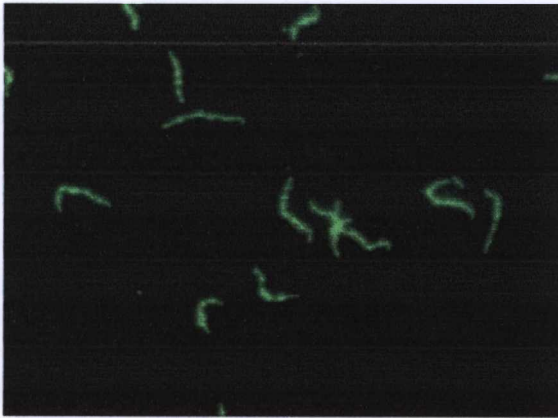
5.6.3- Localização de LigB na superfície da *Leptospira*

A - Cultura virulenta

B - Cultura atenuada

Soro de rato anti-LipL41

Soro de rato anti-LipL41



C - Cultura Virulenta

Soro de rato anti-LigB-rep

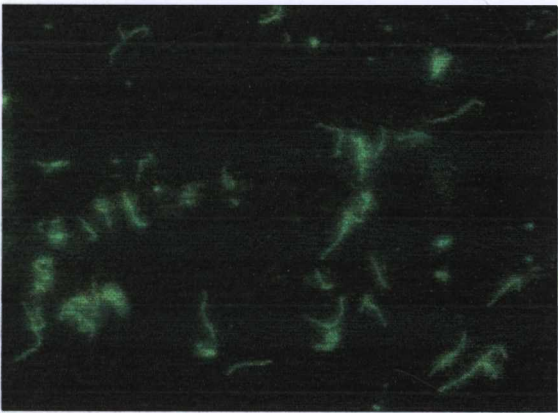


Figura 17: Imunofluorescência de culturas de *L. interrogans*. A- Cepa virulenta, soro anti-LipL41.

B- Cepa atenuada, soro anti-LipL41. C- Cepa virulenta, soro anti-LigB-rep. 100x.

5.6.3- Localização de LigB na superfície da Leptospira

Neste experimento, comparamos leptospiros fixadas, onde com exceção do controle negativo, todos os antisoros testados foram positivos, com leptospiros em suspensão, onde apenas os antígenos de superfície são reagentes. Na imunofluorescência em suspensão, LipL 41 e LipL32, sabidamente lipoproteínas localizadas na superfície da membrana externa, serviram como controles positivos e GroEl, proteína de choque térmico e LipL 31, lipoproteína localizada na membrana interna, como controles negativos. O anticorpo policlonal anti-LigB-rep foi positivo no experimento utilizando leptospiros em suspensão, inferindo a localização desta proteína na superfície da leptospira, conforme tabela 5 abaixo.

Tabela 5- Imunofluorescência em leptospiros fixadas e em suspensão para localização de LigB

Soros	Leptospiros fixadas		Leptospiros em suspensão	
	Soro pré- imune	Soro imune	Soro pré- imune	Soro imune
Anti-LipL 31	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Anti-LipL 32	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Anti-LipL 41	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Anti-GroEl	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Anti-LigB-rep	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo

6- Discussão

Como parte inicial de um projeto para desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose, realizamos o trabalho descrito nesta dissertação para identificar e caracterizar antígenos recombinantes de leptospira candidatos à vacina.

Assim, nesta dissertação, padronizamos ensaios de antigenicidade, imunogenicidade e localização, utilizando algumas proteínas já caracterizadas previamente, como proteínas de superfície LipL41 e LipL32 (membrana externa), LipL31 (membrana interna), e proteínas citoplasmáticas, GroEl, e DnaK. Os resultados encontrados nos experimentos realizados com relação à antigenicidade de LipL31, LipL32, LipL41, GroEl e DnaK, foram semelhantes aos descritos previamente (Ballard *et al.*, 1993; Ballard *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 1999; Haake *et al.*, 2000; Haake & Matsunaga, 2002), validando assim nossos experimentos e permitindo a caracterização de LigB, proteína identificada recentemente (Matsunaga, 2003).

Além disso, com o sequenciamento do genoma da leptospira depositado no GenBank recentemente, teremos acesso a informações necessárias para identificação de várias proteínas, e estratégias tipo “High Throughput” para seleção dos potenciais alvos para vacina, como foi realizado no desenvolvimento de vacina para *N. meningitidis* sorogrupo B (Pizza *et al.*, 2000), podem ser implementadas.

As Proteínas Ligs possuem homologia com proteínas de outras bactérias, como intimina e invasina, que funcionam como fatores de virulência de *E. coli* enteropatogênica (Luo *et al.*, 2000) e *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg *et al.*, 1987; Hamburger *et al.*, 1999) respectivamente, e atuam principalmente em mecanismos de adesão e invasão celular. Com isso surgiu a hipótese de que as proteínas Ligs fossem fatores de virulência das leptospiros, tornando-se candidatas potenciais para

uso em vacina, uma vez que a capacidade de adesão e invasão de leptospiras parece estar relacionada com sua patogenicidade (Merien *et al.*, 1997).

Para a caracterização de LigB, algumas questões foram levantadas. Um provável fator de virulência e um bom candidato para uso em vacina deveria ter as seguintes características: ser expresso durante a infecção do hospedeiro, ser expresso em leptospiras virulentas e estar localizado na superfície da bactéria.

Devido à estratégia utilizada para selecionar os clones de Ligs, os mesmos foram reconhecidos por soros de pacientes e supostamente estão sendo expressos durante a infecção. No entanto, para confirmar esta hipótese, realizamos imunoblots onde a porção repetitiva da proteína recombinante LigB foi testada contra o soro de pacientes e ratos naturalmente infectados e soro de ratos imunizados com leptospiras cultivadas. Nestes experimentos, LigB só foi reconhecida por soros de animais infectados e de pacientes, sugerindo que a regulação de mesma está aumentada durante a infecção.

Ainda no que diz respeito à expressão de LigB durante a infecção, realizamos imunohistoquímica com anticorpos policlonais para detectar a presença da proteína em tecido de animal infectado experimentalmente. Detectamos a presença de LipL32 e LipL41, conforme descrito previamente (Barnett *et al.*, 1999), porém não detectamos a presença esperada de LigB. Uma das explicações para este resultado seria a utilização de tecidos de animais em fase tardia de doença e que talvez LigB só esteja sendo expressa na fase inicial da doença, ou problemas relacionados com a técnica de recuperação antigênica do experimento, uma vez que quando empregado tratamento enzimático com tripsina, LipL41 também foi negativo, apenas mostrando positividade quando utilizado tratamento com calor (dados não mostrados).

Um dos resultados mais importantes foi com relação à expressão de LigB em leptospiras virulentas. Tanto no ensaio utilizando imunoblot com antígeno de cepa virulenta e atenuada, como

no ensaio de imunofluorescência utilizando culturas virulentas e atenuadas, LigB estava relacionada com a virulência da bactéria. A perda da capacidade da cultura atenuada, após sucessivos repiques, de causar infecção letal em hamsters, foi associada com a perda da expressão de LigB. Enquanto a maioria das proteínas de leptospira são expressas tanto em culturas virulentas como atenuadas (Haake *et al.*, 1991), LigB perdeu sua expressão com atenuação, sugerindo estar correlacionada com a patogênese da leptospirose.

Ainda através de ensaios de imunofluorescência, utilizamos leptospirosas fixadas e leptospirosas vivas em suspensão, para incubação com anticorpos policlonais. LigB foi detectada em ambas condições, assim como LipL32 e LipL41, sabidamente localizadas na membrana externa das leptospirosas (Shang *et al.*, 1996; Haake *et al.*, 2000). A proteína citoplasmática GroeEl, e LipL31, localizada na membrana interna, foram detectadas apenas em leptospirosas fixadas, sugerindo assim uma localização superficial na membrana externa para LigB. Estes achados foram reforçados com ensaios realizados com microscopia eletrônica imunomarcada (Matsunaga, 2003), onde anticorpos anti-LigB e anti-LPS foram detectados na superfície da membrana externa de *L.kirschneri* cepa RM52 e anti-GroeEl detectado apenas no citoplasma da bactéria.

Os dados de caracterização de LigB, demonstrados nesta dissertação, sugerem que esta proteína pode ser uma candidata promissora para uso no desenvolvimento de uma vacina eficaz para leptospirose. Entretanto, outras construções de LigB e LigA também devem ser testadas, assim como um sistema de expressão da proteína recombinante associada à membrana, uma vez que a utilização de proteínas de fusão His₆ para testes de vacina pode não ser a melhor opção. No estudo que evidenciou imunoproteção sinérgica para a associação LipL41 com OmpL1 (Haake *et al.*, 1999), só houve proteção quando utilizadas proteínas expressas em membrana de *E.coli*, não sendo observado os mesmos resultados para proteínas recombinantes His₆. Algumas considerações podem explicar estas diferenças: os mecanismos de imunidade humoral podem ser mais importantes do que

imunidade celular para proteção contra leptospirose; o reconhecimento de epitopos conformacionais pode ser mais importante na ligação de anticorpos com as proteínas nativas OmpL1 e/ou LipL41 na superfície de leptospirosas ou epitopos conformacionais podem necessitar de associação com a membrana ou com componentes da membrana como o LPS (Haake *et al.*, 1999).

Ainda como direções futuras, após seleção de antígenos, os mesmos serão testados em modelo de imunoproteção animal, utilizando hamsters. Para isso, a padronização do modelo animal a ser utilizado encontra-se em andamento, com utilização de imunizações com antígeno bruto mostrando 100% de proteção para desafio com cepa homóloga (dados não mostrados), como descrito previamente (Zeigler *et al.*, 1976; Zeigler *et al.*, 1978). Após validação do modelo animal de imunoproteção, os antígenos selecionados serão testados, assim como diferentes tipos de adjuvantes.

7-Conclusões

- Os resultados de antigenicidade, imunogenicidade e localização dos antígenos previamente caracterizados validaram a padronização dos nossos ensaios, permitindo assim a caracterização de novos antígenos.
- A caracterização realizada da proteína LigB sugere sua expressão diferencial durante a infecção do hospedeiro.
- A proteína LigB está expressa em culturas de leptospiros virulentas, fortalecendo a hipótese de ser um fator de virulência das leptospiros patogênicas.
- Quanto a localização, foi demonstrado que LigB está na superfície da membrana externa das leptospiros.
- Por ser imunogênica, estar expressa durante a infecção, estar presente em cepas virulentas e estar localizada na superfície, LigB representa um candidato com grande potencial para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.

8-Referências bibliográficas

Abdulkader RC. Acute renal failure in leptospirosis. *Ren Fail.* 19: 191-8, 1997.

Abdulkader RC, Seguro AC, Malheiro PS, Burdmann EA, Marcondes M. Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 54: 1-6, 1996.

Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun.* 17: 67-72, 1977.

_____. Serological and protective-antibody responses of rabbits to leptospiral antigens. *J Med Microbiol.* 11: 401-9, 1978.

Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Amer J Path.* 40: 393-423, 1962.

Auran NE, Johnson RC, Ritzi DM. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. *Infect Immun.* 5: 968-75, 1972.

Ballard SA, Go M, Segers RP, Adler B. Molecular analysis of the *dnaK* locus of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Gene.* 216: 21-9, 1998.

Ballard SA, Segers RPAM, Bleumink-Pluym N, Fyfe J, Faine S, Adler B. Molecular analysis of the hsp (groE) operon of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Mol Microbiol.* 8: 739-51, 1993.

Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun.* 67: 853-61, 1999.

Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW. Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans*, an Invasive but Nonintracellular Pathogen. *Infect Immun.* 70: 6926-6932, 2002.

Bethlem EP, Carvalho CR. Pulmonary leptospirosis. *Curr Opin Pulm Med.* 6: 436-41, 2000.

Bey RF, Johnson RC. Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect Immun.* 19: 562-9, 1978.

Brito Td. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 10: 237-41, 1968.

Brito Td, Penna DO, Pereira VC, Hoshino S. Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 343: 124-35, 1967.

Caldas EM, Costa E, Sampaio MB. [Leptospirosis in Salvador (Brazil). Clinical and laboratory aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 20: 164-76, 1978.

Christopher WL, Adler B, Faine S. Immunogenicity of leptospiral vaccines grown in protein-free medium. *J Med Microbiol.* 15: 493-501, 1982.

Correa MO. Human leptospirosis in Brazil. *Int J Zoonoses.* 2: 1-9, 1975.

Davila de Arriaga AJ, Rocha AS, Yasuda PH, De Brito T. Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. icterohaemorrhagiae*). *J Pathol.* 138: 145-61, 1982.

De Brito T, Bohm GM, Yasuda PH. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. *J Pathol.* 128: 177-82, 1979.

De Brito T, Freymuller E, Hoshino S, Penna DO. Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea-pig. A light and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 341: 64-78, 1966.

De Brito T, Machado MM, Montans SD, Hoshino S, Freymuller E. Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 342: 61-9, 1967.

De Brito T, Morais CF, Yasuda PH, Lancellotti CP, Hoshino-Shimizu S, Yamashiro E, Ferreira Alves VA. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann Trop Med Parasitol.* 81: 207-14, 1987.

Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA, Everard CO, Callender J. Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *Am J Trop Med Hyg.* 35: 352-4, 1986.

Ellis RW. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine.* 19: 2681-7, 2001.

Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. *WHO Offset Publ:* 1-171, 1982.

Faine SB, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci. 1999

Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 21: 1-6; quiz 7-8, 1995.

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 39: 3303-10, 2001.

Frankel G, Lider O, HersHKoviz R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DC, Cahalon L, Humphries MJ, Dougan G. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem*. 271: 20359-64, 1996.

Glosser JW, Johnson RC, Sulzer CR, Auran NE. Immunogenic properties of a leptospiral outer envelope bacterin in hamsters and foxes. *Am J Vet Res*. 35: 681-4, 1974.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun*. 69: 4958-68, 2001.

Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol*. 175: 4225-34, 1993.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 68: 2276-85, 2000.

Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun*. 66: 1579-87, 1998.

Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun.* 70: 4936-45, 2002.

Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun.* 67: 6572-82, 1999.

Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun.* 59: 1131-40, 1991.

Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science.* 286: 291-5, 1999.

Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.* 50: 769-78, 1987.

Johnson WD, Jr., Silva IC, Rocha H. Serum creatine phosphokinase in leptospirosis. *Jama.* 233: 981-2, 1975.

O'Neil KM, Rickman LS, Lazarus AA. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Rev Infect Dis.* 13: 705-9, 1991.

Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr., Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*. 354: 820-5, 1999.

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother*. 7: 10-5, 2001.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 14: 296-326, 2001.

Lomar AV, Diament D, Torres JR. Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am*. 14: 23-39, vii-viii, 2000.

Luo Y, Frey EA, Pfuetzner RA, Creagh AL, Knoechel DG, Haynes CA, Finlay BB, Strynadka NC. Crystal structure of enteropathogenic Escherichia coli intimin-receptor complex. *Nature*. 405: 1073-7, 2000.

Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajnbok J, Seguro AC. Acute Lung Injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, Outcome, and Factors Associated with Mortality. *Clin Infect Dis*. 29: 1561-1563, 1999.

Martinez Sanchez R, Perez Sierra A, Baro Suarez M, Alvarez AM, Menendez Hernandez J, Diaz Gonzalez M, Cruz de la Paz R, de los Reyes G, Montoya Batista B, Sierra Gonzalez G, Armesto del Rio M, Saltaren Cobas A, Sabournin Ramos O. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. *Rev Panam Salud Publica*. 8: 385-92, 2000.

Matsunaga J, Barocchi, MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira, I, Bolin CA, Reis, MG, Riley, LW, Haake, DA, Ko, AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular microbiology*. 49: 929-945, 2003.

McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med*. 100: 696-8, 1984.

Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infection and Immunity*. 65: 729-738., 1997.

_____. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun*. 65: 729-38, 1997.

Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol*. 33: 199-204, 1990.

MS. Manual de controle da leptospirose. *Ministério da Saúde*: 1-53, 1989.

Nicodemo AC, Del Negro G, Amato Neto V. Thrombocytopenia and leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 32: 252-9, 1990.

Pizza M, Scarlato V, Massignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 287: 1816-20, 2000.

Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of leptospira spp. in humans. *Microbes Infect*. 2: 1265-76, 2000.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 422: 888-93, 2003.

Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 66: 605-10, 2002.

Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, Haake DA. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun*. 63: 3174-81, 1995.

Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun.* 64: 2322-30, 1996.

Sigal LH. *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A vaccine: importance, role, and value. *J Pediatr.* 135: 539-41, 1999.

Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Molloy PJ, Seidner AL, Sabetta JR, Simon HJ, Klempner MS, Mays J, Marks D, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. *N Engl J Med.* 339: 216-22, 1998.

Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine.* 19: 86-94, 2000.

Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella Bvg*-intermediate phase protein. *Mol Microbiol.* 39: 65-78, 2001.

Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J Gen Microbiol.* 131: 377-85, 1985.

Thanassi WT, Schoen RT. The Lyme disease vaccine: conception, development, and implementation. *Ann Intern Med.* 132: 661-8, 2000.

Vinetz JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 14: 527-38, 2001.

Yersin C, Bovet P, Merien F, Clement J, Laille M, Van Ranst M, Perolat P. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 71-6, 2000.

Zeigler JA, Jones RH, Kubica K. Immunization against leptospirosis: vaccine trials with heat-killed whole cell and outer envelope antigens in hamsters. *Bull Pan Am Health Organ.* 10: 126-30, 1976.

Zeigler JA, Kubica KM, Jones RH. Immunization against leptospirosis: continued vaccine trials in hamsters using strains isolated from Barbados. *Bull Pan Am Health Organ.* 12: 130-3, 1978.

Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2: 455-62, 2000.