

636.089 69
V443a
1999

Isabela Farnezi Veloso

**Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase
(PCR) e Amplificação Aleatória de DNA
Polimórfico (RAPD-PCR) na Detecção e
Identificação de *Leptospira* sp**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Medicina Veterinária
Área: Epidemiologia
Orientador: Prof. Elvio Carlos Moreira

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
1999**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

16/04/99

141299-10

0262-29560

V443a Veloso, Isabela Farnezi, 1971-

Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD-PCR) na detecção e identificação de Leptospira sp/Isabela Farnezi Veloso.- Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1999. 60p. : 20 il.

Dissertação (Mestrado)

1. Leptospirose em animais - Teses. 2. Leptospirose - Vacina - Teses. 3. Leptospira - Identificação - Teses. I . Título.

CDD - 636.089 692

Dissertação defendida e aprovada em 20/01/1999, pela Comissão Examinadora constituída por:



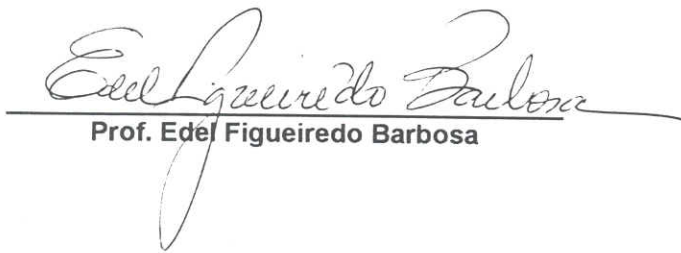
Prof. Elvio Carlos Moreira



Prof. Andrey Pereira Lage



Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo



Prof. Edel Figueiredo Barbosa



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

AGRADECIMENTOS

A Capes pela concessão da minha bolsa de estudo.

A CNPq e Fapemig pelo custeio do projeto.

Ao meu orientador e sempre exemplo profissional, Prof. Élvio Carlos Moreira pelo apoio técnico, profissional e pessoal.

Ao Prof. Carlos Salas Bravo pela oportunidade de trabalhar e desenvolver o projeto no laboratório e pela constante colaboração durante a realização do experimento.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage pela disponibilidade e colaboração.

Ao Toninho pela constante amizade e boa vontade, viabilizando todo o projeto.

Ao meus amigos Zanini, Viviane, Ana e Marcelo pela ajuda, convivência e disponibilidade.

A meu pai pelo constante incentivo, auxílio e paciência e a minha mãe pelo exemplo de vida e força de vontade.

A meu marido Ricardo, pelo amor, incentivo e paciência.

A minha cunhada Glória pelas correções de português e disponibilidade sempre quando requisitada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DOS QUADROS.....	10
LISTA DAS FIGURAS.....	11 e 12
LISTA DE GRÁFICOS.....	13
RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 LITERATURA CONSULTADA.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÕES.....	53
7 SUMMARY.....	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS



mL: mililitro
μL: microlitro
mg: miligrama
ng: nanograma
pg: picograma
fg: femtograma
M: molar
mM: milimolar
nM: nanomolar
pM: picomolar
mCi: miliCurie
g: gravidade
°C: grau centígrado
%: porcentagem
bp: pares de base
U: unidade
nm: nanômetro
u.v.: luz ultra violeta
V: volt
DNA: ácido desoxirribonucléico
rRNA: ácido ribonucléico ribossomal
PCR: Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase
LS-PCR: Low stringency-PCR – PCR de Baixa Estringência
RAPD-PCR: Randomly amplified polymorphic DNA – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLP: Restriction fragment length polymorphism – Polimorfismo de comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição
ELISA: Ensaio Imunoenzimático
PBS: Tampão salina fosfato
Tris: Tris (hidroximetilaminometano)
TE: Tris-EDTA
TBE: Tris-borato-EDTA
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
NaOH: Hidróxido de Sódio
SDS: Duodecil sulfato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
Taq: *Thermus aquaticus*

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 Sorovarietades de <i>Leptospira</i> sp utilizadas no estudo.....	23
QUADRO 2 Componentes da PCR utilizando iniciadores descritos por Woodward & Redstone (1993).....	28
QUADRO 3 Componentes da RAPD-PCR utilizando iniciadores descritos por Gerritsen et al. (1995).....	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com produtos da extração de DNA de *L. mini* (CTG) por diferentes protocolos.....34
- Figura 2 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 onde foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento.....34
- Figura 3 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR obtidos a partir de diferentes concentrações do par de iniciadores Lep13/Lep14.....35
- Figura 4 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de concentrações variáveis de MgCl₂.....35
- Figura 5 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de quantidades decrescentes de DNA de *L. tarassovi*.....36
- Figura 6 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir das condições padronizadas.....37
- Figura 7 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de DNA extraído com proteinase de planta (E6870).....38
- Figura 8 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de extração de DNA pelo método de aquecimento.....38
- Figura 9 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep4 obtidos a partir de DNA de microorganismos não relacionados com *Leptospira* sp.....39

- Figura 10 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da RAPD-PCR obtidos a partir de algumas sorovariades de leptospira.....40
- Figura 11 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da RAPD-PCR obtidos a partir de microorganismos não relacionados com *Leptospira* sp.....43
- Figura 12 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de diluições de 10^{10} a 10^2 leptospiras/mL de urina.....43
- Figura 13 Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da RAPD-PCR obtidos a partir de diluições de 10^9 a 10^4 leptospiras/mL de urina.....44
- Figura 14 Detecção de quantidades decrescentes de DNA de *L. hardjo* (CTG) pela PCR utilizando iniciadores Lep13/Lep14 e pela técnica de "Southern Blot".....45
- Figura 15 "Dot Blot" utilizando produtos de PCR com quantidades decrescentes de DNA de *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG)....46

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Densitometria comparativa entre *L. mini* e *L. szwajizak*.....41
- Gráfico 2 Densitometria comparativa entre *L. hardjo*/Hardjoprajitno (OMS) e *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG).....42



RESUMO

A leptospirose possui importância econômica, pois é uma das principais doenças infecto-contagiosas que afetam várias espécies de animais. Para realização da PCR com os iniciadores Lep13/Lep14 na detecção de *Leptospira* sp foram utilizados três métodos de extração de DNA. Sete amostras submetidas à extração utilizando proteinase K produziram resultado positivo após a PCR. Quatro amostras submetidas à extração com proteinase de origem vegetal (E6870) também produziram resultado positivo após a PCR. Quando o DNA de cinco amostras foi extraído pelo método de aquecimento, apenas em duas foi possível observar amplificação após a PCR. Foram feitas diluições seriadas de *L. hardjo/Hardjoprajitno* (CTG) em urina e após realização da PCR com os iniciadores Lep13/Lep14 foi possível detectar até 10^2 céls/mL. Foi utilizada, também, a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores B11/B12 para a diferenciação entre as sorovariedades *bratislava*, *tarassovi*, *pomona*, *szwajizak*, *hardjo/Hardjoprajitno* (OMS), *hardjo/Hardjoprajitno* (CTG) e *mini*, como também para caracterização de diluições de *L. hardjo/Hardjoprajitno* (CTG) em urina. No primeiro caso, foi obtido, após a RAPD-PCR, um perfil de bandas diferenciado e característico e, com isso, foi possível identificar cada amostra testada. No segundo caso, foi possível detectar amplificação de até 10^4 céls/mL. Os resultados obtidos demonstram que a PCR pode ser utilizada na detecção de *Leptospira* sp em amostras de urina e a RAPD-PCR pode ser utilizada na identificação, caracterização e diferenciação de sorovariedades.

Palavras-chave: *Leptospira*, extração de DNA, PCR, RAPD-PCR, urina.

1. INTRODUÇÃO

As leptospiroses são zoonoses consideradas de grande importância econômica nas explorações pecuárias e estão distribuídas mundialmente. Os animais infectados são capazes de eliminar leptospiroses pela urina durante vários meses e possivelmente, durante vários anos depois da infecção, atuando como portadores e transmissores do microorganismo. Teoricamente, qualquer leptospira patogênica pode infectar qualquer espécie animal e pode estar presente em qualquer região, mas na prática, somente um pequeno número de sorovariedades tornam-se endêmicas em uma região particular ou país. Além disso, cada sorovariedade possui a tendência a se manter em hospedeiros específicos. Este fato pode ser observado com a sorovariedade *hardjo* que tem se mostrado adaptada e mantida em bovinos em várias partes do mundo. Os dois genótipos da sorovariedade *hardjo* são *Hardjobovis* e *Hardjoprajitno*. O genótipo *Hardjobovis* parece ser melhor adaptado aos bovinos do que *Hardjoprajitno* e é encontrado na maioria dos países. O genótipo *Hardjoprajitno* tem sido encontrado somente na Grã-Bretanha, Nigéria, Índia, Malásia, Brasil, México e Estados Unidos (Ellis, 1994).

Em relação a taxonomia, as leptospiroses são espiroquetas pertencentes à Ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*. Dois tipos de classificação de *Leptospira* sp coexistem: uma baseada em determinantes genéticos e a outra baseada em determinantes antigênicos. Antigenicamente, o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies: *L. interrogans* que compreende as amostras patogênicas e *L. biflexa* que compreende as amostras saprófitas (Holt et al., 1994). As leptospiroses são divididas em sorovariedades com base na reação de soroaglutinação microscópica e reação de absorção cruzada de aglutininas. Sorovariedades de leptospira antigenicamente relacionadas são agrupadas em sorogrupos. Mais de 200 sorovariedades são agrupadas em 23 sorogrupos. Métodos moleculares deram nova visão à taxonomia de leptospiroses. Estudos recentes mostraram a presença de heterogeneidade genômica dentro do gênero *Leptospira* e, com isso, foram propostas novas espécies genômicas de leptospiroses patogênicas e saprófitas baseadas no grau de homologia do DNA (Yasuda et al., 1987; Ramadass et al., 1992).

Os métodos laboratoriais atualmente utilizados como o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) e o isolamento possuem muitas

2. LITERATURA CONSULTADA

A primeira referência a leptospirose no homem foi feita pelo pesquisador francês Larrey que observou casos de icterícia de caráter infeccioso na cidade do Cairo, Egito. Esta enfermidade foi descrita por Weil, em 1886, como uma espiroquetose íctero-hemorrágica do homem que, posteriormente, ficou sendo conhecida pelo nome de Doença de Weil. O agente etiológico foi descoberto por Inada et al. em 1914 no Japão, que o denominaram *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Azevedo & Santos, 1946).

No Brasil, o primeiro trabalho experimental foi o de Aragão colaborando na tese de Ausier Bentes sobre leptospirose onde procurou verificar a presença da sorovariedade *icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro (Azevedo & Santos, 1946).

A primeira citação de leptospirose em bovinos foi publicada na URSS por Mikhin & Azhinov, 1935 (Amatredjo et al. 1975) que isolaram *L. grippotyphosa* de vacas com infecção e hemoglobinúria aguda. Roth & Galton (1960) realizaram o primeiro isolamento de *L. hardjo* em bovinos no Estado da Louisiana, Estados Unidos (Amatredjo et al, 1975). Até aquele momento, *L. pomona* era considerada o principal agente etiológico das leptospiroses em bovinos nos Estados Unidos.

Estudos de hibridização de DNA (Haapala et al., 1969) indicaram que o gênero *Leptospira* possui heterogeneidade. Marshall et al. (1981) observaram que há claras diferenças entre as sorovariedades *hardjo* e *balcanica* analisando os fragmentos gerados por enzimas de restrição.

Robinson et al. (1982) demonstraram que amostras da sorovariedade *hardjo* isoladas na Nova Zelândia possuíam uma diferença com sorovariedade *hardjo* amostra de referência Hardjoprajitno na Análise Eletroforética de Fragmentos de DNA de Bactérias (BRENDA) gerados por enzimas de restrição. Foi observado um padrão de bandas heterogêneo entre as duas amostras após terem sido digeridas com a enzima *EcoRI*. Propuseram, então, que sorovariedades de *L. interrogans* poderiam ser subdivididas utilizando a técnica de BRENDA. Esta diferença também foi observada por Thiermann et al. (1986) que utilizou o mesmo método em amostras de *hardjo* isoladas na América do Norte. O nome Hardjobovis foi sugerido para estas amostras por Thiermann &

Ellis (1985) e três subtipos do genótipo Hardjobovis foram reconhecidos: A, B e C.

Alta prevalência de Hardjoprajitno em vacas com agalactia e em fetos abortados, foi relatada por Ellis et al. (1988) em contraste com a alta prevalência de Hardjobovis em animais de abatedouro, indicando que amostras pertencentes a este genótipo podem ser menos patogênicas que as amostras pertencentes ao genótipo Hardjoprajitno. A técnica de análise eletroforética de fragmentos gerados por enzimas de restrição pode ser útil para identificação, mas é laboriosa, consome muito tempo (Van Eys et al., 1989) e é ineficiente na identificação de leptospiros em fluidos corporais devido à grande quantidade de DNA purificado que a técnica requer (Pacciarini et al. 1993).

Yasuda et al. (1987) e Ramadass et al. (1992), utilizando o método de hibridização, delineararam novas espécies de leptospiros patogênicos e saprófitas. Assim, foram sugeridas que as espécies patogênicas fossem divididas em 7 novas espécies como *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchi*, *L. weilli*, *L. santarosai* e *L. kirshneri* e as não patogênicas foram divididas em *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii* e *L. parva*. Nessa classificação, o genótipo Hardjoprajitno pertence à espécie *L. interrogans* e o genótipo Hardjobovis pertence à *L. borgpetersenii*.

A introdução da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), em 1985, tem facilitado o desenvolvimento de uma variedade de sistemas de detecção de ácidos nucleicos de bactérias, vírus e outros microorganismos (Erlich et al., 1991). Devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez, a PCR oferece vantagens quando comparados aos métodos de diagnóstico convencionais (Pfeffer et al., 1995).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para detecção de *L. hardjo* genótipo Hardjobovis em urina bovina. Amostras de urina contendo no mínimo 10 leptospiros deram resultados positivos com a PCR. Para a detecção de *L. hardjo* genótipo Hardjobovis, a PCR demonstrou ser um método rápido, específico, muito sensível e de valiosa importância no auxílio aos métodos de diagnóstico de leptospiroses (Van Eys et al., 1989).

Mérien et al. (1992) testaram a técnica de PCR para a confirmação do diagnóstico de leptospirose em material humano (urina, sangue e líquido céfalo-raquidiano) e foi possível observar que esta técnica pode superar, em termos de sensibilidade de detecção, a técnica de cultivo do microorganismo, pois pode-se detectar pequeno número de leptospiros.

Gravekamp et al. (1993) utilizaram a PCR para amplificação de um fragmento de DNA, em condições específicas, de sorovariedades patogênicas e não patogênicas de *Leptospira* e que não amplificam fragmentos de outras espiroquetas ou microorganismos não relacionados.

Algumas variações da PCR tem enriquecido os trabalhos de identificação de leptospiros, como a pesquisa que utilizou iniciadores aleatórios e amplificação do gene rRNA, com posterior análise, usando endonucleases de restrição (Ralph et al., 1993).

Corney et al. (1993) realizaram um experimento utilizando a PCR com iniciadores arbitrários (RAPD-PCR) e observaram que cada sorovariedade e genótipo de *Leptospira* analisado tinha um único padrão de amplificação. Além disso, com esta técnica, foi possível diferenciar os subtipos A e B do genótipo Hardjobovis.

Sávio et al. (1994) descreveram um experimento que utilizou a PCR e RFLP e observaram que esta técnica pode representar um instrumento útil para o desenvolvimento de um diagnóstico para identificação de sorovariedades.

Em outro experimento com a PCR, Bal et al. (1994), utilizando amostras clínicas de pacientes em diferentes estágios da doença, concluíram que a técnica é promissora para diagnóstico precoce e pode ser útil na detecção de leptospiros em pessoas que eliminam, pela urina, o microorganismo por longos períodos.

A PCR utilizando o par de iniciadores G1/G2 descrito por Gravekamp et al. (1993) foi testada em amostras provenientes de culturas de leptospira e foi demonstrado que alterações na sequência dos produtos de DNA de diferentes espécies genômicas de leptospira provocavam mobilidades diferentes quando submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida. Com isso, Oliveira et al. (1995) concluíram que, com esta técnica, pode ser feita uma análise preliminar das novas espécies genômicas de leptospira sugeridas anteriormente por Yasuda et al. (1987) e Ramadass et al. (1992).

A utilização da técnica de RAPD-PCR na identificação de sorovariedades de *Leptospira* pertencentes ao sorogrupo SEJROE foi feita por Gerritsen et al. (1995) e foi observado que esta técnica, além de possuir reprodutibilidade, possui a capacidade de diferenciar os genótipos

Hardjobovis e Hardjoprajitno que são indistinguíveis pelo Teste de Aglutinação Microscópica (MAT).

Brown & Levett (1997) caracterizaram sorovariedades pertencentes às sete espécies de *Leptospira* patogênicas por análise dos fragmentos gerados por enzimas de restrição dos produtos de PCR, por RAPD-PCR e por PCR de baixa-estringência (LS-PCR). Os resultados mostraram que a técnica de RAPD-PCR é um método simples, rápido e possui grande potencial para a identificação das sorovariedades de *Leptospira* sp.

Ramadass et al. (1997), baseando-se no método de RAPD-PCR descrito anteriormente por Gerritsen et al. (1995), testaram 14 amostras de laboratório pertencentes a várias sorovariedades. No experimento cada sorovariedade produziu um perfil de bandas distinto, indicando que este método é muito útil na detecção, identificação e caracterização de sorovariedades pertencentes ao gênero *Leptospira*.

A PCR para a detecção de *Leptospira* sp em amostras de sêmen de bovinos que iriam ser utilizados para inseminação artificial foi testada por Masri et al. (1997) que sugeriram que a PCR é um método de detecção que possui maior sensibilidade que os métodos de diagnóstico tradicionais.

Foi utilizada a PCR juntamente com o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) e ELISA para detecção de leptospiroses em pacientes humanos com meningite e foi observado que a utilização da PCR possui muitas vantagens frente a técnica de MAT e ELISA-IgM no diagnóstico precoce de muitos casos de leptospiroses, pois 39.80% do total de amostras foram PCR positivas e somente 8.74% e 3.88% das amostras foram positivas pelos métodos de MAT e ELISA, respectivamente (Romero et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

1. Sorovariedades de *Leptospira* sp:

Foram utilizadas amostras de *Leptospira* sp obtidas do antigo Centro Panamericano de Zoonoses da Organização Panamericana da Saúde e amostras coletadas de bovinos em Minas Gerais, Brasil e isoladas por Moreira (1994) no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG e tipificadas no Royal Tropical Institute em Amsterdam, Holanda, Laboratório Internacional de Referência da Organização Internacional de Epizootia, credenciado pela OMS e FAO. As amostras isoladas por Moreira (1994) foram *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) e *L. mini*/Cantagalo (CTG). A relação das amostras de *Leptospira* sp utilizadas no presente estudo é apresentada no Quadro I:

QUADRO I Sorovariedades de *Leptospira* sp utilizadas no presente estudo

Espécie Genômica	Sorogrupo	Sorovariedade	Amostra de Referência
<i>L. interrogans</i>	AUSTRALIS	<i>bratislava</i>	Jez bratislava
<i>L. interrogans</i>	POMONA	<i>pomona</i>	Pomona
<i>L. interrogans</i>	SEJROE	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno (OMS)
<i>L. interrogans</i>	SEJROE	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno (CTG)
<i>L. borgpetersenii</i>	MINI	<i>mini</i>	Cantagalo (CTG)
<i>L. borgpetersenii</i>	MINI	<i>szwajizak</i>	Szwajizak
<i>L. borgpetersenii</i>	TARASSOVI	<i>tarassovi</i>	Perepelicin

2. Cultivo de *Leptospira* sp:

As leptospiros foram cultivadas em aerobiose em meio de Ellinghausen modificado por Johnson & Harris (1946), EMJH, a 27°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

3. Obtenção de massa de células de *Leptospira* sp:

Para obtenção de massa de células, 6 ml de cultura de *Leptospira* sp foram repicadas em 60 mL de EMJH, deixadas em aerobiose, a 27°C e ao abrigo da luz por 7 dias. Após 7 dias, as culturas eram submetidas à

centrifugação em centrífuga Sorvall modelo RC2-B a 13.000 x g, por 30 minutos a uma temperatura de 4°C. O sedimento foi lavado com uma solução de PBS por duas vezes. Entre as lavagens, foram feitas centrifugações a 13.000 x g por 10 minutos. O sedimento contendo as bactérias foi então armazenado a -20°C até ser processado.

4. Adição de *L. hardjo* (Hardjoprajitno/CTG) em urina:

Leptospira hardjo genótipo Hardjoprajitno cultivada em EMJH por 7 dias foi contada em câmara de Neubauer sob microscopia de campo escuro. Para a contagem das leptospiros, 10 µl da cultura foi diluída 40x e homogeneizada para a leitura. Foram obtidas 1,14 x 10¹⁰ leptospiros por mililitro de cultura. A cultura de leptospiros foi centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em urina fresca que foi coletada de bovino da raça Jersey com idade de aproximadamente 3 anos onde foi feita pesquisa de *Leptospira* sp por meio de microscopia direta em microscópio de campo escuro e foi observado que o microorganismo não estava presente. Foram feitas diluições para obtenção de concentrações de 10¹⁰ a 10¹ bactérias por mL de urina. As urinas com diferentes concentrações de *Leptospira* sp foram centrifugadas a 13.000 x g por 30 minutos e foram submetidas à extração do DNA com proteinase K e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico como descrito em 5.1.

5. Extração de DNA:

O DNA de amostras de *Leptospira* sp foram extraídos por três métodos:

5.1. O DNA de sete amostras de *Leptospira* sp, cultivadas em EMJH durante 7 dias à 27°C e das diluições de *L. hardjo* em urina foram extraídos com proteinase K e fenol-clorofórmio descrito por Tamai et al. (1988).

As amostras em meio de cultura e urinas foram previamente centrifugadas a 13.000 x g, por 20 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado em 200 µl de solução de 50 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS juntamente com 100 µg de Proteinase K (Sigma) por mililitro de volume final. Após a homogeneização, a solução foi incubada a 37°C por 2 horas. A extração foi feita 3 vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) saturado com TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) v/v com a fase aquosa e finalmente extraído com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As

extrações foram feitas com agitação vigorosa até formação de emulsão e posterior centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para separação da fase aquosa. A precipitação foi feita com 2,5 vezes o volume da fase aquosa com etanol 100% armazenado a -20°C, adicionado de 0,1 do volume final de solução de acetato de sódio 3 M pH 5.2 e 1 µg de glicogênio. A mistura foi incubada a -20°C durante a noite. O sedimento contendo o DNA foi posteriormente lavado com 100 µl de etanol 70% gelado, e foram feitas centrifugações a 13.000 x g por 20 minutos a 4°C entre as lavagens. O sedimento foi seco em centrífuga para evaporação à vácuo (Speed Vac) e ressuspenso em 50 µl de água MilliQ estéril. Foi feita incubação da amostra com RNase A (20 µg/µl) a 37°C por 2 horas. O DNA das amostras de *Leptospira* sp foi extraído pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico conforme descrito anteriormente. O DNA foi ressuspenso novamente em água MilliQ estéril e estocado a 4°C até a dosagem do DNA descrita no item 6.

5.2. O DNA das amostras de *L. szwajizak*, *L. mini*, *L. hardjo*/Hardjoprajitno (OMS), *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) cultivadas em EMJH foram extraídos também, utilizando uma nova proteinase de origem vegetal, E6870, recentemente isolada no Laboratório de Produtos Naturais-ICB (Salas et al. 1997) ao invés de proteinase K (Sigma). Foram utilizadas 300 µg da proteinase E6870 juntamente com 200 µl de solução de 50 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS. A extração foi realizada utilizando o mesmo procedimento descrito em 5.1.

5.3. O DNA de amostras de *L. mini*, *L. szwajizak*, *L. hardjo*/Hardjoprajitno (OMS), *L. bratislava* e *L. pomona* foram extraídos pelo método de aquecimento do sedimento das amostras em uma solução de 0.1 mM Tris (pH 7.0) a 100°C por 10 minutos e resfriamento imediato. Os debris celulares foram removidos após centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi submetido a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico utilizando o mesmo procedimento descrito para o primeiro método de extração.

6. Dosagem de DNA:

A concentração de DNA obtido de cultura de *Leptospira* sp e das leptospiros adicionadas em urina foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma) comparado com padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III. Foi utilizado 5 µl (10% do total) da ressuspenção da amostra e 1 µl de tampão de amostra 6x contendo azul de bromofenol 0.25%, xilenocianol 0.25% e ficoll 15% em solução

aquosa. O gel foi submetido a uma tensão de 75V por aproximadamente 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com uma solução contendo brometo de etídio 0.5 µg/mL sob agitação suave e a concentração determinada comparando a intensidade do DNA recém-extraído com a intensidade das bandas do padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III (Pharmacia).

7. PCR com iniciadores Lep13/Lep14 e RAPD-PCR com iniciadores B11/B12 :

A PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14 e RAPD-PCR utilizando os iniciadores B11/B12 foram realizadas em um termociclador para PCR MJ Reseach PT 16.

7.1. PCR com iniciadores Lep13/Lep14

Os iniciadores Lep13/Lep14 utilizados para a PCR foram descritos por Woodward & Redstone (1993) e foram sintetizados pela Gibco, BRL . A sequência dos iniciadores é:

Lep 13 5'CTCGGATCCTTAGATATGCTGCAGAAGCTTG 3'
Lep 14 5'AAAAGATCTTATGATTATCAATCACAACTG 3'

Os iniciadores Lep13/Lep14 amplificam um fragmento de 849 bp que é um gene que codifica uma subunidade da proteína do endoflagelo no qual a sequência de nucleotídeos está apresentada a seguir (GenBank, acesso M81344 M61910):

Lep 14

5'AAAAGATCTT	ATGATTATGA	TTATCAATCA	CAACCTGAGC
GCGGTGAATT	CTCACCGTTC	TCTAAAGTTC	AACGAGCTTG
CTGTGGACAA	GACGATGAAG	GCTTTGTCTT	CCGGTATGCG
GATCAATTCC	GCGGCGGACG	ACGCTTCCGG	ACTCGCGGTT
TCTGAAAAGC	TAAGAACGCA	GATCAACGGT	CTGCGTCAGG
CCGAAAGAAA	CACCGAAGAC	GGGATGAGCT	TCATTCAAAC
TGCCGAGGGT	TTCCTCGAAC	AGACGTCGAA	CATCATTGAG
AGAATCCGGG	TGCTTGCCAT	CCAGACCTCG	AATGGTATCT
ACAGCAACGA	AGATAGGCAG	CTTGTGCAGG	TGGAAGTATC
TGCGCTGGTG	GACGAAGTCG	ACCGAATCGC	TTCTCAGGCT
GAATTTAATA	AGTTCAAGCT	TTTCGAGGGG	CAATTCGCAA
GAGGTTACG	GGTCGCGTCC	ATGTGGTTTC	ATATGGGACC
GAACCAAAT	CAGCGAGAGA	GATTTTACAT	CGGCACGATG
ACTTCGAAAG	CCCTGAAGCT	TGTAAAGGCG	GACGGGAGAC
CGATCGCGAT	TTCTTCTCCG	GGAGAAGCCA	ACGATGTTAT
CGGTTTAGCG	GATGCGGCTC	TTACGAGGAT	CATGAAGCAG
AGAGCGGATA	TGGGGGCTTA	TTACAATAGG	CTCGAGTATA
CCGCAAAGG	GCTGATGGGT	GCATATGAAA	ATATGCAAGC
ATCGGAATCC	AGAATTCGGG	ACGCCGATAT	GGCGGAGGAA
GTTGTCTCGC	TGACCACAAA	ACAAATACTC	G TTCAGAGTG
GTACGGCAAT	GTTAGCGCAG	GCAAATATGA	AACCGAATTC
GTTTCTCAAG	CTTCTGCAGC	ATATCTA AGG	ATCCGAG 3'
3' GTTC	CAAGACGTCG	TATAGATTCC	TAGGCTC 5'

Lep 13

Foram testados vários parâmetros para a obtenção de condições ótimas na detecção de *Leptospira* sp pelo PCR: variações na concentração de $MgCl_2$ (de 0.1 mM a 10 mM), na temperatura de anelamento ($55^{\circ}C$, $58^{\circ}C$ e $60^{\circ}C$), nas concentrações dos iniciadores (de 898 nM à 0.1 nM) e na quantidade de DNA (de 2×10^4 pg a 2×10^{-1} pg). DNA de *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, humano e bovino foram submetidos ao PCR para comprovar a especificidade dos iniciadores Lep13/Lep14. Os componentes utilizados na PCR estão apresentados no Quadro 2:

QUADRO 2 Componentes da PCR utilizando iniciadores Lep13/Lep14 descritos por Woodward & Redstone (1993):

<i>Reagentes</i>	<i>Conc. Stock</i>	<i>Conc. Final</i>
Tampão sem MgCl ₂ (Gibco - BRL)	10x	1x
Desoxiribonucleotídeos trifosfatos (Sigma)	10 mM de cada	0.4 mM
MgCl ₂ (Gibco - BRL)	25 mM	X
Iniciadores	20 µM	X
Taq Polimerase (Gibco - BRL)	5 U	2.5 U

A reação foi realizada em volume final de 25 µl e 15 µl de óleo mineral foram adicionados sobre a mistura. A PCR foi realizada de acordo com Woodward & Redstone em 30 ciclos, sendo a desnaturação a 94°C durante 1,30 min, o anelamento dos iniciadores com a sequência alvo a 58°C durante 1,30 min e a extensão a 72°C durante 2 min. No último ciclo a etapa de extensão ocorreu a 72°C durante 10 min.

7.2. RAPD-PCR com iniciadores B11/B12:

Os iniciadores utilizados para a RAPD-PCR foram descritos por Gerritsen et al. (1995) e foram sintetizados pela DNAgency (Malvern, USA). A sequência dos iniciadores é:

B11 5'CCGGAAGAAGGGGCGCCAT 3'

B12 5'CGATTTAGAAGGACTTGACAC 3'

Os componentes da mistura utilizados na reação de RAPD-PCR estão apresentados no Quadro 3.

QUADRO 3 Componentes de reação da RAPD-PCR utilizando iniciadores descritos por Gerritsen et al. (1995):

<i>Reagentes</i>	<i>Conc. Stock</i>	<i>Conc. Final</i>
Tampão sem MgCl ₂ (Gibco – BRL)	10x	1x
Desoxiribonucleotídeos trifosfatos (Sigma)	10 mM de cada	0.4 mM
MgCl ₂ (Gibco – BRL)	25 mM	6 mM
Iniciadores	93 nM	4 nM
Taq Polimerase (Gibco – BRL)	5 U	2.5 U
DNA	X	50 ng

A reação foi realizada em volume final de 25 µl e 15 µl de óleo mineral foram adicionados sobre a mistura. A RAPD-PCR foi realizada de acordo com Gerritsen et al. (1995) onde os primeiros dois ciclos consistiram de desnaturação a 95°C durante 5 min, anelamento dos iniciadores com a seqüência alvo a 40°C durante 5 min e a extensão a 72°C durante 5 min. Os 35 ciclos subseqüentes consistiam de desnaturação a 95°C durante 1 min, anelamento dos iniciadores com a seqüência alvo a 60°C durante 1 min e a extensão a 72°C durante 3 min. No último ciclo, foi incluído passo adicional onde foi utilizada extensão a 72°C durante 10 min.

8. Análise dos produtos amplificados:

Após a PCR, os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em géis de acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 6% ou por géis de agarose a 1,5% corados com uma solução contendo brometo de etídio 5 µg/mL. Foram aplicados 12.5 µl (50% do total) da amostra em cada canaleta juntamente com o tampão de amostra 5x. O gel foi submetido a 85V até que o corante azul de bromofenol atingisse a parte inferior do gel.

Após a corrida, os géis de acrilamida/bisacrilamida foram corados pela prata de acordo com o método de Sanguinetti et al., 1994 onde inicialmente eram fixados com uma solução de etanol a 10% e ácido acético a 0.5% por 3 minutos sob agitação suave. Eram, então, transferidos para uma solução de nitrato de prata a 0.2% onde

permaneciam por 10 minutos em agitação leve. A solução de nitrato de prata era retirada, o gel era enxaguado 2 vezes em água destilada e posteriormente permanecia em água destilada por 3 minutos sob agitação leve. Toda a água era retirada e a solução de revelação composta de 3g NaOH, 100 µl de formaldeído em 100 mL de volume final era adicionada e o gel permanecia sob agitação leve até o aparecimento das bandas, sendo posteriormente transferido para a solução fixadora e submetido à secagem.

Os géis de agarose 1.5% foram corados, após a corrida, com uma solução de brometo de etídio na concentração de 5µg/mL sob agitação suave por aproximadamente 10 minutos. Logo após o gel era fotografado sob iluminação U.V.

9. "Southern Blot":

Para a técnica de "Southern Blot", com auxílio do software PCgene, foi sintetizado um oligonucleotídeo que possui homologia com o produto da PCR com os iniciadores Lep13/Lep14 que está apresentado em negrito na pág. 27. A sequência do oligonucleotídeo é 5'TTTCGGCCTGAC GCAGACCGTTGATCT3'. O oligonucleotídeo foi submetido à purificação, de acordo com protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Após purificação, o oligonucleotídeo foi marcado com γ -ATP 32 P (Sambrook et al., 1989) atividade específica de 5000 Ci/mmol.

Foram submetidas à PCR quantidades decrescentes de DNA de *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG): 2×10^4 pg (corresponde a extração de DNA de aproximadamente 4×10^6 leptospiras), 2×10^3 pg, 2×10^2 pg, 2×10^1 pg, 2×10^0 pg, 2×10^{-1} pg, 2×10^{-2} pg (corresponde a extração de DNA de aproximadamente 2 leptospiras), 2×10^{-3} pg e 2×10^{-4} pg.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose 1% e foi feita transferência por capilaridade para membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-N+, Amersham) em uma solução de NaOH 0.4M. A ligação do DNA à membrana foi feita utilizando luz ultravioleta de 312 nm durante 3 minutos. A membrana foi incubada em uma solução de pré-hibridização (6X SSC e 0.05X BLOTTOO – 0.25 % leite em pó desnatado dissolvido em água contendo 0.001% de azida sódica) a uma temperatura de 54°C por aproximadamente 2 horas e posteriormente à uma solução de hibridização (6X SSC, 0.5% SDS, 100 µg/ml DNA de esperma de salmão desnaturado e sonda marcada) durante 8 horas a 65°C. O excesso de radioatividade foi retirado da

membrana com uma solução 2x SSC (0.15M NaCl, 0.15M citrato de sódio) e 1% de SDS. As lavagens eram monitoradas (contador Geiger, Technical Associates, USA) até que houvesse ausência de material radioativo nas bordas e presença onde houve ligação da sonda com o fragmento amplificado pela PCR. As membranas eram expostas a filme radiográfico Kodak X-Omat durante 24 horas a -70°C (Sambrook et al., 1989).

10. "Dot Blot":

Para a técnica de "Dot Blot", foram submetidas ao PCR quantidades decrescentes de DNA: 2×10^4 pg, 2×10^3 pg, 2×10^2 pg, 2×10^1 pg, 2×10^0 pg, 2×10^{-1} pg, 2×10^{-2} pg, 2×10^{-3} pg e 2×10^{-4} pg. Os produtos de PCR foram acrescidos de 0.1 do seu volume de 3 M NaOH, incubados 5 minutos à 100°C , resfriados à temperatura ambiente e neutralizados com igual volume de acetato de amônia 2 M. Estas amostras foram aplicadas diretamente em membrana de nylon previamente tratada com acetato de amônia 1 M e foi feito procedimento semelhante à técnica de "Southern Blot" a partir da ligação do DNA à membrana (Igarashi, 1991).



4. RESULTADOS

Na primeira etapa, foi extraído DNA de culturas de leptospiros que continham em média 10^{10} células por mL. Foram utilizados três métodos de extração de DNA: A) incubação com solução de extração e proteinase K (Sigma), seguido de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; B) incubação com solução de extração e proteinase de planta (E6870) seguido de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; C) aquecimento a 100°C por 10 minutos em uma solução de 0.1 mM Tris (pH 7.0) seguido de resfriamento e extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Os três métodos de extração foram analisados submetendo amostras de DNA de *L. mini* (CTG) à eletroforese em gel de agarose 1%. No método onde foi utilizado proteinase de origem vegetal (E6870), pode ser observado maior quantidade de DNA de alto peso molecular em relação ao método que utilizou a proteinase K, como está demonstrado na Figura 1. No método onde foi utilizada extração do DNA por aquecimento, pode ser observado presença de DNA degradado de baixo peso molecular (Figura 1).

Foram testados vários parâmetros para a padronização da PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14 testando diferentes concentrações de MgCl_2 , temperaturas de anelamento, diferentes concentrações dos iniciadores e quantidades decrescentes de DNA de *L. tarassovi* que foi utilizada como modelo. Woodward & Redstone (1993) utilizaram 3 mM de MgCl_2 , 25 pM do par de iniciadores Lep13/Lep14 e temperatura de anelamento de 58°C .

Em relação à temperatura de anelamento, foram analisadas temperaturas de 55°C , 58°C e 60°C e foi observado que somente na temperatura de 58°C foi possível obter amplificação de fragmento de DNA de leptospira de 849 bp (Figura 2).

O efeito da concentração do par de iniciadores Lep13/Lep14 também foi testado utilizando concentrações variadas de 898 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM e 0.1 nM e foi observado que a concentração de 100 nM foi o limite mínimo para a amplificação do fragmento de 849 bp (Figura 3).

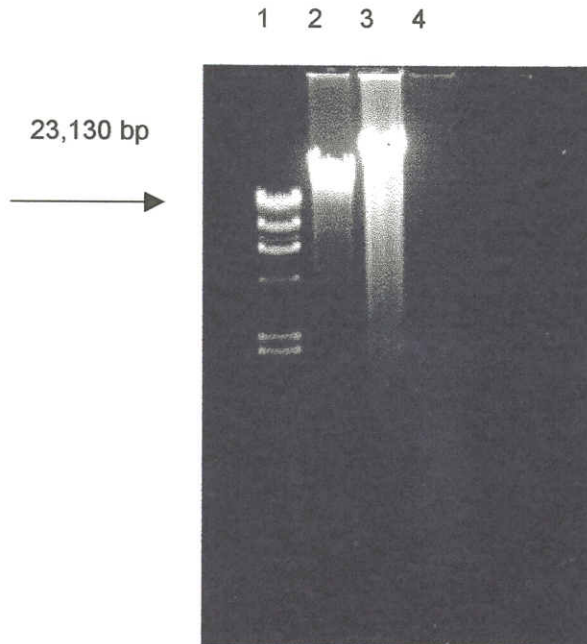


Figura 1 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com produtos de extração de DNA de *L. mini* (CTG) por diferentes protocolos. Canaleta 1, padrão de peso molecular λ *Hind* III; canaleta 2, DNA extraído com proteinase K; canaleta 3, DNA extraído com protease de planta (E6870); canaleta 4, DNA extraído a 100°C por 10 min.



Figura 2 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 onde foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento. Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, temperatura de 55°C; canaleta 4, temperatura de 58°C; canaleta 5, temperatura de 60°C.

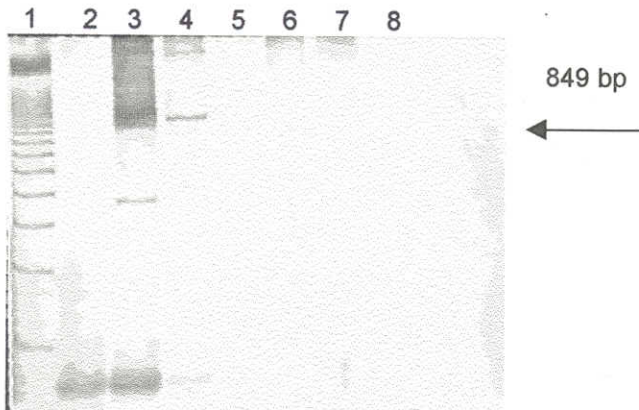


Figura 3 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR obtidos a partir de diferentes concentrações do par de iniciadores Lep13/Lep14. Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, 898 nM; canaleta 4, 100 nM; canaleta 5, 10 nM; canaleta 6, 1 nM; canaleta 7, 0.1 nM; canaleta 8, 10 pM.

A concentração de 2 mM $MgCl_2$ resultou em uma amplificação de um fragmento de DNA de leptospira de aproximadamente 849 bp e concentrações ≥ 3 mM de $MgCl_2$ resultaram em ampliações inespecíficas (Figura 4).

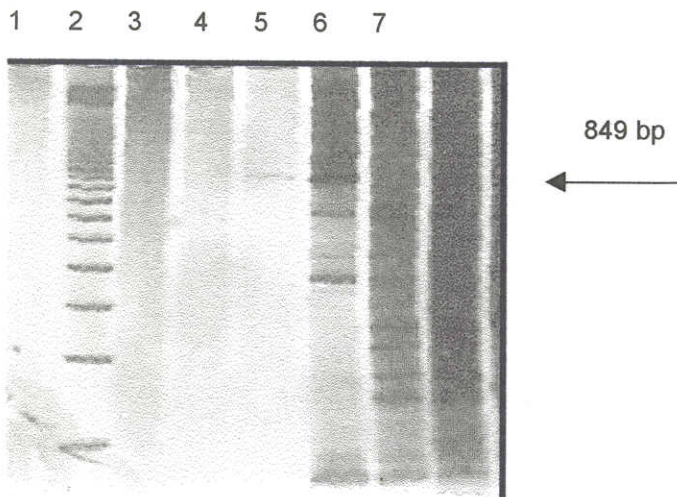


Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de concentrações variáveis de $MgCl_2$. Canaleta 1, padrão de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, 0.1 mM de $MgCl_2$; canaleta 4, 2 mM de $MgCl_2$; canaleta 5, 3 mM de $MgCl_2$; canaleta 6, 5 mM de $MgCl_2$; canaleta 7, 10 mM de $MgCl_2$.

Por último, foram estudadas quantidades de DNA de 2×10^4 pg, 2×10^3 pg, 2×10^2 pg, 2×10^1 pg, 2×10^0 pg, 2×10^{-1} pg utilizando como exemplo *L. tarassovi*. Foi observado que a intensidade das bandas diminuía com a diluição do DNA e foi observado que 2×10^2 pg de DNA foi o limite de sensibilidade de detecção pela PCR da banda referente ao fragmento amplificado de 849 bp, o que corresponde a extração de DNA de aproximadamente 4×10^5 bactérias (Figura 5).



Figura 5 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de quantidades decrescentes de DNA de *L. tarassovi*. Canaleta 1, padrão de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, 2×10^4 pg de DNA; canaleta 4, 2×10^3 pg de DNA; canaleta 5, 2×10^2 pg de DNA; canaleta 6, 2×10^1 pg de DNA; canaleta 7, 2×10^0 pg de DNA; canaleta 8, 2×10^{-1} pg de DNA.

As condições padronizadas foram utilizadas frente a todas as amostras de DNA, provenientes das sorovariedades de *Leptospira* sp utilizadas neste trabalho, extraídos pelo método com proteinase K (A)(Figura 6) e foi observado que o DNA de todas as sorovariedades testadas produziram fragmento de 849 bp após a PCR. As condições padronizadas para a PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14, também foram utilizadas frente as quatro sorovariedades extraídas pelo método que utilizou proteinase de planta (E6870)(B) e foi observado que todas as sorovariedades testadas também amplificaram após a realização da PCR (Figura 7). As cinco sorovariedades extraídas pelo método de aquecimento também foram utilizadas para a realização da PCR nas condições padronizadas e foi observado que apenas duas das cinco sorovariedades testadas amplificaram (Figura 8). Para testar a especificidade da PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14, DNA de

microorganismos não relacionados, como *E. coli* e *M. bovis* e DNA humano e bovino foram utilizados com esses iniciadores usando as condições padronizadas da PCR e foi possível observar que não houve nenhuma amplificação para cada amostra de DNA analisada(Figura 9).

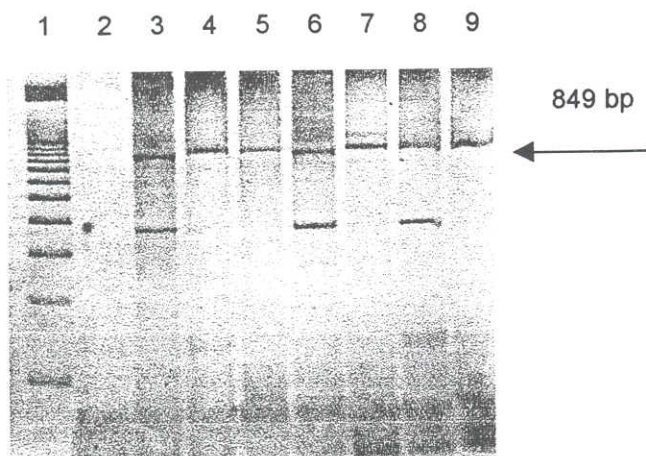


Figura 6 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata de produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir das condições padronizadas. Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, *L. szwajizak*; canaleta 4, *L. mini*; canaleta 5, *L. hardjo* (OMS); canaleta 6, *L. hardjo* (CTG); canaleta 7, *L. pomona*; canaleta 8, *L. bratislava*; canaleta 9, *L. tarassovi*.

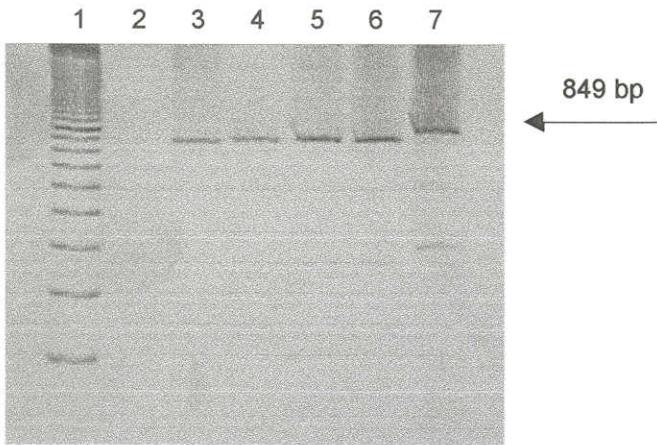


Figura 7 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata de produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de DNA extraído com proteinase de planta (E6870). Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, *L. bratislava* extraída com proteinase K; canaleta 4, *L. szwajizak*, canaleta 5, *L. mini*; canaleta 6, *L. hardjo* (OMS); canaleta 7, *L. hardjo* (CTG).

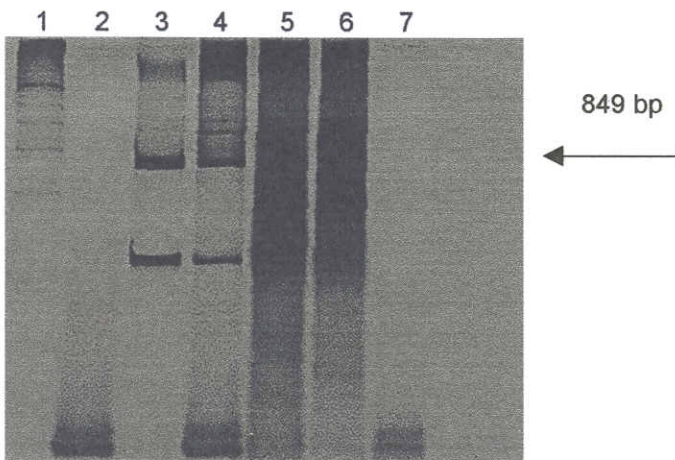


Figura 8 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de extração de DNA pelo método de aquecimento. Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, *L. mini*; canaleta 4, *L. bratislava*; canaleta 5, *L. hardjo* (OMS); canaleta 6, *L. szwajizak*; canaleta 7, *L. pomona*.

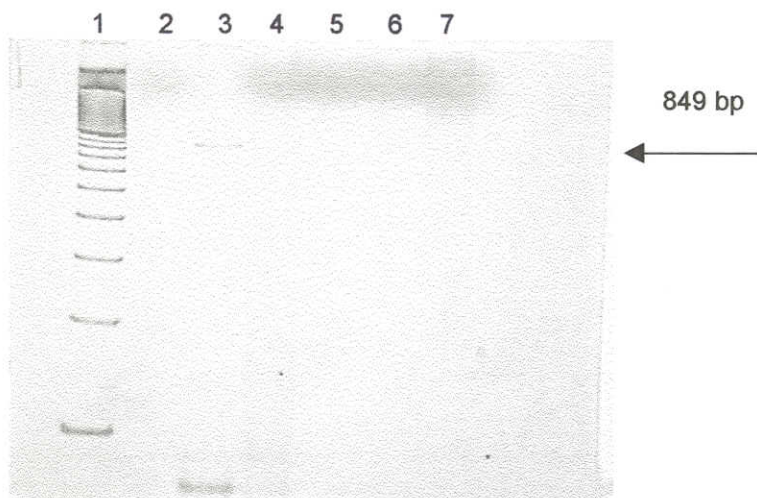


Figura 9 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de DNA de microorganismos não relacionados com *Leptospira* sp. Canaleta 1, padrão de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, *L. tarassovi*; canaleta 4, *E. coli*; canaleta 5, *M. bovis*; canaleta 6, DNA humano; canaleta 7, DNA bovino.

Para a realização da RAPD-PCR utilizando os iniciadores B11/B12, foram testadas amostras de DNA de cada sorovariedade de leptospira utilizada neste estudo. Foi possível observar que cada sorovariedade utilizada produziu um único perfil de bandas (Figura 10). O experimento foi repetido e manteve a reprodutibilidade. DNA de *E. coli* e *M. bovis* e DNA humano e bovino também foram testados e não houve nenhuma amplificação (Figura 11).

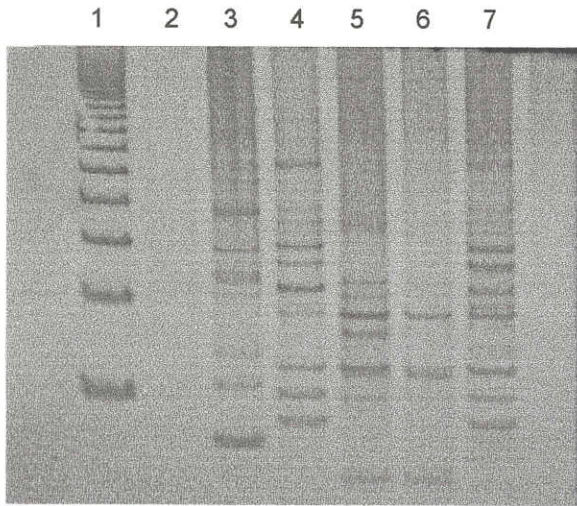


Figura 10 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da RAPD-PCR obtidos a partir de algumas sorovariedades de leptospira. Canaleta 1, padrão de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, *L. szwajizak*, canaleta 4, *L. mini*; canaleta 5, *L. hardjo* (OMS); canaleta 6, *L. hardjo* (CTG); canaleta 7, *L. bratislava*.

Foi feita análise das diferenças entre algumas sorovarietades produzidas pela RAPD-PCR com os iniciadores B11/B12 por densitometria de transmissão a 563 nm . No gráfico I pode ser observado as diferenças no perfil de bandas da *L. mini* (em vermelho) e *L. szwajzak* (em preto).

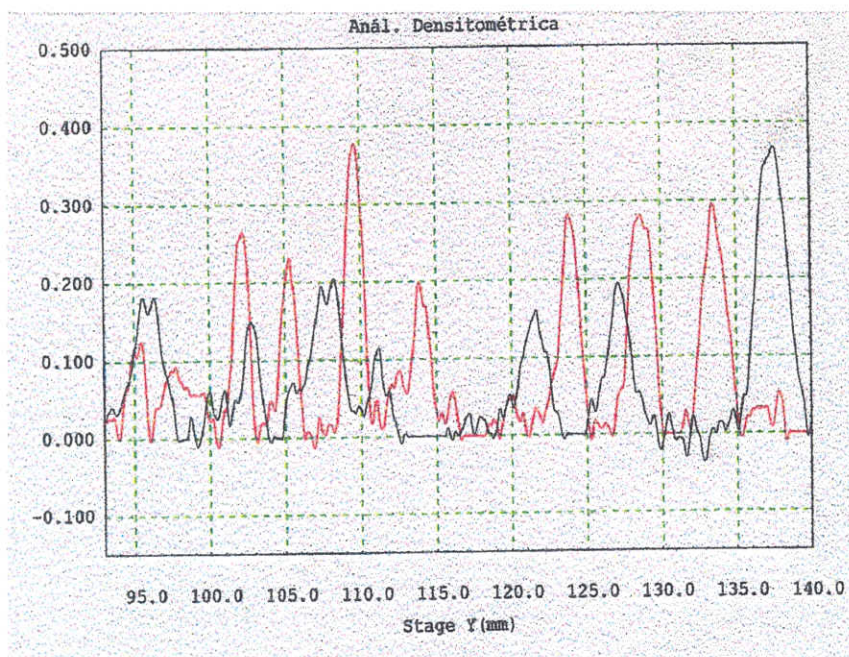


Gráfico I – Densitometria comparativa entre *L. mini* e *L. szwajzak*. *L. mini* está apresentada em vermelho e *L. szwajzak* está apresentada em preto.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFPA

O perfil de bandas da *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) e *L. hardjo*/Hardjoprajitno (OMS) também foi analisado densitometricamente e o resultado está apresentado no gráfico 2.

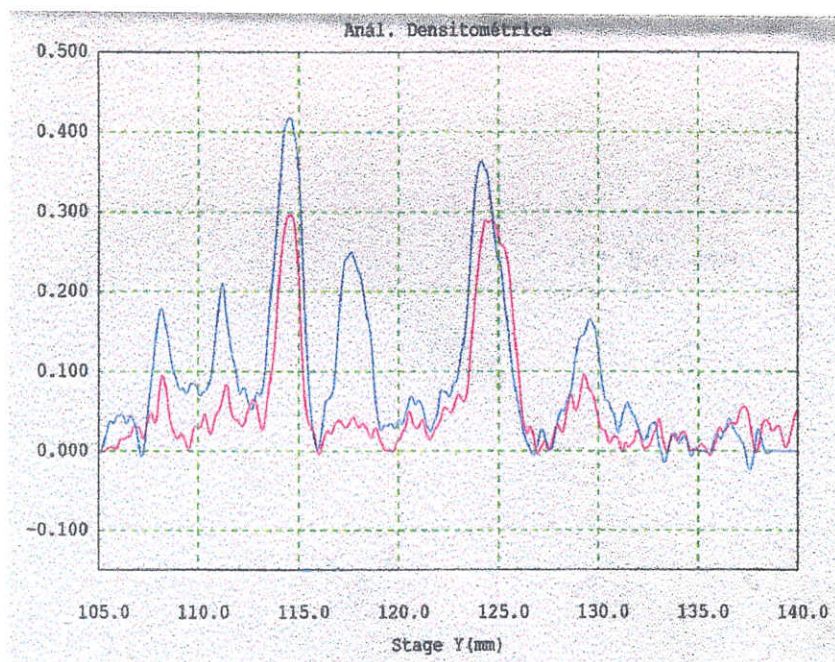


Gráfico 2 – Densitometria comparativa entre *L. hardjo*/Hardjoprajitno (OMS) e *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG). *L. hardjo*/Hardjoprajitno (OMS) está apresentada em azul e *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) está apresentada em rosa.

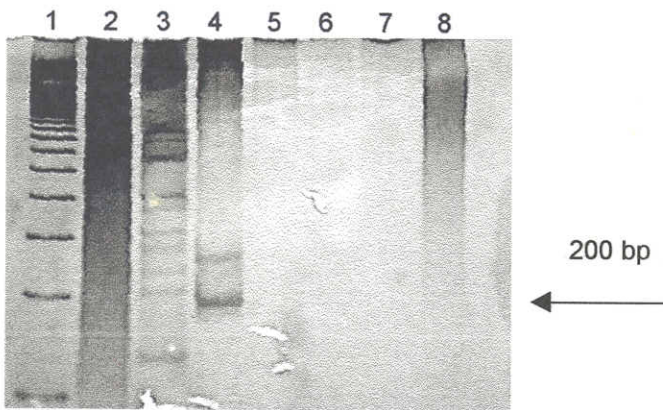


Figura 11 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da RAPD-PCR obtidos a partir de DNA de microorganismos não relacionados com *Leptospira* sp. Canaleta 1, padrão de peso molecular 100 bp; canaleta 2, urina; canaleta 3, *L. bratislava*; canaleta 4, *L. tarassovi*; canaleta 5, *E. coli*; canaleta 6, *M. bovis*; canaleta 7, DNA bovino; canaleta 8, DNA humano.

Na segunda etapa, foi extraído o DNA proveniente das leptospiros adicionadas em urina de bovinos nas diluições de 10^{10} a 10^1 céls/mL. O par de iniciadores Lep13/Lep 14 foi utilizado para a realização da PCR, nas condições padronizadas, frente às leptospiros nas diluições 10^{10} a 10^1 céls/mL adicionadas na urina, resultando em amplificação nas diluições de 10^{10} a 10^2 céls/mL (Figura 12).

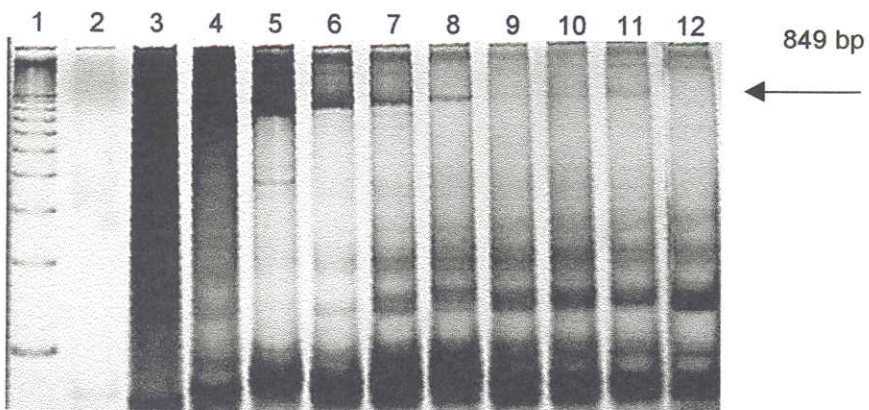


Figura 12 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com produtos da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 obtidos a partir de diluições de 10^{10} a 10^1 leptospiros por mL de urina. Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, 10^{10} céls/mL de urina; canaleta 4, 10^9 céls/mL; canaleta 5, 10^8 céls/mL; canaleta

6, 10^7 céls/mL; canaleta 7, 10^6 céls/mL; canaleta 8, 10^5 céls/mL; canaleta 9, 10^4 céls/mL; canaleta 10, 10^3 céls/mL; canaleta 11, 10^2 céls/mL; canaleta 12, 10^1 céls/mL.

O par de iniciadores B11/B12 foi utilizado para a realização da RAPD-PCR frente às leptospiros nas diluições 10^9 a 10^1 céls/mL adicionadas na urina, resultando em amplificação nas diluições 10^9 a 10^3 céls/mL (Figura 13).

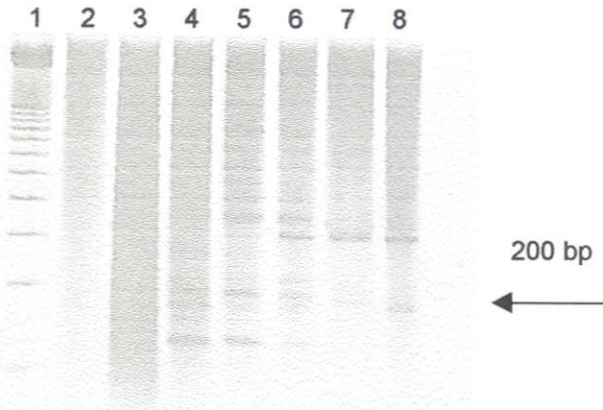


Figura 13 - Gel de poliácridamida 6% corado pela prata com produtos da RAPD-PCR obtidos a partir de diluições de 10^9 a 10^4 leptospiros por mL de urina. Canaleta 1, marcador de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, 10^9 céls/mL de urina; canaleta 4, 10^8 céls/mL; canaleta 5, 10^7 céls/mL; canaleta 6, 10^6 céls/mL; canaleta 7, 10^5 céls/mL; canaleta 8, 10^4 céls/mL.

A confirmação da identidade da seqüência amplificada proveniente de *Leptospira* sorovariedade *hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) foi realizada por hibridização utilizando a técnica de "Southern Blot" com sonda radioativa marcada com P^{32} γ ATP como pode ser observado na Figura 14. Foi possível detectar até 2×10^1 pg de DNA de leptospira e utilizando gel de agarose 1% foi possível detectar até 2×10^3 pg de DNA.



A



B

Figura 14 - Detecção de quantidades decrescentes de DNA de *L. hardjo* (CTG) pela PCR utilizando iniciadores Lep13/Lep14 (A) e pela técnica de "Southern Blot" (B). Canaleta 1, padrão de peso molecular 100 bp; canaleta 2, controle negativo; canaleta 3, 2×10^4 pg de DNA; canaleta 4, 2×10^3 pg de DNA; canaleta 5, 2×10^2 pg de DNA; canaleta 6, 2×10^1 pg de DNA; canaleta 7, 2×10^0 pg de DNA; canaleta 8, 2×10^{-1} pg de DNA; canaleta 9, 2×10^{-2} pg de DNA; canaleta 10, 2×10^{-3} pg de DNA; canaleta 11, 2×10^{-4} pg de DNA.

A técnica de "Dot Blot" também foi utilizada onde foi possível detectar 2×10^4 pg, 2×10^3 pg e 2×10^2 pg de DNA (Figura 15).

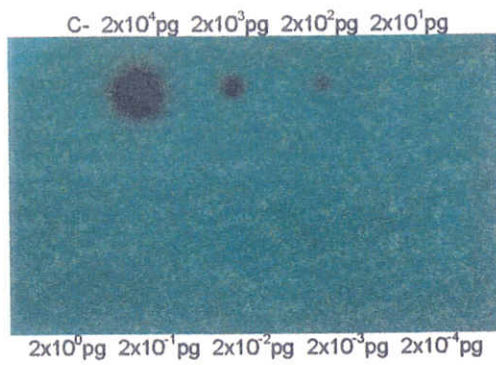


Figura 15 - "Dot Blot" utilizando produtos da PCR com quantidades decrescentes de DNA de *L. hardjo* genótipo Hardjoprajtino (CTG)

5. DISCUSSÃO

A leptospirose bovina poderia, teoricamente, ser causada por qualquer sorovariedade, mas o papel da *hardjo* como a principal sorovariedade patogênica para bovinos é aceito universalmente (Ellis et al., 1994).

Os métodos laboratoriais que usualmente são utilizados para o diagnóstico de leptospirose possuem desvantagens, pois possuem pouca sensibilidade, serem laboriosos e produzirem resultados demorados. Métodos de microscopia direta, técnica de imunofluorescência direta ou indireta e coloração de tecidos pela prata não constituem procedimentos rotineiros e possuem pouca sensibilidade. A determinação exata da infecção por *Leptospira* sp é feita pela cultura e isolamento do agente, mas é um método bastante difícil, laborioso, susceptível a contaminações e leva meses para obtenção de resultados conclusivos (Pacciarini et al., 1993). Além disso, a identificação dos isolados é usualmente testada em laboratórios de referência. Até o momento, somente as sorovarietades *icterohaemorrhagiae*, *wolffi* (Santa Rosa et al., 1969/1970), *guaicurus*, *goiano* (Santa Rosa et al., 1980), *pomona* (Freitas et al., 1957), *hardjo* e *mini* (Moreira, 1994) foram isoladas de bovinos no Brasil. Os métodos sorológicos utilizados possuem subjetividade na interpretação dos resultados e, além disso, não refletem necessariamente o estado de carreador e eliminador de leptospirosas pelos animais com infecção crônica. Uma importante desvantagem dos métodos sorológicos no diagnóstico de leptospiroses em bovinos é a incapacidade de distinção entre os dois genótipos da sorovariedade *hardjo* (Leonard, 1995). O Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) é o método sorológico de referência utilizado para a identificação da sorovariedade presente em determinada propriedade. Esse método, entretanto, é trabalhoso por exigir manutenção de baterias de sorovarietades em meios de cultura líquidos, que são repicados semanalmente para serem utilizados como antígenos vivos na reação e não é muito sensível.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método de síntese enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA, através do uso de dois oligonucleotídeos iniciadores que hibridizam com fitas opostas do DNA e flanqueiam uma região específica.

A PCR e suas variações têm sido utilizada largamente no diagnóstico de doenças infecciosas, pois são técnicas rápidas, com alto grau de

especificidade e sensibilidade. A PCR tem sido utilizada na tentativa de solucionar a necessidade de técnicas que ofereçam maior confiabilidade, sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de *Leptospira* sp. Tem sido largamente utilizada para detecção de *Leptospira* sp em amostras de urina (Van Eys et al., 1989; Gerritsen et al., 1991; Mérien et al., 1992; Bal et al., 1994; Brown et al., 1995), soro (Mérien et al., 1992; Gravekamp et al. 1993; Brown et al., 1995), líquido céfalo-raquidiano (Mérien et al., 1992; Romero et al. 1998) e sêmen (Masri et al., 1997).

Para determinar a eficiência da extração para a PCR com iniciadores Lep13/Lep14 e da RAPD-PCR utilizando os iniciadores B11/B12 foram comparados três métodos de extração de DNA de *Leptospira* sp. Os resultados obtidos mostraram que os métodos que utilizaram proteinase de planta (E6870) e proteinase K foram eficientes e não houve interferência na amplificação do DNA de *Leptospira* sp durante a PCR. A utilização do método de extração de DNA a partir de aquecimento que provoca lise celular expondo o DNA, foi eficiente na amplificação pelo PCR utilizando iniciadores Lep13/Lep14 de apenas duas das cinco sorovariedades testadas. Van Eys et al. (1989) utilizaram o método de aquecimento para extração de DNA de *L. hardjo* genótipo Hardjobovis e observaram que os resultados foram satisfatórios para a realização da PCR. Corney et al. (1994), utilizando o mesmo método para extração de DNA das sorovariedades *pomona*, *balcanica*, *hardjo* genótipo Hardjobovis e Hardjoprajitno, obtiveram resultados positivos após a realização da RAPD-PCR, mas foi observado que algumas bandas demonstraram diferenças em intensidade e utilizando outro método de extração foi obtido produtos de peso molecular mais alto. Com os experimentos utilizando proteinase de origem vegetal (Salas et al., 1997), foi possível observar que essa proteinase pode substituir a proteinase K (Sigma) na rotina e ainda possui a vantagem de não ter sua atividade comprometida na presença do EDTA (Genelhu et al, 1998). Foi possível observar que há diferença entre as sorovariedades testadas na eficiência da extração do DNA pelo método de aquecimento e que algumas sorovariedades, permitem, com maior facilidade, a exposição do DNA. Fato semelhante foi observado quando Mohran et al. (1998) utilizaram esse método na extração de DNA de *Campylobacter* sp onde algumas amostras utilizadas não produziram amplificação após a PCR, pois falharam em expor o DNA intacto após a utilização do método de aquecimento permitindo somente a passagem de moléculas menores como proteínas que adquirem conformação mais compacta e RNA.

A PCR, utilizando os iniciadores Lep13/Lep14, permitiu a amplificação de fragmento de 849 bp a partir de DNA extraído com proteinase K (A) de

todas as sorovarietades testadas (Quadro I). O fragmento amplificado faz parte de um gene conservado dentro de gênero *Leptospira* (Woodward et al. 1991). DNA proveniente de outras bactérias como *M. bovis* e *E. coli* e DNA humano e bovino não produziram amplificação, demonstrando que o par de iniciadores utilizado não possui homologia com o DNA destas amostras testadas que podem estar presentes no material analisado. Esse fato demonstra a especificidade da PCR com iniciadores Lep13/Lep14 na detecção de *Leptospira* sp. As técnicas de hibridização foram utilizadas com o objetivo de determinar a sensibilidade de detecção de *Leptospira* sp e confirmar a identidade do produto de PCR. Apesar da técnica de "Dot Blot" não mostrar o tamanho do produto amplificado pode fornecer informações da presença e da quantidade de material de uma sequência em particular. Foi possível observar que a técnica de "Southern Blot" utilizando oligonucleotídeo marcado radioativamente, foi mais sensível, pois foi possível detectar até 2×10^1 pg de DNA de *L. hardjo* (CTG). Entretanto, com a técnica de "Dot Blot", assim como a PCR utilizando iniciadores Lep13/Lep14, foi possível detectar até 2×10^2 pg de DNA de *Leptospira* sp. Esses resultados mostraram menor sensibilidade da técnica de "Dot Blot" quando comparados com os resultados de Mérien et al. (1992) e Savio et al. (1994) que detectaram até 10^{-2} pg de *L. interrogans* e *L. hardjo*/Hardjobovis, respectivamente. Entretanto, foi possível observar que, neste estudo, as técnicas de PCR e "Dot Blot" possuem a mesma sensibilidade e também possuem uma sensibilidade muito semelhante à técnica de "Southern Blot". Com isso, é possível observar a sensibilidade da PCR na detecção de leptospiros sem a necessidade de estrutura laboratorial complexa que exigem as técnicas de "Dot Blot" e "Southern Blot" e a utilização de material radioativo que tornam-se incompatível com a realidade dos laboratórios de rotina.

A sensibilidade da PCR utilizando os iniciadores Lep13/ Lep14 foi verificada em amostras de *Leptospira* sp pertencentes à sorovarietade *hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG) adicionadas na urina através de diluições decrescentes que variaram de 10^{10} a 10^1 céls/mL de urina. A sensibilidade encontrada foi muito alta já que foi possível detectar amplificação utilizando a diluição 10^2 céls/mL. Entretanto, a sensibilidade obtida foi inferior à encontrada por Bal et al. (1994) que conseguiram detectar aproximadamente 1 cél/mL utilizando a PCR associada com hibridização para aumentar a sensibilidade da reação. Apesar de ser a menor quantidade de leptospira detectada pelo PCR associada à técnica de hibridização descrita até hoje, a metodologia de hibridização ainda é complexa e menos acessível aos laboratórios de diagnóstico de rotina. Sendo assim, o resultado da PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14

se mostrou útil na detecção de leptospiros eliminadas na urina pelos bovinos que, com infecções crônicas, podem eliminar na ordem de 10^6 ou mais leptospiros por mililitro de urina (Marshall, 1996). Bovinos que eliminam leptospiros pela urina tomam-se principal fonte de contaminação para outros indivíduos e para o ambiente. No caso específico da sorovariedade *hardjo*, Ellis (1994) considera que a transmissão direta de bovino para bovino é o mecanismo mais importante para sua manutenção no plantel. Com isso, a PCR se torna uma técnica de grande importância para a detecção de leptospiros na urina tornando possível um controle mais adequado da doença no plantel.

A identificação e a caracterização da sorovariedade de *Leptospira* sp presente no rebanho são de grande importância epidemiológica, pois sorovariiedades diferentes causam quadros clínicos e têm reservatórios animais diferentes. Além do mais, possibilitam tomar corretas medidas de controle, pois a utilização de vacinas com a sorovariedade presente em determinada propriedade possibilitará uma resposta imunológica mais específica.

Para tal, foi aplicada a técnica de RAPD-PCR que tem sido utilizada constantemente na tentativa de diferenciação de diversas sorovariiedades de *Leptospira* sp. Essa técnica consiste, basicamente, na utilização de iniciadores aleatórios associada com uma baixa temperatura de anelamento que resulta, não somente de uma amplificação de uma seqüência específica, mas de um conjunto de produtos formados pela ligação dos iniciadores em regiões do genoma, onde o emparelhamento não é completo. A presença ou ausência de bandas é possivelmente determinada tanto por um polimorfismo no tamanho da seqüência localizada entre os dois sítios de ligação dos iniciadores como por polimorfismo na seqüência de nucleotídeos no sítio de ligação dos mesmos. Com este método são obtidas impressões digitais de genomas.

Os resultados da análise da eficiência da RAPD-PCR, utilizando os iniciadores B11/B12, na identificação e diferenciação de sorovariiedades de *Leptospira* sp foram analisados. Os resultados obtidos mostraram que as sete sorovariiedades testadas possuem um padrão de bandas diferenciado e cada sorovariedade possui um perfil de bandas característico e foram semelhantes a resultados anteriores, que utilizaram a mesma técnica com o mesmo par de iniciadores (Gerritsen et al. 1995 e Ramadass et al. 1997). Utilizando os géis de poliacrilamida corados pela prata, que são mais indicados por sua maior sensibilidade e

poder de resolução em uma faixa específica, foi encontrado que os produtos de amplificação do DNA das sorovarietades testadas aparecem, principalmente, no intervalo de 100 a 1000 bp. A utilização desta técnica confirma os resultados de Corney et al. (1993) que encontraram um único perfil de bandas para cada sorovarietade analisada quando utilizaram a técnica de RAPD-PCR. Com os resultados obtidos utilizando esta técnica, pode ser observado que amostras pertencentes ao genótipo Hardjoprajitno, mas provenientes de laboratórios diferentes, possuem algumas diferenças no padrão de bandas após serem submetidas à eletroforese (Figura 10, canaletas 5 e 6), pois na altura de aproximadamente 150 bp há ausência de uma banda na sorovarietade *hardjo* (CTG) comparando com o perfil da sorovarietade *hardjo* (OMS). Isso demonstra que pode ocorrer heterogeneidade entre genótipos isolados de diferentes áreas geográficas. Amostras de DNA de *E. coli* e *M. bovis* e DNA humano e bovino também foram testados com esta técnica e com este par de iniciadores e não houve amplificação nas condições utilizadas, o que confirma a especificidade dos iniciadores.

A sensibilidade da RAPD-PCR, utilizando os iniciadores B11/B12, foi testada em amostras de *Leptospira* sp pertencentes à sorovarietade *hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG) adicionadas na urina através de diluições decrescentes que variaram de 10^9 a 10^1 céls/mL de urina. A sensibilidade encontrada foi satisfatória, já que foi possível detectar amplificação até a diluição 10^4 céls/mL, apesar da diminuição da intensidade de algumas bandas. Esse resultado é de grande importância, pois possibilita detectar um limite de leptospiros bem inferior à média eliminada na urina por animais com infecção crônica que são a principal fonte de contaminação para outros animais. Além disso, estes resultados demonstram a possibilidade da aplicação da RAPD-PCR para uma rápida identificação de leptospiros.

Este estudo mostra a contribuição, aos métodos de diagnóstico tradicionais, da PCR utilizando iniciadores Lep13/Lep14 na detecção de *Leptospira* e da RAPD-PCR utilizando iniciadores B11/B12 como um método rápido e sensível para a identificação, caracterização e diferenciação de sorovarietades de *Leptospira*.



6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

-Os métodos de extração empregando-se proteinase K e proteinase de planta (E6870) são eficientes na extração de DNA de *Leptospira* sp para amplificação por PCR.

-A PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14 é eficiente na detecção das sorovariedades *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (OMS), *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG), *L. mini*, *L. swajizak*, *L. tarassovi*, *L. bratislava* e *L. pomona*.

-A PCR utilizando os iniciadores Lep13/Lep14 é eficiente na detecção de até 10^2 leptospiros por mililitro de urina utilizando *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG).

-RAPD-PCR utilizando os iniciadores B11/B12 produzem perfis de bandas diferenciados que permitem a identificação e caracterização das sorovariedades *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (OMS), *L. hardjo* genótipo Hardjoprajitno (CTG), *L. mini*, *L. szwajizak*, *L. tarassovi*, *L. bratislava* e *L. pomona*.

-RAPD-PCR utilizando os iniciadores B11/B12 é eficiente na detecção de até 10^4 leptospiros por mililitro de urina.

7. SUMMARY

Leptospirosis is a disease economically important because it is one of the main infectious diseases that affect many animal species. In order to detect *Leptospira* sp by PCR analysis using the pair of primers Lep13/Lep14, three DNA extraction methods were used. All seven strains treated with proteinase K were PCR positive. All four strains treated with plant proteinase (E6870) were PCR positive. Only two strains were PCR positive when DNA from five strains were extracted by heating. Sequential dilutions of *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) in urine were subjected to PCR with primers Lep13/Lep14 and its detection limit was 10^2 cells/mL. RAPD-PCR with primers B11/B12 was used to differentiate between *bratislava*, *tarassovi*, *pomona*, *szwajizak*, *hardjo*/Hardjoprajitno (OMS), *hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) and *mini* serovars and as well as to characterize sequential dilutions of *L. hardjo*/Hardjoprajitno (CTG) in urine. The first produced different and characteristic band patterns for each strain tested. In the last, the detection limit was 10^4 cells/mL. These results show that PCR can be used in detection of *Leptospira* sp in urine and that RAPD-PCR can be used in identification, characterization and differentiation of serovars.

Key words: *Leptospira*, DNA extraction, PCR, RAPD-PCR, urine.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATREDJO, A., CAMPBELL, R.S.F. Bovine leptospirosis. **Vet. Bull.**, v.45, n.12, p.875-882, 1975.
- AZEVEDO, A.G., SANTOS, J.A. Sobre a ocorrência da Leptospirose no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 3, 1946, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Livraria do Globo, 1946. p.115-163.
- BAL, A.E. et al. Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.8, p.1894-1898, 1994.
- BROWN, P.D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v.43, p.110-114, 1995.
- BROWN, P.D., LEVETT, P.N. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. **J. Med. Microbiol.**, v.46, p.173-181, 1997.
- CORNEY, B.G. et al. Rapid Identification of Some *Leptospira* Isolates from Cattle by Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.11, p.2927-2932, 1993.
- CORNEY, B.G., COLLEY, J., GRAHAM, G.C. Simplified analysis of pathogenic leptospiral serovars by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **J. Med. Microbiol.**, v.46, p.927-932, 1997.
- ELLIS, W.A. et al. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* isolates from cattle. **Res. Vet. Sci.**, v.44, p.375-379, 1988.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet. Clin. North Am. : Food Anim. Pract.**, v.10, n.3, p.463-478, 1994.
- ERLICH, H.A., GELFAND, D., SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v.252, p.1643-1650, 1991.
- FREITAS, D.C., VEIGA, J.S., LACERDA Jr., P.M.G. et al. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. USP**, v. 6, n. 1, p. 81-84, 1957.
- GENELHU, M.S. et al. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, n.9, p.1129-1132, 1998.
- GERRITSEN, M.A., SMITS, M.A., OLYHOEK, T. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospiras of serogroup Sejroe. **J. Med. Microbiol.**, v.42, p.336-339, 1995.
- GERRITSEN, M.J. et al. Sample Preparation Method for Polymerase Chain Reaction – Based Semiquantitative Detection of *Leptospira*

- interrogans* Serovar *Hardjo* Subtype *Hardjobovis* in Bovine Urine. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.12, p.2805-2808, 1991.
- GRAVEKAMP, C. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **J. Gen. Microbiol.**, v.139, p.1691-1700, 1993.
- HAAPALA, D.K. et al. Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of leptospira. **J. Bacteriol.**, v.98, p.421-428, 1969.
- IGARASHI, A. Rapid identification of Dengue virus serotypes by using PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v., n., p.2107-2110, 1991.
- JOHNSON, R.C.; HARRIS, V.G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. **J. Bacteriol.**, v.94, p.27-31, 1967.
- HOLT, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.27-34: The Spirochetes.
- LEONARD, F.C. Leptospirosis in cattle – An update. **Irish Vet. J.**, v.48, p.46-50, 1995.
- LETOCART, M., BARANTON, G., PEROLAT, P. Rapid Identification of Pathogenic *Leptospira* Species (*Leptospira interrogans*, *L.borgpetersenii*, and *L.kirschneri*) with Species-Specific DNA Probes Produced by Arbitrarily Primed PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.1, p.248-253, 1997.
- MARSHALL, R.B. Shedding of *Leptospira* by Cattle. (www.infobrok.co.na), 18/4/1996.
- MARSHALL, R.B. et al. Genotypes of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in cattle in the UK. **Vet. Rec.**, n.117, p.669-670, 1985.
- MARSHALL, R.B., WILTON, B.E., ROBINSON, A.J. Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. **J. Med. Microbiol.**, v.14, p.163-166, 1981.
- MASRI, S.A. et al. A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. **Can. J. Vet. Res.**, v.61, p.15-20, 1997.
- MERIEN, F. et al. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.
- MOHRAN, Z.S. et al. Differentiation of *Campylobacter* Isolates on the Basis of Sensitivity to Boiling in Water as Measured by PCR-Detectable DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, n.1, p.363-365, 1998.
- MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptopirose em bovinos**. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 1994. 94p. Tese (Doutorado)
- OLIVEIRA, M.A.A. et al. Use of Nondenaturing Silver-Stained Polyacrylamide Gel Analysis of Polymerase Chain Reaction

- Amplification Products for the Differential Diagnosis of *Leptospira interrogans* Infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.22, p.343-348, 1995.
- PACCIARINI, M.L. et al. The search for improved methods for diagnosing leptospirosis: the approach of a laboratory in Brescia, Italy. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v.12, n.2, p.647-663, 1993.
- PFEFFER, M., WIEDMANN, M., BATT, C.A. Applications of DNA Amplification Techniques in Veterinary Diagnostics. **Vet. Res. Commun.**, v.19, n.5, p.375-407, 1995.
- RALPH, D. et al. *Leptospira* Species Categorized by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (PCR) and by Mapped Restriction Polymorphisms in PCR-Amplified rRNA Genes. **J. Bacteriol.**, v.175, n.4, p.973-981, 1993.
- RAMADASS, P. et al. Characterization of Leptospiral Serovars by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. **Int. J. Syst. Bact.**, v.47, n.2, p.575-576, 1997.
- RAMADASS, P. et al. Genetic Characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by DNA Hybridization. **Int. J. Syst. Bact.**, v.42, n.2, p.215-219, 1992.
- ROBINSON, A.J. et al. Differentiation of subtypes within *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *balcanica* and *tarassovi*, by bacterial restriction-endonuclease DNA analysis (BRENDA). **J. Med Microbiol.**, v.15, p.331-338, 1982.
- ROMERO, E.C. et al. Detection of *Leptospira* DNA in Patients with Aseptic Meningitis by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.5, p.1453-1455, 1998.
- SALAS, C.E. et al. Characterization of two proteinases composing latex from *Carica candamarcensis*. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM PERSPECTIVES ON PROTEIN ENGINEERING, 6, 1997. **PROCEEDINGS**. Norwich: United Kingdom, 1997.
- SAMBROOK, J., FRISTSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p.11.48-11.51.
- SANGUINETTI, C.J., DIAS NETO, E., SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques.**, v.17, p.915-919, 1994.
- SANTA ROSA, C.A. et al. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n.29-30, p. 19-27, 1969/1970.
- SAVIO, M.L. et al. Detection and Identification of *Leptospira interrogans* Serovars by PCR Coupled with Restriction Endonuclease Analysis of Amplified DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.4, p.935-941, 1994.

- TAMAI, T., SADA, E., KOBAYASHI, Y. Restriction Endonuclease DNA Analysis of *Leptospira interrogans* Serovars *Icterohaemorrhagiae* and *Copenhageni*. **Microbiol. Immunol.**, v.32, n.9, p.887-894, 1988.
- THIERMANN, A.B. et al. Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe by restriction endonuclease analysis. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.61-66, 1986.
- VAN EYS, G.J.J.M. et al. Detection of Leptospire in Urine by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, n.10, p.2258-2262, 1989.
- WOODWARD, M.J. et al. Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype *bovis*. **Vet. Rec.**, v.128, p.282-283, 1991.
- WOODWARD, M.J., REDSTONE, J.S. Differentiation of leptospira serovars by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Vet. Rec.**, v.132, n.13, p.325-326, 1993.
- YASUDA, P.H. et al. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family *Leptospiraceae* with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. **Int. J. Syst. Bact.**, v.37, n.4, p.407-415, 1987.