

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Programa de Pós-Graduação

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE ISOLADOS
DE *LEPTOSPIRA* SPP. DE BOVINOS
EM MINAS GERAIS**

MARIA RAQUEL VENTURIM COSATE

Belo Horizonte - Minas Gerais

Junho / 2012

MARIA RAQUEL VENTURIM COSATE

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE ISOLADOS DE *LEPTOSPIRA*
SPP.DE BOVINOS EM MINAS GERAIS

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadores: Prof. Dr. Élvio Carlos Moreira

Prof. Dr. João Paulo Haddad

Coorientador: Prof. Dr. José Miguel Ortega

Belo Horizonte

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

C834i Cosate, Maria Raquel Venturim, 1978-
Identificação e análise comparativa de isolados do gênero *Leptospira* em rebanhos
bovinos leiteiros em Minas Gerais / Maria Raquel Venturim Cosate. – 2012.
96 p. : il.

Orientadores: Elvino Carlos Moreira, João Paulo Haddad
Coorientador: José Miguel Ortega
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de
Medicina Preventiva
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Leptospirose em animais – Teses.
3. *Leptospira* – Identificação – Teses. I. Moreira, Elvino Carlos. II. Haddad, João Paulo.
III. Ortega, José Miguel. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de
Medicina Preventiva. V. Título.

CDD – 636.214 089 69

Tese defendida e aprovada em 06 de julho de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. João Paulo Amaral Haddad
Presidente



Profª. Ana Lúcia Tabet do Nascimento



Prof. Cristiano Barros de Melo



Profª. Mônica Bucciarelli Rodriguez



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Humberto e Marlene e minha irmã Maria Paula, pelo amor, carinho, força, dedicação, alegrias e coragem. O amor de vocês estará sempre presente nos meus caminhos.

Ao professor Élvio Carlos Moreira, orientador, grande incentivador, profissional exemplar e amigo, sem seu apoio, estímulo e confiança este estudo seria impossível.

Ao professor João Paulo Amaral Haddad, orientador, incentivador e amigo. Agradeço ao grande apoio, confiança e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao coorientador e amigo Dr. José Miguel Ortega, por me receber em seu laboratório no momento mais difícil do doutorado, pelo seu apoio constante e grande incentivo.

Ao grande amigo Carlos Gustavo, pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz, unidade Ageu Magalhães, obrigada por todo o seu apoio, participação no trabalho e grande incentivo.

À grande amiga Natássia Caroline, você foi fundamental em todas as etapas da trajetória do doutorado. Obrigada pelo apoio, aprendizado e sua constante presença na minha vida.

Ao Bruno Brasil, obrigada pelo apoio, preciosa ajuda, profissionalismo e paciência.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, obrigada pelo grande apoio e por ter possibilitado a realização deste trabalho.

À amiga Camila, obrigada por sua presença, amizade, ajuda constante e seu apoio.

Às amigas Mariana, Isabela, Brisa, muito obrigada por agradáveis momentos de conversas, cafés, carinho, apoio e incentivo! Muito obrigada!

Ao amigo Rondon Neto, obrigada pela amizade, colaboração e incentivo.

À amiga Caroline Junqueira, obrigada por sempre estar presente nos momentos difíceis e por sempre me incentivar.

Aos amigos do Laboratório de Biodados Henrique, Rafael, Verônica, Lucas e Diego por momentos agradáveis e divertidos.

Aos profissionais André e Antônio Benjamin do Laboratório de Leptospirose da Escola de Medicina Veterinária - UFMG pelo apoio e suporte para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, obrigada pelo apoio, formação acadêmica e grande incentivo.

Aos amigos do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) - Departamento de Bioquímica e Imunologia que me incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	HISTÓRICO.....	18
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO E CULTIVO.....	19
2.3	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	19
2.4	FONTES DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO	20
2.5	DIAGNÓSTICO.....	21
2.6	CONTROLE.....	21
2.7	GENÔMICA DE LEPTOSPIRA	21
2.8	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE DO GÊNERO LEPTOSPIRA	23
2.8.1	Região conservada- 16Sr RNA ribossomal.....	23
2.8.2	Região específica de identificação do gênero <i>Leptospira</i> spp (<i>secy-G1-G2</i>).....	23
2.9	ANÁLISE COMPARATIVA DE LEPTOSPIRA SPP.....	24
2.9.1	Regiões de virulência e patogenicidade	24
2.9.2	Sequências de inserção – elementos móveis	26
2.9.3	Métodos de identificação de elementos móveis no genoma	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	HISTÓRICO DO ESTUDO	30
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEPTOSPIRA SPP.....	32
3.4	SELEÇÃO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA DE <i>LEPTOSPIRA SPP</i>	32
3.5	CULTIVO DE LEPTOSPIRA	32
3.6	TÉCNICAS SOROLÓGICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE LEPTOSPIRA SPP	33
3.6.1	Anticorpos monoclonais.....	33
3.6.1.1	Seleção dos anticorpos monoclonais para identificação de isolados de <i>Leptospira spp</i>	33
3.6.1.2	Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) com anticorpos monoclonais.....	33
3.7	EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>LEPTOSPIRA</i>	33
3.7.1	Método fenol – clorofórmio	33
3.7.2	Estimativa da quantidade do DNA.....	34
3.7.3	Construção de iniciadores para PCR – específica	34
3.7.4	Condições das PCRs - específicas.....	35

3.8	ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NA PCR - ESPECÍFICA	36
3.9	DIGESTÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO COM ENZIMA DE RESTRICÇÃO (HIND III)	36
3.10	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS PRODUTOS DE PCR	36
3.11	REAL – TIME – PCR	37
3.11.1	Curva padrão da PCR em tempo-real dos genes <i>secy</i> , IS1533 e IS1500.....	37
3.11.2	Quantificação relativa do número de cópias de IS1533 e IS1500 em <i>Leptospira spp</i>	38
3.11.3	Quantificação do valor absoluto do número de cópias de IS1533 e IS1500 em <i>Leptospira spp</i>	39
3.12	SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE <i>L.</i> <i>INTERROGANS</i> SEROVAR HARDJO STR. NORMA	39
3.12.1	Pirosequenciamento do genoma da cepa norma	39
3.12.2	Pirossequenciamento com a metodologia <i>paired end tags</i>	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DOS ISOLADOS DE LEPTOSPIRA SPP	41
4.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE LEPTOSPIRA SPP	42
4.2.1	Identificação de espécie dos isolados de <i>Leptospira spp</i>	42
4.2.1.2	Amplificação e sequenciamento total do gene 16S rRNA ribossomal	42
4.3	ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA DE LEPTOSPIRA SPP.....	45
4.3.1	Estudo comparativo da região <i>secy</i> (G1-G2) de isolados da sorovariedade Hardjo.....	45
4.3.2	Regiões antigênicas	47
4.3.2.1	Amplificação e sequenciamento parcial do gene <i>Loa22</i>	47
4.3.2.2	Análise “ <i>in silico</i> ” das sequências nucleotídicas do gene <i>Loa22</i> em <i>Leptospira spp</i>	50
4.3.2.3	Análise de restrição do gene <i>Loa22</i> com <i>HINDIII</i> em <i>Leptospira spp</i>	51
4.3.2.4	Análises “ <i>in silico</i> ” de sequências do gene <i>LigB</i> em <i>Leptospira spp</i>	51
4.3.2.5	Amplificação e sequenciamento parcial do gene <i>LigB</i>	53
4.4	LÓCUS RFB	56
4.4.1	Amplificação e sequenciamento parcial do gene <i>WZY</i> (ORF14) em <i>Leptospira spp</i>	56
4.4.2	Amplificação e sequenciamento parcial da região <i>Orf22</i>	57
4.4.3	Estudo filogenético de <i>Orf22</i> – locus <i>rfb</i>	59

4.4.4	Identificação do genótipo dos isolados de <i>Leptospira</i> spp classificados na sorovariedade hardjo	61
4.4.4.1	Amplificação parcial e sequenciamento da ORF36	61
4.4.5	Amplificação e sequenciamento parcial do gene WZX (ORF15).....	64
4.5	ESTUDO DE SEQUÊNCIAS DE INSERÇÃO EM LEPTOSPIRA SPP.....	66
4.5.1	Construção dos iniciadores para amplificação dos elementos móveis.....	66
4.6	REAL TIME – PCR EM SEQUÊNCIAS DE INSERÇÃO DE LEPTOSPIRA SPP.....	69
4.6.1	Seleção de gene endógeno e genes alvo (IS1533 e IS1500).....	69
4.6.2	Amplificação da sequência de inserção IS1533.....	71
4.6.3	Quantificação relativa do número de cópias das sequencias de inserção IS1533 em <i>Leptospira</i> spp	72
4.6.4	Quantificação absoluta do número de cópias de IS1533 de <i>Leptospira</i> spp.....	73
4.6.5	Sequência de inserção IS1500.....	74
4.6.5.1	Amplificação do gene endógeno <i>secy</i>	74
4.6.5.2	Curva padrão do gene endógeno <i>secy</i>	75
4.6.5.3	Amplificação da sequência de inserção IS1500.....	76
4.6.5.4	Curva padrão da sequência de inserção IS1500.....	76
4.6.5.5	Quantificação relativa do número de cópias das sequências de inserção IS1500 em <i>Leptospira</i> spp	77
4.6.5.6	Quantificação absoluta do número de cópias de IS1500 de <i>Leptospira</i> spp.....	77
4.7	APLICAÇÃO DO ESTUDO MOLECULAR EM CEPAS DE LEPTOSPIRA SPP.....	78
4.8	PIROSEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DO GENOMA DA CEPA NORMA	79
4.9	IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DOS ISOLADOS DE LEPTOSPIRA SPP.....	82
4.10	IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE LEPTOSPIRA SPP.....	83
4.11	ANÁLISE COMPARATIVA DE ISOLADOS DO GÊNERO LEPTOSPIRA	83
4.12	GENOMA DE <i>LEPTOSPIRA INTERROGANS</i> SOROGRUPO SEJROE SOROVARIEDADE HARDJO GENÓTIPO HARDJOPRAJITNO.....	89
5	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cepas de referência classificadas no gênero <i>Leptospira</i> utilizadas no estudo molecular	32
Tabela 2	Cepas de referência classificadas no gênero <i>Leptospira</i> utilizadas na reação de soroglutinação (MAT) com anticorpos monoclonais (mAbs)...	33
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> específicos utilizados para a identificação e classificação das cepas do gênero <i>Leptospira</i>	35
Tabela 4	Valores de quantificação relativa e absoluta de IS1533 em <i>Leptospira spp</i>	72
Tabela 5	Valores de quantificação relativa e absoluta de IS1500 em <i>Leptospira spp</i>	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo do delineamento experimental aplicado na identificação de <i>Leptospira</i>	31
Figura 2	Soroaglutinação (MAT) de isolados de <i>Leptospira spp</i> com anticorpo monoclonal F106C9	42
Figura 3	Soroaglutinação (MAT) de isolados de <i>Leptospira spp</i> com anticorpo monoclonal F16C28	42
Figura 4	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico com os iniciadores (<i>primers</i>) 16SF1/16SR1 e 16SF2/16SR2.....	43
Figura 5	Sequência nucleotídica do produto de amplificação correspondente ao fragmento da região 16S rRNA ribossomal dos isolados do genótipo hardjoprajitno	44
Figura 6	Análise de homologia das sequências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia com as sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados.....	44
Figura 7	Alinhamentos de sequências nucleotídicas (285bp) referentes à região <i>secy</i> (G1-G2) de isolados classificados no gênero <i>Leptospira</i>	46
Figura 8	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (<i>primers</i>) Loa 22F/Loa 22R analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo	47
Figura 9	Análise entre as sequências de nucleotídeos obtidas das cepas Lagoa e Bolívia e sequências depositadas em banco de dados	48
Figura 10	Alinhamento das sequências de nucleotídeos referentes ao gene <i>Loa22</i> de isolados de <i>Leptospira spp</i>	49
Figura 11	Eletroforese do produto de digestão com <i>HindIII</i> do fragmento de 560 bp (<i>Loa22</i>) de <i>Leptospira spp</i>	52
Figura 12	Alinhamento das sequências traduzidas “ <i>in silico</i> ” do gene <i>LigB</i> de <i>Leptospira spp</i>	52
Figura 13	Análise de homologia entre a sequência de nucleotídeos referente à porção C-terminal do gene <i>LigB</i> e sequências depositadas em banco de dados	52
Figura 14	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (<i>primers</i>) <i>LigBF/ LigBR</i>	53

Figura 15	Análise de homologia entre as sequências de nucleotídeos obtidas das cepas Lagoa e Bolívia e sequências depositadas em banco de dados	54
Figura 16	Alinhamento das sequências nucleotídicas de 510 bp do fragmento referente ao gene <i>LigB</i> em <i>Leptospira spp</i>	55
Figura 17	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (<i>primers</i>) ORF14F/ORF14R.....	57
Figura 18	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico com os iniciadores Orf22F/Orf22R	58
Figura 19	Sequência nucleotídica do produto de amplificação a região Orf22 dos isolados Lagoa e Bolívia	58
Figura 20	Análise de homologia entre as sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados Lagoa e Bolívia e sequências depositadas em banco de dados	59
Figura 21	Sequência hipotética de aminoácidos para a proteína do gene Orf22 do locus <i>rfb</i>	60
Figura 22	Análise da homologia entre a sequência traduzida “in silico” referente à ORF22 e sequências depositadas em banco de dados	60
Figura 23	Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ExoA do banco de dados com a sequência traduzida da Orf22	61
Figura 24	Eletroforese de produtos amplificados a partir de DNA genômico usando os iniciadores (<i>primers</i>) Orf36F e Orf36R.....	62
Figura 25	Análise de homologia entre as sequências nucleotídicas obtidas dos isolados Bolívia e cepa Hardjo (OMS) e sequências depositadas em banco de dados...	62
Figura 26	Sequência hipotética de aminoácidos para a proteína do gene Orf36 do locus <i>rfb</i>	63
Figura 27	Alinhamento das sequências nucleotídicas referentes ao gene ORF36 de isolados de <i>Leptospira spp</i>	63
Figura 28	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (<i>primers</i>) WZXF/WZXR	64
Figura 29	Sequência nucleotídica do produto de amplificação correspondente ao fragmento da região referente à WZXF/WZXR dos isolados Lagoa e Bolívia.....	65

Figura 30	Análise de homologia da sequência de nucleotídeos obtidas das cepas Lagoa e Bolívia referentes à região Orf15 e sequências depositadas em banco de dados.....	65
Figura 31	Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (<i>primers</i>) IS1533.....	67
Figura 32	Análise de homologia das sequências de nucleotídeos dos isolados Norma-CTG e Lagoa com sequências de banco de dados.....	67
Figura 33	Análise de homologia das sequências de nucleotídeos dos isolados Bolívia e a cepa de referência Hardjo (OMS).....	68
Figura 34	Sequência nucleotídica referente à sequência de inserção IS1533 da espécie <i>L. interrogans</i> , sorovariedade Copenhageni.....	69
Figura 35	Curva de dissociação do gene <i>secy</i> com a cepa classificada na sorovariedade Lai da PCR em tempo real um único ponto de temperatura de dissociação de 76,2°C.....	70
Figura 36	Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie <i>L. interrogans</i> com os iniciadores (<i>primers</i>) da região <i>secy</i>	70
Figura 37	Curva de dissociação da região IS1533 da PCR em tempo real mostrando um único ponto de temperatura de dissociação de 75,9°C.....	71
Figura 38	Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie <i>L. interrogans</i> com os iniciadores (<i>primers</i>) da região <i>secy</i>	71
Figura 39	Análise de variância (ANOVA – <i>one way</i>) dos valores de Δ Ct do gene normalizador (<i>secy</i>) e gene alvo (IS1533) das sorovariedades do gênero <i>Leptospira spp</i>	74
Figura 40	Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie <i>L. interrogans</i> com os iniciadores (<i>primers</i>) da região <i>secy</i>	75
Figura 41	Curva de dissociação da região IS1500 da PCR em tempo real mostrando um único ponto de temperatura de dissociação de 76,7°C.....	76
Figura 42	Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie <i>L. interrogans</i> com os iniciadores (<i>primers</i>) da região <i>secy</i>	77
Figura 43	Análise de variância (ANOVA – <i>one way</i>) dos valores de Δ Ct do gene normalizador (<i>secy</i>) e gene alvo (IS1500) das sorovariedades do gênero <i>Leptospira spp</i>	78

Figura 44	Representação esquemática de identificação de isolados do gênero <i>Leptospira</i> com aplicação de genes Orf22 e Orf36 localizados no locus rfb da sorovariedade Hardjo, genótipo hardjoprajitno, espécie <i>L. interrogans</i>	80
Figura 45	Distribuição das sequências geradas no sequenciador 454 por tamanho em bases	81
Figura 46	Montagem dos cromossomos (I e II) referentes à sequência completa do genoma da espécie <i>L. interrogans</i> sorogrupo sejroe sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius ou Centígrados
bp.....	Pares de bases
Ct.....	<i>Cycle threshold</i>
Da.....	Dalton
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxi-ribonucléico)
dNTP	Desóxi-nucleotídeos
EMJH	Ellinghausen - Mac Culloch - Johnson- Harris
et al.	Et all (e demais colaboradores)
IRs	Sequências repetidas invertidas
kb.....	Kilobases
kDa.....	Kilodalton (10^3 Da.)
KIT	Royal Tropical Institute
L	Litro
<i>LigB</i>	Região antigênica
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
LSSP-PCR...	<i>Low Stringency Single Polimorphism</i>
M.....	Concentração molar (moles/L)
MAT.....	Teste de Aglutinação Microscópica - <i>Microscopic Agglutination Test</i>
mg.....	Miligrama (10^{-3} g)
min	Minuto
ml	Mililitro (10^{-3} L)
mM	Concentração milimolar (10^{-3} moles/L)
MW	<i>Molecular weight</i> (peso molecular)
NCBI.....	<i>National Center Biotechnology Institute</i>
ng.....	Nanograma (10^{-9} g)
nM.....	Concentração nanomolar (10^{-9} moles/L)
nm.....	Nanômetro (10^{-9} m)
PCR.....	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)

PET.....	<i>Paired End Tags</i>
pH.....	Potencial hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
U.....	Unidade
V.....	Volts
W.....	Watts
μg.....	Micrograma (10 ⁻⁶ g)
μl	Microlitro (10 ⁻⁶ L)
μM.....	Concentração micromolar (10 ⁻⁶ moles/L)

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias classificadas no gênero *Leptospira spp.* Em bovinos é classificada como uma importante doença da reprodução associada com significativas perdas econômicas, especialmente em rebanho bovino leiteiro. Diante disso, este trabalho teve como objetivo realizar a classificação taxonômica de dois isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Leptospira spp.* mediante a caracterização sorológica e molecular das cepas bacterianas, assim como realizar a análise comparativa dos isolados regionais com cepas de referência diretamente associadas ao desenvolvimento da doença em humanos e cepas de importância veterinária. A classificação taxonômica do gênero *Leptospira spp.* foi desenvolvida com a utilização de anticorpos monoclonais selecionados de acordo com histórico de prevalência da doença na região em estudo e aplicados na metodologia de microaglutinação para a determinação da classificação sorológica, na qual estão inclusos a caracterização de sorogrupo e sorovariedade. A microaglutinação indicou que os isolados denominados Lagoa e Bolívia pertencem ao sorogrupo Sejroe e sorovariedade Hardjo. A identificação da espécie das cepas em estudo foi realizada com a utilização de genes conservados, incluindo 16S rRNA ribossomal e *secy*, os quais confirmaram a classificação dos isolados na espécie *Leptospira interrogans*. No estudo comparativo das cepas regionais e de referência foram selecionados os genes *ORF14*, *ORF15*, *ORF22*, *ORF36* localizados no locus *rfb*, o qual é descrito estar associado a codificação de lipopolissacarídeos de membrana, genes associados a virulência do microrganismo, denominado *LigB* e elementos móveis do genoma, conhecidos como *IS1533* e *IS1500*, com os quais foram realizadas quantificação do número de cópias distribuídas no genoma mediante aplicação da técnica de Real time PCR. As análises permitiram identificar diferenças significativas destes elementos móveis entre os isolados com idêntica classificação taxonômica. Também foram realizados sequenciamento parciais destes elementos, os quais sugeriram a ocorrência de transferência lateral entre cepas classificadas nas espécies *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii* pertencentes a sorovariedade Hardjo. A análise comparativa com o gene *ORF22* permitiu a discriminação de cepas ao nível de sorogrupo e sorovariedade, enquanto a *ORF36* mostrou-se única para cepas classificadas no genótipo hardjoprajitno. Por fim, o sequenciamento completo do genoma da cepa Norma permitiu a identificação diferenciada de genes associados à virulência entre cepas de *Leptospira spp.* Portanto, os ensaios desenvolvidos sugerem que estes genes podem contribuir na identificação, classificação e estudos moleculares epidemiológicos do gênero *Leptospira spp.*

Palavras chave: Leptospirose bovina, genótipo hardjoprajitno, sequenciamento genômico, sequências de inserção, locus *rfb*.

ABSTRACT

Leptospirosis is caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* spp. This zoonotic disease is distributed globally and affects domestic animals, including cattle. In livestock production, *Leptospira interrogans* serogroup Sejroe serovar Hardjo and *Leptospira borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Hardjo remain important species associated with this reproductive disease. Previous studies on Brazilian livestock have reported that *L. interrogans* serovar Hardjo is the most prevalent leptospire agent in this country and that it is related to leptospirosis clinical signs, leading to economic loss in production. Here, we focused on describing the isolation of three clinical strains obtained from leptospirosis outbreaks. Serological and molecular typing using housekeeping genes (*secY* and 16SrRNA), *rfb* locus genes (ORF 14, ORF15, ORF22, ORF36), virulent gene (*LigB*) and mobile elements (IS1500 and IS1533) were applied for the identification and comparative analysis of *Leptospira* spp. Our results confirmed the isolation of *L.interrogans* serovar Hardjo in Brazilian livestock. Genetic analysis using ORF22 and ORF36 lead us to group leptospira into serogroup taxonomic degree of classification. Genetic approaches were also applied to compare leptospira strains using IS1500 and IS1533 copy number analysis. The results suggest genetic variability among *L. interrogans* serovars species of reference bacterial strains and clinical isolates, which may contribute to leptospirosis identification and bacterial genetic variability. Furthermore, the results allow us to identify our three isolates (Norma, Lagoa and Bolivia) as belonging to *L. interrogans* species. Finally, we performed the whole genome sequence of Norma strain and distinct virulence associated genes profile were detected. Those results may contribute to improving the identification and epidemiological studies of leptospirosis in livestock production.

Keywords: Leptospirosis, bovine, Hardjo, isolation, Hardjoprajitno

1 INTRODUÇÃO

As leptospiroses são zoonoses bacterianas de importância médica e econômica distribuídas mundialmente causadas por diferentes espécies do gênero *Leptospira* spp. Na classificação taxonômica as leptospiroses são classificadas na ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae (Faine et al., 1999) e até o início da década de 80 a classificação destes microrganismos era realizada de acordo com características antigênicas, dividindo o gênero em duas espécies: *Leptospira interrogans*, compreendendo os sorovares patogênicos e *Leptospira biflexa*, compreendendo sorovares não patogênicos. Esta divisão realizada com base em critérios de reações sorológicas específicas resulta em 23 sorogrupos constituídos por aproximadamente 250 sorovariedades de *Leptospiras* patogênicas e saprófitas (Faine et al., 1999).

Em 1987 foi proposta uma nova classificação do gênero *Leptospira* em espécies genômicas baseada na homologia de DNA pela reação de hibridização e características fenotípicas. A heterogeneidade genômica encontrada permitiu propor oito espécies patogênicas, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. santarosai* e *L. weilii*. e três espécies saprófitas *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii* (Yasuda et al., 1987; Ramadass et al., 1992). A classificação taxonômica do gênero *Leptospira* spp é divergente dos demais gêneros bacterianos, no qual além da identificação de espécie, há a identificação de bactérias em nível de sorogrupo e

sorovariedade e em casos específicos é possível a identificação de genótipo.

Em bovinos, a sorovariedade de maior relevância na leptospirose bovina é a sorovariedade Hardjo, pertencente às espécies *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*. A *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo apresenta-se mais adaptada à espécie bovina e corresponde à sorovariedade descrita com elevada frequência em inquéritos sorológicos bovinos, enquanto a *L. interrogans* serovar Hardjo está diretamente associada ao quadro clínico da leptospirose (Ellis, 1994). A sorovariedade Hardjo apresenta uma particularidade quanto à taxonomia com a classificação em genótipo, compreendendo o genótipo Hardjobovis e Hardjoprajitno, respectivamente. Na comparação dos genótipos hardjoprajitno e hardjobovis são descritas diferenças como regiões geográficas de isolamento, quadro clínico da leptospirose e divergências quanto aos parâmetros moleculares.

Os genótipos hardjoprajitno e hardjobovis foram descritos em diferentes países no mundo. O primeiro isolamento do genótipo hardjoprajitno foi descrito na Indonésia com isolamento do agente de paciente humano em 1936 (Faine et al., 1999). Relatos no Reino Unido, México e Nigéria confirmaram a presença do genótipo hardjoprajitno e associação com o desenvolvimento da doença em animais (Zuerner et al., 1993). Na América Latina a primeira descrição da sorovariedade hardjo, genótipo hardjoprajitno foi realizado na Argentina com o isolamento da espécie bovina relatado por Myers e Jelambi (1975). No Brasil, o primeiro relato de isolamento da sorovariedade Hardjo foi realizado no estado de Minas Gerais e descrito por Moreira (1994) com a obtenção da cepa

Norma, classificada na espécie *Leptospira interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo genótipo Hardjoprajitno. A importância da leptospirose bovina no Brasil reside no fato de ser uma doença reprodutiva de notificação não obrigatória por órgãos e entidades públicas do país, ser responsável por perdas econômicas no rebanho bovino leiteiro e controle questionável. A presente investigação pretende contribuir no conhecimento de cepas isoladas de *Leptospira spp.* obtidas no estado de Minas Gerais para o desenvolvimento de métodos eficientes na identificação de cepas bacterianas do gênero *Leptospira spp* utilizando-se marcadores moleculares específicos para diferentes regiões do genoma de *Leptospira spp.* e mediante a realização do sequenciamento completo do genoma de cepa bacteriana isolada no Estado de Minas Gerais.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo inicial deste trabalho foi realizar a identificação sorológica e molecular de dois isolados do gênero *Leptospira spp.*, utilizando anticorpos monoclonais e técnicas de PCR com sequenciamentos parciais de diferentes regiões codificadoras do genoma como estratégias de classificação taxonômica e análise comparativa dos isolados regionais e cepas de referência com relevância na patogenia em bovinos e humanos. A análise comparativa teve por objetivo identificar regiões genômicas codificadoras com potencial para aumento da especificidade no diagnóstico da leptospirose bovina para contribuição no conhecimento epidemiológico em estudos de prevalência desta patologia. Como fundamentado na

introdução, a *L.interrogans* sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno, historicamente foi isolada de paciente humano e em Minas Gerais representa a sorovariedade de maior prevalência no rebanho bovino.

1.1.2 Objetivos específicos

Foi proposta a comparação do perfil genético das cepas classificadas como *L. interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo genótipo Hardjoprajitno com diferentes sorovariedades classificadas nas espécies *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii* mediante a análise de regiões específicas do genoma denominadas regiões conservadas (16SrRNA e *secy*), região antigênica (*LigB*), regiões codificadoras de lipopolissacarídeos de membrana (lôcus *rfb*) e elementos móveis (sequências de inserção IS1500 e IS1533) descritos nestas espécies genômicas e envolvidos com recombinação genética.

Avaliação *in silico* de genomas fechados de cepas de referência de *Leptospira spp* disponíveis em banco de dados com sequências comuns de IS1500 e IS1533 para aplicação *in vitro* na análise comparativa de cepas de *Leptospira spp.*

Avaliação e quantificação do número absoluto de elementos móveis (IS1500 e IS 1533) do genoma em diferentes cepas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* mediante o uso de *real-time* PCR.

Sequenciamento completo do genoma da cepa Norma, classificada na espécie *Leptospira interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno, utilizando a tecnologia de

pirosequenciamento de DNA no equipamento 454 (Genome Sequencer – FLX), em colaboração com o Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), com o objetivo de aprofundar o conhecimento acerca da *L.interrogans* sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno str.Norma com o propósito de identificar diferenças com demais cepas de referência que contribuam para explicar características fenotípicas e patogênicas deste genótipo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A primeira descrição da leptospirose foi realizada por Weil, em 1886, como uma espiroquetose, uma síndrome íctero-infecciosa febril, que posteriormente ficou conhecida como Doença de Weil. O agente etiológico foi descoberto por Inada e colaboradores, em 1916, no Japão, em meio de cultura de Noguchi (Faine et al., 1999). A primeira citação da leptospirose bovina foi publicada na URSS por Mikhin e Azhinov, 1935 (Amatredjo et al., 1975), que isolaram *Leptospira griptothyphosa* de vacas com infecção e hemoglobinúria aguda.

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E CULTIVO

As leptospirosas são microrganismos helicoidais, flexíveis e móveis, medindo 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de

diâmetro. Possuem um corpo citoplasmático com dois filamentos axiais enrolados em espiral envolvidos em uma membrana externa. As leptospirosas possuem as extremidades dobradas em forma de gancho. São visualizadas por microscopia de campo escuro ou contraste de fase (Faine et al., 1999). As leptospirosas são microrganismos aeróbios obrigatórios, utilizando ácidos graxos de cadeia longa saturada e insaturada como fonte de energia e carbono. Os ácidos graxos são requeridos como fonte de lipídeos, já que elas não podem sintetizá-los (Faine et al., 1999).

O cultivo de leptospirosas é realizado em meios de Fletcher (Fletcher, 1928) e Stuart (Stuart, 1946) acrescidos com 8 a 10% de soro de coelho ou Ellinghausen - Mac Culloch - Johnson- Harris (EMJH), acrescido de albumina e ácidos graxos (Ellinghausen; McCullough, 1965).

2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A classificação taxonômica de bactérias classificadas no gênero *Leptospira spp* apresenta critérios distintos à classificação bacteriológica de microrganismos. A definição do gênero *Leptospira spp* é realizada de acordo com a descrição de características morfológicas como motilidade, flexibilidade, crescimento ótimo em pH 7.2-7.6 a 28°C – 30°C e visualização do agente em campo escuro com crescimento adequado de 6 – 14 dias.

A classificação ao nível de espécie em bactérias corresponde à base de classificação taxonômica bacteriana, de acordo com regras internacionais de nomenclatura. Historicamente, a técnica de hibridização do DNA foi indicada como a metodologia de referência para o delineamento de identificação de espécies bacterianas no gênero *Leptospira spp* (1031), porém devido à dificuldade na aplicação da técnica na rotina laboratorial diversas metodologias moleculares foram descritas com o objetivo de caracterização destes microrganismos, como por exemplo, a análise de regiões 16S rRNA e 23S rRNA ribossomais. As análises genômicas destas regiões permitem a identificação da espécie de leptospiros (Perolat et al., 1994) .

A classificação taxonômica do gênero *Leptospira spp.* apresenta duas bases de classificação, dentre elas a identificação sorológica e genética. Em nível sorológico as bactérias do gênero podem ser classificadas em sorogrupo e sorovariedade e a identificação genética permite a determinação taxonômica ao nível de espécie e, em alguns casos, a determinação em nível de genótipo (Faine et al., 1999). A sorovariedade é definida mediante a aplicação de reação de aglutinação com o uso de grupos de anticorpos específicos (anticorpos monoclonais) escolhidos de acordo com critérios epidemiológicos como hospedeiro do agente, região geográfica de isolamento, características do ambiente (urbano e rural) e histórico de isolamentos na região de estudo. Teoricamente, a sorovariedade corresponde ao grupo de leptospiros que apresenta em comum antígenos específicos expressos em superfície de membrana e codificados por genes localizados no locus *rfb* e

identificados nas provas sorológicas (De la Peña-Moctezuma et al., 1999). Aproximadamente 100 genes distintos são responsáveis por características sorológicas deste grupo bacteriano. A grande variedade de proteínas sintetizadas neste locus bacteriano resulta em um grande número de sorovariedades existentes neste gênero bacteriano. De forma geral, leptospiros classificadas no mesmo sorogrupo e na mesma sorovariedade estão classificadas na mesma espécie genômica, porém isso não acontece em cepas classificadas na sorovariedade Hardjo. Neste caso, é possível identificar leptospiros classificadas em três espécies distintas, como *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. meyeri*. A definição de sorogrupos corresponde aos grupos do gênero *Leptospira spp.* definidos por associação de informações sorológicas e em análises genômicas. Na maior parte dos grupos do gênero *Leptospira spp.* os microrganismos classificados na mesma espécie pertencem também à mesma sorovariedade, e assim, ao mesmo sorogrupo, porém existem exemplos nos quais microrganismos classificados na mesma sorovariedade estão classificados em espécies diferentes, como por exemplo, o sorogrupo Sejroe, no qual está classificada a sorovariedade Hardjo.

Os diversos sorogrupos e sorovariedades descritas no gênero *Leptospira spp* devem apresentar no critério de aglutinação diferença mínima de 10% quando comparadas entre si. A partir deste critério os grupos com relações antigênicas mais próximas são classificadas no mesmo sorogrupo, nos quais os membros possuem o mesmo grupo de antígenos e não apresentam reação cruzada significativa com membros de outros sorogrupos (Faine et al., 1999). O

último nível de classificação de isolados do gênero *Leptospira spp* é conhecido como nível subsovariedade ou genótipo (Faine et al., 1999). Este nível adicional de diferenciação e classificação de isolados do gênero *Leptospira spp* é aplicado somente para a sovariedade Hardjo, na qual estão classificados os subtipos hardjobovis e hardjoprajitno, pertencentes as espécies *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*, respectivamente.

2.4 FONTES DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO

As principais fontes de transmissão da leptospirose correspondem com o contato com a água contaminada com urina contaminada de animais portadores como ratos (*Rattus norvegicus*) e cães no meio urbano e bovinos e equinos no meio rural. Os bovinos desempenham um importante papel na manutenção e transmissão do agente etiológico causando surtos no rebanho. A transmissão do microrganismo em bovinos pode ocorrer de forma direta ou indireta. A transmissão direta ocorre por via sexual e congênita (via transplacentária). Em bovinos, os órgãos reprodutores podem atuar na manutenção do microrganismo (Ellis et al., 1986, Ellis, 1994).

A forma indireta ocorre com o contato direto com órgãos contaminados, como por exemplo, restos placentários ou fetos abortados de animais. Animais infectados podem excretar leptospirosas na urina por semanas ou meses após a fase aguda da doença e no ambiente este agente infeccioso sobrevive por longos períodos.

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de referência da leptospirose em bovinos é o Teste de Aglutinação Microscópica (*Microscopic Agglutination Test* ou MAT) e o isolamento do microrganismo. A soroadglutinação permite a identificação do sorogrupo infectante na região, entretanto, é um teste de difícil interpretação dos resultados devido à elevada ocorrência de reação cruzada entre sorovares de características antigênicas similares, além de exigir a manutenção de um grande número de antígenos de diversas sovariedades. O isolamento do agente consiste na segunda metodologia indicada para o diagnóstico da leptospirose e este pode ser feito com a cultura de amostras clínicas como urina, sangue, líquido cefalorraquidiano e tecidos. O cultivo de *Leptospira spp* é uma metodologia difícil e demorada para obtenção de resultados conclusivos, mas de grande importância para os estudos epidemiológicos da doença (Faine et al., 1999; Hathaway et al., 1986).

2.6 CONTROLE

O controle da leptospirose bovina é realizado com a vacinação do rebanho bovino com uso de vacinas comerciais. Recomenda-se a vacinação anual de todos os animais do rebanho. Em regiões com histórico recente de surto de leptospirose recomenda-se que a vacinação dos animais seja efetuada a cada seis meses (Faine et al., 1999).

2.7 GENÔMICA DE LEPTOSPIRA

O trabalho pioneiro de sequenciamento completo do genoma de bactérias do gênero *Leptospira* foi referente à espécie *Leptospira interrogans*

sorovarietade Lai cepa 56601 (Ren et al., 2003), a qual foi isolada de humano com quadro clínico de leptospirose. O estudo de genomas neste gênero foi descrito a seguir na sorovarietade Copenhageni cepa L1-130 classificada na espécie *L. Interrogans*, na espécie *L. borgpetersenii* sorovarietade Hardjo genótipo hardjobovis cepas L550 e JB197 e na espécie saprófita *L. biflexa* cepas Patoc e Paris (Nascimento et al., 2004, Bulach et al., 2006, Picardeau et al., 2008).

Atualmente, um grande número de sequenciamento e anotação parciais de genomas de diversas sorovarietades estão disponíveis no banco de dados do *National Center Biotechnology Institute* (NCBI), incluindo a sorovarietade Hebdomadis, Wolffi, Australis. As leptospiros pertencem ao filo *Spirochaetales*, os quais correspondem à maior estirpe filogenética bacteriana classificada em protobactéria e pertencem ao grupo procarioto com mais de um cromossomo, em conjunto com *Vibrio cholerae* e *Ralstonia solanacearum* (Dryselius et al., 2008). Estudos comparativos interespecies de grupos de protobactérias indicam a presença de dois cromossomos não proporcionais, sendo o segundo com tamanho bem reduzido quando comparado ao primeiro. Em *Ralstonia solanacearum* e *Burkholderia pseudomallei* os estudos revelaram o cromossomo maior contendo grande parte dos genes relacionados com o crescimento bacteriano e genes essenciais, enquanto o segundo com número bem reduzido de genes, dentre os quais a maior parte sem função estabelecida e genes correlatos com funções transcricionais (Dryselius et al., 2008).

Similar ao descrito para os genomas de *Vibrio cholerae* e *Ralstonia solanacearum*, em *Leptospira spp.*, o genoma

destes microrganismos são compostos por dois cromossomos circulares, um grande com aproximadamente 4,35 Mb e um pequeno com tamanho aproximado de 0,35 Mb. O seu genoma possui conteúdo médio de G+C de 36% com aproximadamente 4.900 sequências abertas de leitura, as quais 50% não apresentam homologia com regiões codificadoras conhecidas ou ortólogos com proteínas de outros microrganismos (Ren et al., 2003). O pequeno replicon presente no genoma deste gênero bacteriano foi descrito como cromossomo com base na identificação do gene MetF, o qual é responsável por codificar a enzima metileno tetrahydrofolato redutase. Genes relacionados com funções de vias metabólicas, como glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, assim como enzimas de biossíntese de cofatores podem ser identificadas distribuídas nos cromossomos I e II. A conexão funcional entre os dois replicons justifica a definição do pequeno replicon como de fato um segundo cromossomo do gênero (Ren et al., 2003, Nascimento et al., 2004).

Em relação ao metabolismo foram identificados genes relacionados com utilização de ácidos graxos de cadeia longa, ácido tricarboxílico e cadeia transportadora de elétrons, concluindo que as leptospiros geram adenosina trifosfato ATP por fosforilação oxidativa, ao contrário de espiroquetas *Treponema palladium* e *Borrelia burgdorferi* que geram ATP somente por fermentação de açúcares (Ren et al., 2003). Estudos referentes ao genoma da sorovarietade Copenhageni relataram a presença de genes relacionados com síntese de cobalamina, elemento essencial para síntese de vitamina B12, distribuídos nos cromossomos I e II deste microrganismo. Na

comparação de vias metabólicas das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* é possível citar diferenças na síntese de uroporfirinogenio III entre as espécies (Nascimento et al., 2004).

Os estudos comparativos do genoma de leptospiros indicam a observação de eventos de inversão cromossômica, presença de ilhas de patogenicidade e deleção genômica (Nascimento et al., 2004, Bulach et al., 2006, Picardeau et al., 2008). O genoma da espécie *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo genótipo Hardjobovis apresenta redução genômica de 700 Kb, em relação à espécie *L. interrogans* (Bulach et al., 2006). Os mecanismos de alteração genômica destes microrganismos podem estar associados ao grande número de elementos móveis distribuídos ao longo do genoma ou relacionados ao mecanismo de adaptação do agente infeccioso ao hospedeiro (Bulach et al., 2006).

A comparação de genomas completos das cepas L550 e JB197 pertencentes à sorovariedade Hardjo genótipo hardjobovis evidenciou rearranjos genéticos com a participação de sequências de inserção, justamente localizadas nas extremidades do locus duplicado S10-spc operon na cepa JB197, indicando que os elementos móveis podem alterar a organização genômica dos microrganismos e mediar a diferenciação de cepas bacterianas (Bulach et al., 2006).

2.8 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE DO GÊNERO *LEPTOSPIRA SPP*

2.8.1 Região conservada - 16Sr RNA ribossomal

No genoma bacteriano os genes *rRNA* ribossomais são essenciais para a sobrevivência dos organismos, uma vez que ocorre nas organelas responsáveis pela síntese protéica. A *sequência* destes genes corresponde a regiões altamente conservadas, desta forma a caracterização do gene 16S rRNA ribossomal é estabelecida como metodologia padrão para a identificação de espécie, gênero e famílias de bactérias (Amann et al., 1995; Woese et al., 1987). Ao contrário, poucas sequências de 23S rRNA e 5S são utilizadas com o objetivo de estudos filogenéticos (Fukunaga et al., 1989).

Em *Leptospira spp* foram descritos dois genes codificantes para a região 16SrRNA que encontram-se dispersos no genoma, assim como os genes referentes às regiões 23SrRNA e 5S, diferenciando este gênero bacteriano de demais bactérias (Fukunaga et al., 1989; Baril et al., 1992).

A aplicação desta região para estudos de classificação taxonômica foi descrita em diferentes trabalhos prévios, dentre os quais Morey et al. (2006) descreveram a diferenciação de três clados no gênero *Leptospira spp*, composto por espécies patogênicas, não patogênicas e o terceiro grupo de cepas com indeterminada patogenicidade e intermediária correlação entre as sequências 16SrRNA. Além disso, todas as cepas foram identificadas a partir do gene 16S rRNA, porém o clado de cepas não patogênicas apresentaram maior similaridade e, em muitos casos, as diferenças estavam restritas a um número menor de 10 pares de base. Pérolat et al. (1993)

demonstraram que a análise da região 16S rRNA em conjunto com enzimas de restrição possibilita reagrupar espécies de leptospiros de acordo com características genéticas. Em estudo filogenético da ordem das espiroquetas seis grupos distintos foram identificados, sendo que, no último grupo foram incluídas as espécies *Leptonema illini*, *Leptospira biflexa* e *Leptospira interrogans* que representam o grupo com maior grau de diferenças na região 16S Rna (Paster et al., 1991).

2.8.2 Região específica de identificação do gênero *Leptospira spp* (*secy*- G1-G2)

A organização genômica de diferentes grupos e gêneros bacterianos apresentam particularidades, isto é, genes que determinam as características específicas de determinados gêneros. Em *Leptospira spp*, o gene constitutivo que permite a identificação do gênero é denominado *secy* e foi descrito inicialmente como G1/G2. A primeira descrição do gene *secy* região G1-G2 foi realizada por Gravekamp et al.(1993) em estudo comparativo desta região em cepas do gênero classificadas nas espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Na organização genômica do gênero *Leptospira spp* o gene *secy* está localizado no operon S10-spc- α , no qual ocorre síntese de proteínas ribossomais e a biossíntese de *secy*, o qual é responsável por codificar a proteína de membrana com função de translocase (Gravekamp et al., 1993).

A avaliação deste gene em diferentes sorovariedades de *Leptospira spp* para o diagnóstico de leptospirose em

humanos foi descrita para caracterização de diferentes isolados com uso de PCR convencional e, posteriormente, em associação com uma técnica molecular adaptada a partir da PCR convencional denominada LSSP-PCR (*Low Stringency Single Polimorphism*) - PCR (Oliveira et al., 2003).

Nesta técnica faz-se avaliação de mobilidade de banda e classificação de cepas de acordo com perfis eletroforeticos dos isolados. Oliveira et al. (1993) descreveram elevado potencial de discriminação desta região em estudos de leptospirose em pacientes humanos. Em estudos filogenéticos do gênero *Leptospira spp* o gene *secy* encontra-se em diferentes espécies e sorogrupos, representando região genômica relevante no estudo destas espiroquetas. Estudos prévios descreveram a aplicação do gene *secy* na determinação de sorovariedades de isolados e os resultados encontrados foram comparados com avaliações realizadas com genes que codificam lipoproteínas de membrana (Lip41, Lip32), gene adK e icdA. Na análise comparativa dos resultados obtidos o gene *secy* mostrou elevada capacidade discriminativa de 41 cepas isoladas de diferentes hospedeiros e em diversas regiões geográficas (Ahmed et al., 2009).

2.9 ANÁLISE COMPARATIVA DE *LEPTOSPIRA SPP*

2.9.1 Regiões de virulência e patogenicidade

As regiões antigênicas no genoma bacteriano são definidas por genes responsáveis por codificação de proteínas com domínios antigênicos que apresentam

como característica comum a capacidade de estímulo do sistema imune do hospedeiro (Faine et al., 1999). A partir da década de 90 o estudo de determinantes antigênicos no gênero *Leptospira spp* demonstrou avanços com a identificação de proteínas de membrana externa associadas a mecanismos de virulência e patogenicidade de leptospiros. Neste grupo estão inclusas as proteínas Omp11 (Haake et al., 1993), Lip41, Lip36 (Matsunaga et al., 2007b), OMP-A – Loa22 (Kozumi; Watanabe et al., 2003).

Dentre as proteínas citadas acima, o gene Loa22 que codifica a proteína Loa22 lipoproteína que possui em sua estrutura um domínio na posição C-terminal de homologia com OMP-A e, portanto, descrito inicialmente com características patogênicas (Haake et al., 2004; Ristow et al., 2001). As lipoproteínas são componentes fundamentais de membranas de eubactérias e possuem funções variadas, incluindo funções estruturais, transportadoras e funcionam como enzimas com importante papel na interação com o hospedeiro (Cullen et al., 2004). Estudos recentes de imunofluorescência com a proteína Loa22 demonstraram que esta proteína está localizada na membrana externa de *Leptospira spp* e sugere a participação deste componente de membrana no estímulo do sistema imune do hospedeiro, desempenhando importante papel na virulência destes microrganismos (Ristow et al., 2001).

Estudos recentes mostram a aplicação de genes codificantes de proteínas com domínio de OMP-A em estudos filogenéticos bacterianos com o objetivo de identificação e diferenciação de cepas com classificação taxonômica similar. Em estudos recentes com bactérias classificadas

no gênero *Chlamidia* foi descrita a análise da região OMP-A associada à técnica de RFLP para a caracterização de isolados bacterianos (Roux et al., 2000).

Em estruturas protéicas os domínios protéicos são responsáveis por determinar características específicas associadas a distintos aspectos bacterianos. Em *Leptospira spp* o segundo grupo protéico com características de virulência reconhecida são as proteínas Lig (McBride et al., 2009). Os genes *Ligs* codificam proteínas com características estruturais associadas a fatores de virulência bacteriana, envolvendo a interação de hospedeiro-patógeno com componentes de matriz extracelular, incluindo fibrinogênio, colágeno e laminina (Cerqueira et al., 2009).

Na família dos genes *Ligs* encontram-se os genes *LigA*, *LigB* e *LigC* dentre os quais somente o *LigB* pode ser identificado em todas as espécie patogênicas de *Leptospira spp* e apresenta a *sequência* de nucleotídeos com maior número de polimorfismos em espécie genômicas de *Leptospira* (Mc Bride et al., 2009). Estudos prévios relatam a aplicação do gene *LigB* em estudos filogenéticos para a identificação e caracterização de isolados deste gênero, o que possibilitou a caracterização diferencial de isolados do gênero *Leptospira spp* com diferenciação das espécies *L. interrogans*, *L. Kirchneri*, *L. borgpetersenii*, *L. weilli* e *L. noguchi* (Mc Bride et al., 2009).

Em bactérias como *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* e diferentes gêneros classificados no grupo das protobactérias, os lipopolissacarídeos de membrana são caracterizados como agentes importantes na patogenia bacteriana e relacionados com quadros de bacteremia com aumento de fator

de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 e ativação de fatores do complemento, além de estímulo de células dendríticas (Wakabayashi et al., 1991, Torres et al., 2006). Porém, em *Leptospira spp* a constituição destes lipopolissacarídeos é diferencial quando comparada aos diferentes grupos bacterianos e não há associação direta de patogenicidade com os lipopolissacarídeos de membrana (locus rfb). Os lipopolissacarídeos de membrana são moléculas compostas por cadeias de polissacarídeos que apresentam a região hidrofóbica composta por lipídeos e região hidrofílica repetida com cadeias de oligossacarídeos que podem apresentar de dois a seis açúcares na estrutura, denominadas de antígeno-O. Em bactérias, a região do antígeno-O corresponde ao constituinte primário de lipopolissacarídeos e corresponde à região diferencial entre os diversos gêneros bacterianos (Shin et al., 2007). Em *Leptospira spp* a biossíntese do antígeno-O e lipopolissacarídeos ocorre no locus rfb. A primeira descrição deste locus foi realizada por Mitchison et al. (1999), na espécie *L. interrogans*, sorovariedade Copenhageni. No estudo demonstraram que a região é composta por 31ORFS transcritas na mesma direção e que o principal açúcar componente do locus corresponde a rhamnose. A região é composta por uma série de glycosyltransferases que atuam na polimerização do antígeno-O, além de epimerases e transferases (Bulach et al., 2000).

Kmenty et al. (1993) descreveram um estudo sorológico de diferentes sorovarietades classificadas no gênero *Leptospira spp.*, no qual estudos com bactérias pertencentes ao mesmo sorogrupo foram analisadas, dentre eles o sorogrupo

Sejroe. Os resultados indicaram a correlação direta entre cepas as cepas da sorovariedade Hebdomadis, Mini e Hardjo.

O segundo estudo descrevendo a organização do locus rfb no gênero *Leptospira spp* foi realizado na espécie *L. borgpetersenii*, sorovariedade hardjo, genótipo hardjobovis, no qual identificaram 31ORFS transcritas na mesma direção com síntese da rhamnose como principal açúcar na composição do locus e a ocorrência de regiões intergênicas localizadas entre as regiões codificadoras de proteínas. Foi identificada uma série de regiões intergênicas com elevada homologia com elementos móveis, dentre eles a região intergênica entre a ORF14 e ORF15 com sequência de nucleotídeos similar à família de inserção IS5 (Kalambaheti et al., 1999).

Na análise do locus *rfb* da espécie *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjo (subtipo hardjoprajitno) foram identificadas em sua composição 32ORFS transcritas na mesma direção com regiões intercaladas no genoma compostas por genes adquiridos da espécie *Leptospira borgpetersenii* sorovariedade Hardjo (subtipo hardjobovis) (ORF1-ORF14 e ORF21-ORF22) e *L. interrogans*, sorovariedade Copenhageni (ORF15-ORF23) por transferência lateral de genes. No estudo comparativo do locus dos subtipos Hardjoprajitno e Hardjobovis foi descrito que o locus rfb do genótipo hardjioprajitno possui uma ORF diferencial codificante na região localizada entre a ORF 4 e ORF 5 denominada de Orf36 (de La-Peña-Moctezuma et al., 1999, Kalambaheti et al., 1999). O locus rfb está diretamente associado às características fenotípicas atribuídas aos isolados do gênero *Leptospira spp* e na classificação sorológica é descrito

como responsável por características de sorogrupo e sorovariedade destes microrganismos (de La-Peña-Moctezuma et al., 1999).

A dupla composição deste locus no genótipo Hardjoprajitno permite sugerir a aquisição de genes e com isso confirmar a transferência lateral de genes que em procariotos corresponde a um mecanismo essencial, no qual estão envolvidos aspectos evolutivos do microrganismo e relacionados com a adaptação do agente microbiano ao ambiente ou hospeiro (Dutta; Pan, 2002). O reconhecimento de transferência lateral de genes em bactérias ocorreu a partir de 1950 com o advento da ocorrência de resistência bacteriana a antibióticos e a partir da confirmação deste mecanismo, fatores relacionados com virulência de patógenos e a adaptação de microrganismos ao meio ambiente foram elucidados (Ochman et al., 2000).

2.9.2 Sequências de inserção – elementos móveis

O genoma bacteriano é composto por regiões conservadas, regiões antigênicas, regiões relacionadas com vias metabólicas e elementos móveis, no qual estão classificados os transposons e as sequências de inserção. As sequências de inserção representam os menores elementos móveis constituintes do genoma e possuem a capacidade de movimentação e translocação mediante a síntese da proteína transposase, responsável por atribuir a principal característica destes elementos do genoma (Mahillon; Chandler, 1998).

No estudo de diversos gêneros bacterianos e em eucariotos foram

identificados aproximadamente 1500 elementos móveis distribuídos em 20 famílias definidas de acordo com as transposases codificadas, o grau de conservação do sitio catalítico e organização de repetições invertidas, característica única das sequências de inserção (Siguier et al., 2006).

Em relação à localização destes elementos, naturalmente ocorrem em plasmídios bacterianos, considerados elementos genéticos acessórios e com capacidade de transferência entre vários gêneros e espécies. Já em cromossomos bacterianos a densidade de elementos móveis geralmente está abaixo de 3%, excepcionalmente em alguns exemplos. A introdução do elemento móvel no genoma ocorre de forma randômica, porém algumas bactérias possuem especificidade genômica para distintas famílias de sequências de inserção (Siguier et al., 2006).

Estes elementos têm sido associados com vários fatores como resistência bacteriana (Boutouille et al., 2004), virulência (Kunze et al., 1991) e por proporcionar alterações metabólicas (Schmid-Appert et al., 1997, Schmid et al., 1997), além de determinar a plasticidade genômica em procariotos (Syvanen, 1994, Lawrence et al., 1998). Estão envolvidos com a ativação e inibição da expressão gênica de diversos genes em microrganismos (Touchon; Rocha, 2007).

Em *Leptospira spp* o estudo dos elementos móveis foi descrito inicialmente na década de 1990 com a clonagem e identificação de sequências repetidas de DNA na espécie *L. borgpetersenii* (Pacciarini et al., 1992), descrita como IS1533, classificada na família IS110-like.

Em seguida, foram realizados estudos de identificação mediante uso de sondas de hibridização associadas a enzimas de restrição *EcoRI* e *HhaI* específicas para o genótipo Hardjobovis no diagnóstico clínico da leptospirose bovina (Zuerner et al., 1993). Estudos epidemiológicos de isolamento de bactérias do gênero *Leptospira spp* associado com a correlação com hospedeiros e regiões geográficas foram desenvolvidos mediante a identificação da sequência de inserção IS1533. Nestes estudos foram identificadas diferentes cepas da espécie *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo genótipo Hardjobovis. Zuerner et al. (1993) descreveram o agrupamento de cepas em 14 diferentes grupos de acordo com o perfil de restrição encontrado com as enzimas, sugerindo que as diferenças genéticas no genótipo Hardjobovis estão diretamente associadas ao diferente número de cópias desta sequência de inserção no genoma e a mobilidade característica deste elemento (Zuerner et al., 1993).

A IS1533 é responsável por rearranjos gênicos na espécie *L. borgpetersenii* a partir do flanqueamento do locus S10-spc- α duplicado na cepa L550 (Kalambaheti et al., 1999). Este elemento móvel foi identificado nas cepas JB197 e L550 com 84 e 77 cópias completas no genoma, respectivamente e corresponde a 3,5% do genoma total desta espécie.

Zuerner et al. (1995) realizaram o estudo com base na metodologia de PCR específica para a identificação do número de cópias de IS1533 em sorovariedades pertencentes à espécie genômica *L. interrogans*. No estudo foram utilizadas várias conjunções de iniciadores (*primers*) para a caracterização de isolados, dentre os

quais foram identificados amplicons de tamanhos variados no genoma.

Em *L. interrogans* a sequência de inserção descrita em diferentes sorovariedades é denominada de IS1500. Este elemento foi inicialmente descrito por Zuerner et al. (1995) que a partir da análise da sequência de nucleotídeos de 1236bp identificaram características estruturais de sequências de inserção com sequências repetidas invertidas (IRs) na região central do fragmento de 1159bp. O elemento foi então descrito como IS1500. A localização de algumas sequências de inserção IS1500 estão associadas com regiões do genoma que sofreram grandes rearranjos genéticos em *Leptospira spp*.

Zuerner et al. (1995) aplicaram a técnica de hibridização para a caracterização da sequência de inserção IS1500 em sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans* e determinaram a presença de uma cópia completa do elemento móvel na sorovariedade *icterohaemorrhagiae* cepas Verdun e RZ11, enquanto em diferentes sorovariedades foram identificados fragmentos do elemento móvel IS1500 descrito como responsável na ocorrência de rearranjos gênicos no genoma do gênero *Leptospira spp*.

Kalambaheti et al. (1999) descreveram que o locus *rfb* encontra-se localizado em ilha genômica adquirida de bactéria Gram-negativa. Na espécie *Leptospira borgpetersenii*, a sorovariedade Hardjo apresenta em sua estrutura genômica sequências de inserção IS1533 (família IS110) distribuídas ao longo do locus *rfb* com flanqueamento dos genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeo (LPS) em *Leptospira spp*.

Haake et al. (2004) relataram que as sequências de inserção estão associadas aos mecanismos de deleção, aquisição e transferência de genes em diversos microrganismos. A transferência de material genético pode ocorrer por via horizontal (lateral) ou vertical. Em *Leptospira spp* evidências de transferência lateral de genes foram confirmadas nas espécies *Leptospira biflexa*, *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii* (Picardeau et al., 2008, Bullach et al., 2006).

Nascimento et al. (2004) realizaram a análise comparativa do genoma das sorovariedades Lai e Copenhageni classificadas na espécie *L. interrogans*. No estudo foram comparados diferentes aspectos do genoma destes microrganismos, dentre os quais a distribuição dos elementos móveis IS1500 e ISLin1 distribuídos em grande número em sorovariedades classificadas nesta espécie genômica. No estudo foi descrito o número idêntico de oito cópias no genoma para as duas sorovariedades patogênicas.

Bullach et al. (2006) sequenciaram o genoma completo das cepas L550 e JB197 classificadas na espécie *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo genótipo Hardjobovis e determinaram que 12% do genoma desta sorovariedade é composto por sequências de inserção. No genótipo hardjobovis foram descritas diversas famílias de elementos insercionais que apresentam características distintas no estabelecimento da transposição e na estrutura de sítio catalítico, sendo o mais frequente a ocorrência de elementos móveis com a estrutura DDE. Na análise comparativa das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* foi identificada uma redução genômica de 700 Kb da sorovariedade Hardjo em relação ao genoma da

sorovariedade Lai. O impacto das sequências de inserção no genoma de procariotos é variável. Em estudos filogenéticos com membros da espécie *Bordetella spp*, foi indicado que a *Bordetella parapertussis* com genoma de 4.77 Kb possui aproximadamente 100 cópias de sequências de inserção, enquanto a *Bordetella pertusis* com 260 sequências de inserção apresentou redução genômica de 600 Kb (Siguier et al., 2006).

Essa redução genômica foi relatada por Lawrence et al. (2001), os quais discutiram a presença de pseudogenes distribuídos ao longo do genoma bacteriano e a associação do número destes componentes com o influxo de elementos móveis (transposons). Foi demonstrado que a formação de pseudogenes está relacionada com a alteração de metabolismo e adaptação destes microrganismos.

2.9.3 Métodos de identificação de elementos móveis no genoma

A técnica de hibridização representa a principal metodologia adotada para a quantificação do número de cópias de genes descritos como multicópias e foi descrita para análise de perfil genômico de isolados do gênero *Leptospira spp* (Zuerner et al., 1993). Atualmente, para a quantificação do número de cópias de elementos móveis no genoma bacteriano a técnica de real time – PCR quantitativa corresponde a uma alternativa para a diferenciação do número de cópias de diferentes genes e em diversas cepas bacterianas. A aplicação desta técnica possibilita a discriminação e comparação de microrganismos com classificação

taxonômica diversa. A técnica de Real Time PCR possui algumas vantagens em relação à técnica de hibridização, como por exemplo, ser de rápida execução, exigir pequena quantidade de material para sua realização, além de grande precisão na quantificação do material (Hoebeeck et al., 2007). Porém, apesar de prática e eficiente requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a fluorescência e coleta da emissão e um computador com um *software* para a aquisição dos dados (Novais; Alves, 2004).

A leitura das amostras baseia-se na detecção e quantificação de compostos fluorescentes que emitem um sinal de luz que aumenta na proporção direta a quantidade do produto de PCR em uma reação, permitindo monitorar a quantidade de produto gerado durante todos os ciclos (Novais; Alves, 2004; Ambion, 2005). O ponto em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, denominado de *Cycle Threshold* (Ct), permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (Dorak, 2004). Dessa forma, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado em tempo real (*Applied Biosystem*, 2005).

Existem algumas variações nos métodos de emissão da fluorescência em PCR em tempo real e diferentes fluoróforos estão disponíveis no mercado e podem ser utilizados de acordo com cada ensaio específico, entretanto, os compostos fluorescentes mais utilizados são *TaqMan* e *SYBR Green*.

A técnica de *real time* PCR pode ser aplicada para inferências quantitativas e

qualitativas nos ensaios biológicos. Para a determinação do número de cópias de genes no genoma são descritas as metodologias de análise de curva padrão e metodologia de Ct comparativo. O estabelecimento da curva padrão no ensaio de PCR em tempo real tem por finalidade mensurar valores de Ct a partir de diluições seriadas de DNA genômico de cepa controle, para assim determinar os valores de Ct no estudo de cepas desconhecidas (Hoebeeck et al., 2007). O método de Ct comparativo corresponde à estratégia adicional no estabelecimento da quantificação relativa e absoluta do número de genes no genoma de determinado microrganismo. A aplicação da técnica de real time-PCR para a caracterização de isolados bacterianos foi demonstrada por Koidl et al. (2007) que analisaram o número de cópias de duas sequências de inserção IS481 e IS1001 em *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica*, em que em um dos resultados descritos indica que a IS 481- PCR systems foi mais sensível quando comparado com IS1001 para a detecção de *B.pertussis*.

Em *Leptospira spp* a aplicação da técnica de *Real Time* PCR no gênero *Leptospira* foi descrita pela primeira vez por Ahmed et al. (2009) que desenvolveram uma metodologia com uso de SYBR Green para detecção de *leptospiras* patogênicas em amostras clínicas e neste estudo o gene *secy* foi usado como normalizador da reação. Com a finalidade de diagnóstico rápido da doença utilizaram sondas referentes às regiões 16SrRNA ribossomal e Lip32 para a detecção do microrganismo no sangue em pacientes humanos (Thaipadunpanit et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 HISTÓRICO DO ESTUDO

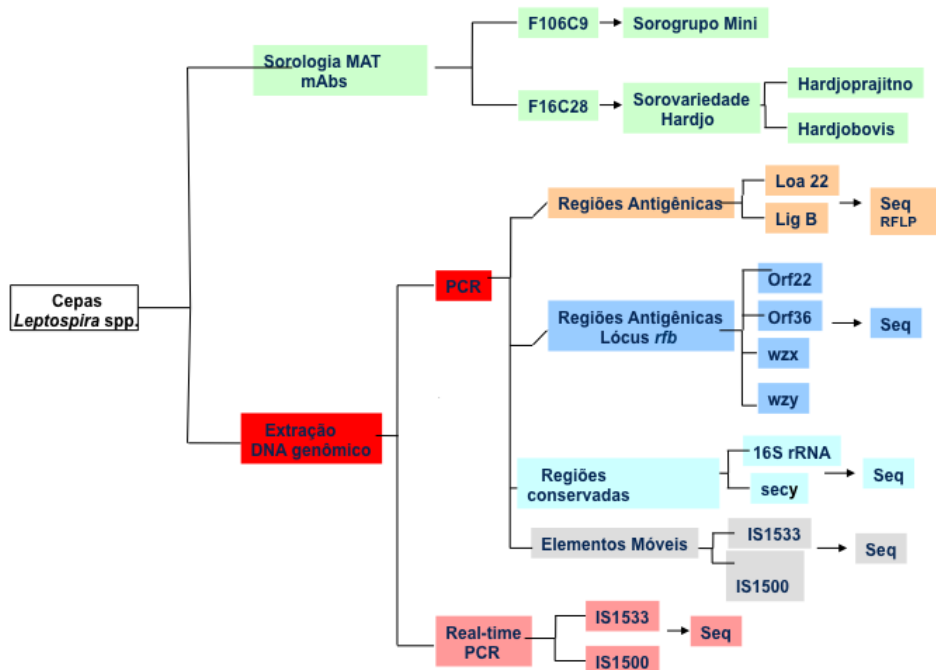
Em uma fazenda de produção leiteira localizada no município de Santo Antônio do Monte (região centro-oeste do Estado de Minas Gerais) foi identificado um surto de leptospirose bovina. A confirmação da doença foi realizada com a associação do quadro clínico reprodutivo dos animais e com o exame sorológico para leptospirose. A partir de resultados sorológicos positivos foi realizada a tentativa de isolamento do agente, a partir de urina de animais com manifestações clínicas da doença. O quadro clínico relatado foi a ocorrência de aborto, repetição de cio e redução da produção de leite. Na tentativa de isolamento do agente foram confirmados dois isolamentos positivos de cepas bacterianas classificadas no gênero *Leptospira*, os quais foram denominados Lagoa e Bolívia (Chiareli et al., 2012).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na identificação dos isolados Lagoa e Bolívia e a análise comparativa dos isolados regionais com as cepas de referência foram realizadas duas análises distintas no presente estudo. Na primeira

análise foi estabelecida a necessidade de realização da identificação sorológica dos isolados Lagoa e Bolívia com o uso de anticorpos. Os anticorpos monoclonais (F106C9 e F16C28) foram selecionados com base na prevalência sorológica de estudos prévios e no histórico de isolamento do agente na região e sugeridos por pesquisadores do laboratório de referência Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam com sugestão de aplicação da técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) para a determinação do sorogrupo e sugestão da sorovariedade. Em seguida, para a identificação de espécie foram selecionados genes conservados para a execução da identificação molecular dos isolados Lagoa e Bolívia. Para o estudo comparativo de cepas isoladas com bactérias de referência foram selecionados genes associados com a síntese de LPS (lôcus *rfb*), associados com virulência (*LigB*) e constituinte de domínio de OMP-A (*Loa22*) e elementos móveis relevantes em *L. borgpetersenii* (IS1533) e *L. interrogans* (IS1500) com aplicação da metodologia de sequenciamento parcial do DNA genômico e quantificação do número de cópias dos elementos móveis com uso de Real-time PCR. Por fim, foi realizado o sequenciamento do genoma completo da cepa Norma com o objetivo de maior conhecimento a respeito deste genótipo bacteriano, visto que não havia genoma fechado do genótipo Hardjoprajitno.

Figura 1 - Esquema representativo do delineamento experimental aplicado na identificação de *Leptospira*



Análises sorológicas e genômicas aplicadas na caracterização e comparação de cepas isoladas e de cepas de referência classificadas no gênero *Leptospira*.

3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE *LEPTOSPIRA SPP*

Foram utilizadas 12 cepas de referência de *Leptospira spp* para os ensaios moleculares. As sorovariedades selecionadas pertencem às espécies genômicas *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii* patogênicas para a espécie humana e bovina (Tabela 1). As amostras foram cedidas pelo antigo Centro Pan-Americano de Zoonoses, sendo que, as cepas denominadas CTG e Mini foram isoladas em Minas Gerais no ano de 1994, por Moreira (1994) e tipificadas no Royal Tropical Institute (KIT), em Amsterdã, Holanda. Os isolados denominados Bolívia e Lagoa correspondem aos objetos de estudo deste trabalho.

3.4 SELEÇÃO DAS CEPAS DE REFERÊNCIA DE *LEPTOSPIRA SPP*

As cepas de referência de *Leptospira spp* utilizadas no estudo genômico comparativo com os isolados regionais, incluindo as cepas Lagoa e Bolívia foram selecionadas de acordo com diferentes critérios, como por exemplo, identidade ao nível sorológico, classificação em espécie genômica, importância na leptospirose bovina e sequenciamento genômico completo disponível para acesso no banco de dados (NCBI). As espécies genômicas selecionadas para todas as análises envolvendo sequências nucleotídicas do DNA genômico estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Cepas de referência classificadas no gênero *Leptospira* utilizadas no estudo molecular

Espécie	Sorogrupo	Sorovariedade	Cepa
L.interrogans	Icterohaemorrhagiae	Lai	Lai
L.interrogans	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M-20
L.interrogans	Icterohaemorrhagiae	Pomona	Pomona
L.interrogans	Icterohaemorrhagiae	Canicola	Hond Utrecht IV
L.interrogans	Bataviae	Bataviae	Von Tienen
L.interrogans	Sejroe	Hardjo	OMS
L.borgpetersenii	Sejroe	Sejroe	Sejroe
L.borgpetersenii	Sejroe	Hardjo	Sponselee
L.borgpetersenii	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
L.borgpetersenii	Mini	Mini	Sari

3.5 CULTIVO DE *LEPTOSPIRA*

As sorovariedades de *Leptospira* foram cultivadas em meio líquido de Ellinghausen e McCulloch, modificado por Johnson e Harris – EMJH (Johnson et al.,1967). O meio EMJH foi utilizado no estado semisólido para manutenção das culturas estoques repicadas a cada dois meses. Para obtenção de concentração adequada de microrganismo, foram feitos repiques a partir do meio semisólido para o meio líquido. O repique foi realizado retirando um volume de 1 ml de cultivo de *Leptospira* na fase exponencial para 10 ml de meio líquido. As *Leptospiras* em meio líquido foram repicadas semanalmente e incubadas em aerobiose, na temperatura de 29°C, ao abrigo da luz.

3.6 TÉCNICAS SOROLÓGICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE *LEPTOSPIRA SPP*

3.6.1 Anticorpos monoclonais

3.6.1.1 Seleção dos anticorpos monoclonais para identificação de isolados de *Leptospira spp*

Os anticorpos monoclonais foram selecionados considerando parâmetros de histórico de isolamento de bactérias do gênero *Leptospira* na região e o histórico da espécie animal do isolamento do agente. Em Minas Gerais foram isoladas as sorovariedades Mini e Hardjo, sendo assim foram selecionados dois anticorpos monoclonais (F106C9 e F16C28), classificados no sorogrupo sejroe, específicos para a identificação de cepas bacterianas da sorovariedade mini e sorovariedade hardjo, respectivamente.

Os anticorpos monoclonais foram adquiridos do Royal Tropical Institute (KIT)- Amsterdã e utilizados com a aplicação da metodologia de soroprecipitação microscópica (MAT), para qual foram estabelecidas cepas de referência como controle de reação sorológica na identificação das cepas bacterianas (Tabela 2).

Tabela 2 - Cepas de referência classificadas no gênero *Leptospira* utilizadas na reação de soroprecipitação (MAT) com anticorpos monoclonais (mAbs)

Espécie	Sorovariedade	Cepa	F106C9	F16C28
L. interrogans	Hardjo	OMS	X	X

L. interrogans	Wolffi	Wolffi	
L. borgpetersenii	Hardjo	HB	X
L. borgpetersenii	Sejroe	Sejroe	
L. borgpetersenii	Mini	Swajizak	X

3.6.1.2 Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) com anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais F106C9 e F16C28 foram diluídos de 1:100 à 1:6400 em solução salina de acordo com a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT). As diluições seriadas foram realizadas em tubos de ensaio de vidro que em seguida foram transferidas para placas de porcelana. Um volume de 50 µl de cada cultura bacteriana referente às cepas controle e isolados Lagoa e Bolívia foi adicionado à diluição dos anticorpos monoclonais e após 10 minutos as reações de soroaglutinação foram analisadas em microscopia de campo escuro para a confirmação das reações de soroaglutinação.

3.7 EXTRAÇÃO DO DNA DE LEPTOSPIRA

3.7.1 Método fenol – clorofórmio

Um volume de 1,5 ml de cultura de cada amostra foi centrifugado a 13.000 x g por 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi retirado e os sedimentos de culturas de *Leptospiras* foram ressuspensos em 200 µl de solução de extração com SDS (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%) juntamente com 100 µg/µl de Proteinase K por mililitro de volume

final. As suspensões foram homogeneizadas e incubadas *overnight* a 37°C.

As extrações serão feitas uma vez com fenol saturado com solução de Tris HCl 1M, uma vez com fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico na proporção (25:24:1) e uma vez com clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), volume a volume com a fase aquosa. Em seguida, os extratos foram homogeneizados por 10 minutos, e centrifugados a 13.000 g por 10 minutos, à temperatura ambiente, para a separação da fase aquosa. O DNA contido na fase aquosa foi precipitado com dois volumes e meio de etanol 100%, gelado, e com um décimo do volume final de solução de acetato de amônia 7,5 M. A mistura foi incubada a -20°C *overnight*. Após a precipitação, o DNA foi lavado duas vezes com 400 µl de etanol 70% e centrifugado a 13.000 x g, por 10 minutos.

Após as lavagens, o sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão e os tubos, foram colocados no *speed-vac*, por 10 minutos, para secagem. Todos os DNA foram ressuspensos com 20 µl de água bidestilada com realização da estimativa de quantidade do DNA e armazenados a 4°C.

3.7.2 Estimativa da quantidade do DNA

As concentrações dos DNA obtidos a partir dos cultivos de *Leptospiras* foram determinadas através da eletroforese em gel de agarose 1%, comparado com o padrão de peso molecular λ DNA/ Hind III. A solução de agarose foi preparada com tampão Tris-borato EDTA de acordo com

Sambrook et al. (1989). As amostras foram aplicadas no gel no volume de 3 µl de cada DNA mistura igual ao volume de tampão de amostra concentrado duas vezes, contendo azul de bromofeno 1 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 50% em solução aquosa (Sambrook et al., 1989). O gel foi submetido a uma tensão de 75 V por, aproximadamente, uma hora. Após a corrida, o gel foi corado com uma solução contendo brometo de etídio 0,5 µg/ml. Após esta etapa o gel foi examinado sob luz ultravioleta e as quantidades de DNA foram estimadas comparativamente com o padrão de tamanho molecular λ DNA/ HindIII (Sambrook et al., 1989). A estimativa da quantidade de DNA também foi estimada pela medida de absorbância 260/280 nm em espectrofotômetro modelo *BioPhotometer plus* (Eppendorf).

3.7.3 Construção de iniciadores para PCR – específica

Neste trabalho foram construídos 13 pares de iniciadores, totalizando 26 sequências, para as diversas regiões gênicas

analisadas, sendo que, dois pares referentes à região conservada (gene 16S rRNA), dois pares referentes à região específica de *Leptospira spp* (*secY* e G1-G2), pares relacionados com as regiões antigênicas (gene *Loa22* e gene *LigB*), cinco pares referentes ao locus *rfb* (Orf14-WZY, Orf15, -WZX, Orf22, Orf36) e dois pares envolvidos com sequências de inserção (IS1533 e IS1500). Os parâmetros utilizados para a construção de todos os *primers* foram análise “*in silico*” de temperaturas de anelamento dos pares de iniciadores, pesquisa de formação de “*hairpin*” e/ou “*primer dimer*”, além de identificação de homologia com as regiões alvo, sendo que esta análise foi realizada com uso do programa Blast (NCBI). Os *primers* descritos para a região G1/G2 foram obtidos a partir do clone de uma biblioteca genômica de *L. interrogans*, sorovar *icterohaemorrhagiae* cepa RGA (Gravekamp et al., 1993). Para a construção dos iniciadores foram utilizadas sequências de referência depositadas no banco de dados do NCBI. As sequências utilizadas no trabalho estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* específicos utilizados para a identificação e classificação das cepas do gênero *Leptospira*

Gene	Sequência dos Iniciadores	T° Alinhamento	Amplicon (bp)	Acesso
Loa	F-5'-TTATTGTTGTGGTGCGGA R-5'-GCTCGGTGCAATTGCATT	54	1500	AE16823
Orf15	F-5'-GAGTTTGGATMGCCCGCTAT R-5'-ATATGCGGATCGATCAGATT	54	578	CPOOO350
LigB	F-5'-ATAATGGAAGTATAATAC F-5'-GAATTCCGTTTTTCGTTAT	56	474	AE016863
ORF22	F-5'-ATT ATT GAG ACA GAG ATA R-5'-AAG CGG AAC GGG ACG AAT	56	561	JQ965147- JQ965150
ORF14	F-5'-ATGTCGCTTATTTGTGCA F-5'-ATTTATTCTTCCCAAACA-3	56	490	AF144879
16S rDNA	F1-5'-ACTAACGCT GGC GGC GCG R1-5'-TACCCACGCTTTCGTGCC F2-5'-GGATTAGATACCCCGGTAA R2-5'-GTAAAAAGGTAGCCGTAT	54	1500	CP000348
<i>secY</i> (1)	F: GCG ATT CAG TTT AAT CCT G R: GCG ATT CAG TTT AAT CCT GC	54	245	KU2167449- KU216751/FJ667608
ORF36	F: AGT CGG GGT TCG ATA CTG	54	489	JQ765636-

	R: GGT CAG TCC TGT AAC TGC		JQ765639.1
IS1500*	F: TAC GGA GCA AGA ACG GTT R: AGA TCC GAT TCT TAT GAT TC	56	143
IS1533*	F: TTG TAA TCC CTG TGT TGT TT R: TTA AAT AGT CCA CTC CTC G	56	130
<i>secY</i> (2)*	F: CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT R: GAA GGC TGG TAA ACA AAA G	54	130

Na tabela estão descritas as temperaturas de anelamento, tamanhos dos amplicons e fontes de acesso às sequências no *GenBank* ou referência bibliográfica.

3.7.4 Condições das PCRs - específicas

A amplificação do DNA obtido de cultivo de *Leptospira spp* foi realizada em condições específicas com anelamento de todos os iniciadores utilizados em alta stringência. As reações de PCR foram realizadas para o volume final de 25 µl, contendo 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µl de tampão com concentração final de 10 mM KCl e 10 mM Tris – HCl, 10 pmoles de iniciadores, 10ng/µl de DNA genômico e 1U de Taq polimerase platinum.

Na PCR específica, o primeiro ciclo de amplificação consistia em desnaturação a 95°C por três minutos, anelamento dos *primers* a (T°C) por um minuto e extensão com amplificação do DNA a 72°C por um minuto. Nos 29 ciclos subsequentes, a temperatura de desnaturação foi de 94°C por um minuto, e no último ciclo, a temperatura de extensão foi prolongada por 10 minutos.

3.8 Análise dos produtos amplificados na PCR - específica

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%, em TAE

1X e corado com solução de brometo de etídeo 0.5 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Foi aplicado um volume de 4 µl do produto amplificado diluído em tampão de amostra de DNA 6X. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 80 V, 60 minutos. Após a eletroforese, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989). Os padrões de peso molecular 1 Kb e/ou λ HindIII (Invitrogen) foram utilizados para a comparação dos produtos amplificados com a determinação do tamanho do amplicon obtido. Os géis foram documentados em câmera fotográfica Kodak modelo DC40. A dosagem do DNA também foi realizada por medida de absorbância 260/280 nm em espectrofotômetro modelo BioPhotometer plus (Eppendorf). Em seguida, os produtos foram purificados com resina Sephacryl S-200 por gel filtração, na qual foi aplicado um volume de 25nµl do produto de PCR na coluna contendo a resina, e então, centrifugado a 13.000 rpm por dois minutos. O material recuperado foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000* (Thermo Scientific).

3.9 DIGESTÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO (*HIND III*)

O fragmento amplificado de 560 bp com os *primers* Loa22F e Loa22R foi purificado em resina Sephacryl S-200, e em seguida um volume de 7 µl do material amplificado foi incubado com 1 µl de enzima HindIII (10U/ µl), no banho maria à 37°C por quatro horas. Após este período a enzima foi inativada por 10 minutos à 65°C e o material foi amplificado em gel de agarose 1%, com tampão TAE (1X) e corado em solução de brometo de etídeo por 10 minutos.

3.10 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS PRODUTOS DE PCR

As amostras purificadas foram submetidas a reações de sequenciamento utilizando-se, 10 pmols de cada um dos iniciadores específicos para as regiões antigênicas (iniciadores Loa22 e *LigB*), locus rfb (Orf14-WZY, Orf15-WZX, Orf22, Orf36), região conservada (16S rRNA), região específica em *Leptospira spp* (*secy* e G1-G2) e sequências de inserção (IS1500 e IS1533), seguindo o protocolo para *Big Dye™ Terminator Ready Reaction Mix* (derivado de Sanger et al., 1977).

A reação de sequenciamento foi realizada para um volume final de 10 µl, contendo 0,5 µl de *Big Dye*, 2,0 µl de tampão de reação, *primer* específico (*Forward* ou *Reverse*) a 10 pmol, 1,0 µl do DNA (150 ng). Na PCR do sequenciamento, o primeiro ciclo consistiu de desnaturação a 96°C por um minuto, nos 30 ciclos subsequentes, a temperatura de desnaturação foi de 96°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* foi de 4°C abaixo da temperatura de anelamento descrita para

cada iniciador específico e extensão de 60°C por quatro minutos.

Após a PCR, foi realizada a precipitação do material com adição de 40 µl de isopropanol a 65% nas amostras e incubação por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 45 minutos, retirado o excesso de isopropanol e adicionados 500 µl de etanol 60%. Os tubos foram centrifugados novamente a 14 000 rpm durante 10 minutos e secos no *speed-vac*. Em seguida, foi adicionado 15 µl de formamida às amostras que então eram incubadas a 96°C por dois minutos. As reações foram aplicadas no sequenciador capilar automático modelo *ABI PRISM 3.100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas tiveram seus cromatogramas analisados e posteriormente foram editadas utilizando o pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing; Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998) a fim de estabelecer as sequências consenso e remover as bases de baixa qualidade. O nível de exigência foi Phred acima de 20. As sequências consenso foram comparadas por homologia com sequências nucleotídicas disponibilizadas no banco de genomas do *GenBank* do National Center for Biotechnology Information, utilizando o programa Nucleotide Blast do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1990).

3.11 REAL – TIME – PCR

3.11.1 Curva padrão da PCR em tempo-real dos genes *secy*, IS1533 e IS1500

Na padronização da PCR em tempo real para o gene *secy* (normalizador) foram utilizadas doze diluições do DNA genômico, a partir da quantidade de 700 ng de DNA genômico das sorovariedades Lai e Copenhageni classificadas na espécie *Leptospira interrogans*. Em conjunto com o DNA genômico, os iniciadores referentes ao gene *secy* foram utilizados na concentração estabelecida de 400 pmol, de acordo com o descrito por Ahmed et al. (2009).

No estabelecimento da curva padrão da sequência de inserção IS1533 foram utilizadas treze diluições do DNA genômico a partir da quantidade inicial de 700 ng, da sorovariedade Lai, classificada na espécie *L. interrogans*. As diluições seriadas do DNA genômico foram utilizadas em conjunto com os iniciadores referentes à região IS1533. As condições de amplificação para as reações foram de 50°C por cinco minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, sendo os dados coletados na fase de extensão (72°C).

Na construção da curva padrão da IS1500 foram utilizadas 12 diluições seriadas do DNA genômico a partir da quantidade de 700 ng do material genômico da sorovariedade Copenhageni, classificada na espécie *L. interrogans*. As diluições seriadas do DNA genômico foram utilizadas em conjunto com os iniciadores referentes à região IS1500. As condições de amplificação para as reações foram de 50°C por cinco minutos, 95°C por 10 minutos, e

40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, sendo os dados coletados na fase de extensão (72°C).

Ao final dos 40 ciclos de amplificação das amostras com todos os iniciadores utilizados (*secy*, IS1533 e IS1500) foram analisadas quanto às curvas de curvas de dissociação, com o objetivo de analisar a especificidade da reação mediante identificação de formação de dímeros de iniciadores e/ou produtos inespecíficos. As amostras teste de cada sorovariedade em conjunto com os iniciadores foram analisadas em triplicatas, em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, EUA), amplificadas no Aparelho *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems). A reação de amplificação foi realizada utilizando o Kit comercial *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para análise das curvas padrão foram avaliados os parâmetros de eficiência da reação, valores de inclinação da reta (R^2) obtidas de valores logarítmicos de fluorescência em cada ciclo de reação e os valores de *slope* definidos como representativos com valores acima de 3,85.

3.11.2 Quantificação relativa do número de cópias de IS1533 e IS1500 em *Leptospira spp*

As quantificações relativas do número de cópias de IS1533 dos isolados e cepas de referência foram realizadas utilizando a metodologia de PCR em tempo real. As reações foram realizadas utilizando-se o Kit comercial *SYBR® Green*

PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA genômico e a concentração dos iniciadores (*primers*) utilizados foram os que demonstraram maior eficiência no processo de padronização das reações de acordo com a metodologia descrita acima.

A reação de amplificação da PCR contendo DNA genômico, par de iniciadores, Master Mix (dNTPs, SYBR Green) e Taq polimerase em volume final de 25 µl, foi incubada a 50°C por cinco minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos e 60 °C por um minuto, sendo os dados coletados na fase de extensão (72°C). Os controles negativos (ausência de DNA genômico) foram utilizados em todas as placas de análises das amostras. Cada cepa de isolados e cepas de referência de *Leptospira spp* foram analisadas em triplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystem) e amplificadas no aparelho *ABI PRISM 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystem).

A quantificação relativa foi realizada com aplicação do método de Ct (*cycle threshold*) comparativo, com os resultados relativos ao gene de referência endógeno (normalizador) e uma cepa controle. Os valores de Ct correspondem aos ciclos de amplificação do material genético que atuam como base para a comparação entre as amostras. O valor de *threshold* pode ser determinado pelo aparelho, ou então estabelecido no ponto exponencial das curvas de amplificação onde as amostras mostram a mesma intensidade de fluorescência, ou seja, a mesma quantidade do produto de PCR. Na quantificação relativa do número de cópias da sequência

de inserção IS1533 a sorovariedade Lai foi estabelecida como controle na amplificação da IS1533, visto que possui no genoma um número confirmado de sete cópias do elemento móvel (Zuerner et al., 1993). A quantificação relativa baseia-se na frequência relativa do gene alvo em relação ao gene endógeno, sendo que neste experimento o gene endógeno utilizado como controle da reação foi *secy*. Na quantificação relativa do número de cópias da sequência de inserção IS1500 a sorovariedade Copenhageni foi utilizada como controle e de acordo com análises in silico realizadas neste trabalho foi identificada uma cópia do elemento IS1500. A quantificação relativa baseia-se na frequência relativa do gene alvo em relação ao gene endógeno, sendo que neste experimento o gene endógeno utilizado como controle da reação foi *secy*.

Para a realização da quantificação relativa do número de cópias das sequências de inserção IS1500 e IS1533 nas cepas de estudo foram obtidos valores de Ct. Para o cálculo do Ct comparativo foram estipulados os valores de ΔCt (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno) e em seguida foi determinado o valor de $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da amostra - ΔCt da amostra de referência). A equação aplicada para a normalização dos valores obtidos de Ct foi $2^{-\Delta\Delta Ct}$, visto que os valores de eficiência das reações do gene endógeno e do gene alvo apresentaram valor próximo de 100%.

3.11.3 Quantificação do valor absoluto do número de cópias

de IS1533 e IS1500 em *Leptospira spp*

A partir da obtenção dos valores relativos do número de cópias foi realizada a estimativa dos valores absolutos das cepas bacterianas em estudo. Assim, inicialmente foram selecionados genomas fechados disponíveis no banco de dados (NCBI) e determinação da localização de regiões com identidade de 100% com os iniciadores (*primers*) desenhados para a amplificação em sorovariedades classificadas nas espécies *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*. Os resultados indicaram a ocorrência de uma cópia do iniciador IS1533 na sorovariedade Copenhageni e sete cópias de IS1500 na sorovariedade Lai. Para o cálculo da estimativa dos valores absolutos do número de cópias das sequências de inserção IS1533 e IS1500 foi aplicada a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.12 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE *L. INTERROGANS* SEROVAR HARDJO STR. NORMA

3.12.1 Pirosequenciamento do genoma da cepa Norma

O sequenciamento completo do genoma da cepa Norma foi realizado mediante associação de duas técnicas de sequenciamento, dentre elas a metodologia de *Shot-Gun* e *Paired End Tags*.

O pirosequenciamento de DNA baseia-se no sequenciamento por síntese enzimática, em que a incorporação do nucleotídeo complementar na nova cadeia de DNA que está sendo sintetizada resulta em um sinal luminoso detectável (bioluminescência). O equipamento 454

Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences/Roche), permite, atualmente, a obtenção de sequências (*reads*) de 400-500 nucleotídeos, sendo possível o sequenciamento de até 400-600 milhões de bases de alta qualidade por corrida com a utilização dos reagentes da série titânio (*GS FLX Titanium Series Reagents*) (Droege; Hill, 2008).

A metodologia de pirosequenciamento não requer a construção prévia de bibliotecas genômicas, seleção de clones e isolamento de plasmídeos (Margulies *et al.*, 2005; Ahmadian *et al.*, 2006). O DNA genômico total é rompido mecanicamente por nebulização em fragmentos de 500 a 800 pares de base, aos fragmentos são ligados pequenos adaptadores específicos nas extremidades 3' e 5'. As moléculas de DNA fita simples devidamente ligadas aos adaptadores são imobilizadas em microesferas, sendo que cada microesfera contém uma única fita de DNA. Esta biblioteca de ssDNA ligado a microesferas é então submetida à emulsificação com reagentes para amplificação por PCR em uma mistura de água e óleo; cada microesfera com uma única molécula de ssDNA ligada, inserida em uma microgota aquosa suspensa no óleo, constitui um microreator. Cada fragmento ligado a uma microesfera é então amplificado por PCR. A reação de amplificação de toda a biblioteca de fragmentos é realizada simultaneamente, sendo que os fragmentos amplificados permanecem ligados à mesma microesfera original em cada microrreator. Ao final da amplificação cada microesfera está recoberta com cerca de 10 milhões de cópias (clones) do mesmo fragmento de DNA.

Os *microrreatores* são posteriormente quebrados, separando-se o óleo. As microesferas são depositadas e imobilizadas em uma placa (*PicoTiterPlate*) contendo 1,6 milhões de poços; cada poço tem a dimensão exata para comportar uma única microesfera. A placa é em seguida acoplada ao sequenciador para as reações de pirosequenciamento. Após ~8-10 horas de corrida, são obtidos dados brutos das imagens dos sinais luminosos gerados a partir da *PicoTiterPlate* e detectados por uma câmera CCD (www.roche-applied-science.com). Após ~8-10 horas adicionais de análise computacional, as imagens são convertidas em sequências, cada uma derivada das imagens de um poço da placa.

3.12.2 Pirosequenciamento com a metodologia *Paired End Tags*

A metodologia *Paired End Tags* (PET) consiste na obtenção de sequências (*tags*) de ambas as extremidades (*paired ends*) de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, sendo assim as distâncias entre as duas extremidades dos fragmentos podem ser usadas para ordenar *contigs* na montagem da sequência genômica (Fullwood *et al.*, 2009). Além disso, regiões genômicas contendo repetições podem ser orientadas e posicionadas pelas suas conectividades a regiões de sequências específicas oferecidas pelas sequências obtidas pelo sequenciamento.

A construção de bibliotecas de *Paired End Tags* envolve a circularização direta de fragmentos de DNA gerados utilizando o nebulizador “*Hydroshear*” (Digilab) que pode gerar fragmentos de tamanhos específicos, como por exemplo,

20.000, 8.000 ou 3.000 pares de base. No caso da cepa J1a12 foram utilizados fragmentos na faixa de 3.000 pb. Às duas extremidades dos fragmentos de DNA são ligados oligonucleotídeos (*linker*) e a circularização dos fragmentos é então realizada com DNA ligase. Em seguida, procede-se fragmentação do DNA por nebulização e as etapas regulares do protocolo de pirosequenciamento na plataforma 454/Roche descrita adiante. As sequências (*reads*) contendo *tag-linker-tag* são identificadas computacionalmente na etapa de montagem dos *contigs*. O pirosequenciamento com a estratégia PET foi realizado na Unidade de Genômica Computacional Darcy Fontoura no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis, RJ.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão mostrados na seguinte ordem: primeiramente serão apresentados resultados referentes à identificação sorológica dos isolados de *Leptospira spp.* Em seguida, os dados obtidos com análise de região conservada do genoma, análise comparativa dos isolados e de cepas de referência do gênero *Leptospira spp* mediante análise de regiões antigênicas e sequências de inserção e por fim o sequenciamento completo do genoma da espécie *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjo.

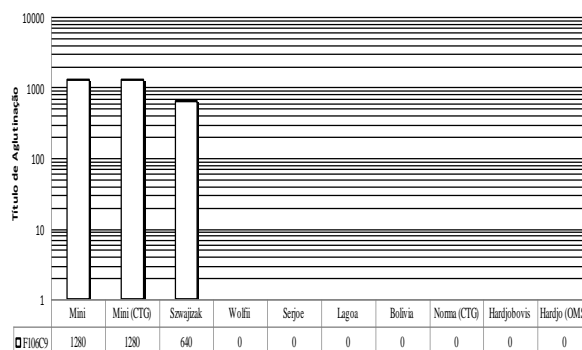
4.1 IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DOS ISOLADOS DE *LEPTOSPIRA SPP*

A identificação dos isolados Lagoa e Bolívia do gênero *Leptospira spp* em nível de sorogrupo foi realizada com a aplicação da prova sorológica de microaglutinação microscópica (MAT) em conjunto com os anticorpos monoclonais F106C9 e F1028C. Para a confirmação dos resultados foram utilizados como controle os valores de titulação positivos específicos para cada sorovariedade e estabelecidos pelo fabricante (Royal Tropical Institute- KIT) (Tabela 3). O anticorpo monoclonal F106C9, descrito para a sorovariedade Mini, mostrou resultados positivos para os isolados mini-swajizak e mini-CTG. A reação positiva de aglutinação foi observada na titulação de 1:1280, como indicado na tabela 3. Resultados negativos de aglutinação foram observados para as cepas controle classificadas na sorovariedade Hardjo, incluindo Hardjo (OMS) e genótipo hardjobovis (HB).

Com o anticorpo monoclonal F16C28 selecionado para a sorovariedade Hardjo foram observados resultados positivos de aglutinação para os isolados regionais Lagoa, Bolívia e Norma-CTG com valores de titulação positivos na escala de referência para o genótipo hardjoprajitno (80-640). Na comparação do título de aglutinação destes isolados com as cepas de referência Hardjo (OMS) foi identificado valor de titulação divergente entre as cepas bacterianas classificadas no genótipo hardjoprajitno. Para a cepa controle foi observado perfil positivo de aglutinação até a titulação de 1:400, já para os isolados Lagoa, Bolívia e a cepa Norma-CTG foram observados resultados positivos somente com títulos de aglutinação até 1:200, porém esta variação está de acordo com o descrito

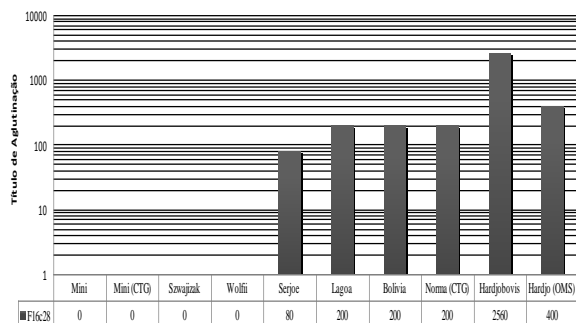
para a sorovariedade Hardjo genótipo Hardjoprajitno, sugerindo não haver relevância na classificação sorológica dos isolados. Para a cepa controle Sejroe a aglutinação foi identificada até a diluição de 1:80 e no genótipo Hardjobovis o resultado positivo foi confirmado com títulos de até 1:2560 (Figura 2). Os resultados obtidos com a análise de soroaglutinação dos isolados Lagoa e Bolívia estão indicados nas Figuras 2 e 3 apresentadas a seguir.

Figura 1 - Soroaglutinação (MAT) de isolados de *Leptospira spp* com anticorpo monoclonal F106C9



No gráfico acima estão indicados os títulos de soroaglutinação dos isolados regionais, incluindo Lagoa e Bolívia e de cepas controle (Sejroe, Mini-swajizak, Hardjo-OMS e Hardjobovis).

Figura 2 - Soroaglutinação (MAT) de isolados de *Leptospira spp* com anticorpo monoclonal F16C28



No gráfico acima estão indicados os títulos de soroaglutinação dos isolados regionais, incluindo Lagoa e Bolívia e de cepas controle (Sejroe, Mini-swajizak, Hardjo-OMS e Hardjobovis).

De acordo com os resultados obtidos na prova de soroaglutinação com os anticorpos monoclonais F106C9 e F16C28 foi possível classificar os isolados Lagoa e Bolívia no sorogrupo Sejroe.

4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *LEPTOSPIRA SPP*

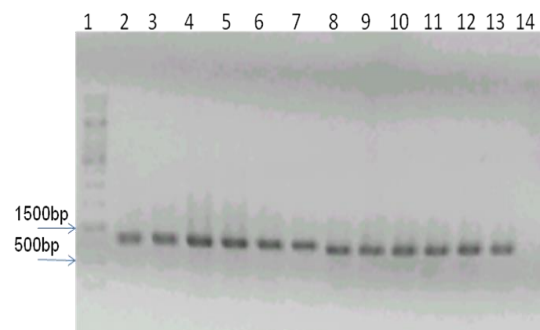
4.2.1 Identificação de espécie dos isolados de *Leptospira spp*

4.2.1.2 Amplificação e sequenciamento total do gene 16S rRNA ribossomal

A confirmação da espécie dos isolados Lagoa e Bolívia foi realizada com a amplificação total da região ribossomal 16S rRNA e sequenciamento do fragmento amplificado. Assim, a amplificação total da região 16S rRNA ribossomal foi realizada com a utilização de dois pares de iniciadores (*primers*) desenhados com base nas

sequências nucleotídicas da região 16S rRNA ribossomal das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* depositadas no banco de dados (NCBI). Um par de iniciadores (*primers*) foi construído para a amplificação da porção inicial da região 16S rRNA ribossomal e obtenção de um fragmento de 720 bp (Figura 3) e o segundo par de iniciadores foi construído para a amplificação da porção final do fragmento com um produto final de 638 bp. As canaletas 2 a 13 mostram a amplificação de uma única banda principal em todas as amostras.

Figura 3 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (*primers*) 16SF1/16SR1 e 16SF2/16SR2



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo: canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, sorovar Hardjo –genótipo Hardjobovis; can. 3, sorovariedade Lai; can. 4, cepa Bolívia; can. 5, cepa Hardjo-OMS; can. 6; cepa Norma-CTG; can. 7, cepa Lagoa; can. 8; genótipo hardjobovis; can. 9, sorovariedade Lai; can. 10, cepa Bolívia; can. 11, Hardjo-OMS, can. 12, cepa Norma-CTG; can. 13, cepa Lagoa; can. 14,c.

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose 1%

e corados com solução de brometo de etídeo, como mostrado na Figura 4. Os fragmentos com 720 bp e 638 bp foram purificados (seção 5) e os produtos foram reamplificados e sequenciados com os iniciadores *forward* e *reverse* utilizados na amplificação inicial dos fragmentos. Nesta etapa foram selecionados no mínimo 10 sequenciamentos de amostras de referência para análises e confirmação das sequências fornecidas pelo sequenciador automático. As

sequências *forward* e *reverse* obtidas foram alinhadas e então foi gerada a sequência indicada na Figura 6. Em seguida, as sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa e Bolívia foram submetidas a análises de homologia com sequências depositadas em banco de dados, utilizando o algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI (National Center of Biotechnology Information) e os resultados estão mostrados na Figura 5.

Figura 4 - Sequência nucleotídica do produto de amplificação correspondente ao fragmento da região 16S rRNA ribossomal dos isolados do genótipo *hardjoprajitno*

```

5'.ATGACTAACGCTGGCGGCGCTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCGAACC
GGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATC
GTCCCGAGAGATCAAAGATTTTTCGGGTAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCAGTCCGATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGG/
ACTGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCCTCAATGGGGGGAACCCTGA/
GCAGCGACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCAGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAG(
AATGTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTATGGTG
CAAGCGTTGTTCCGAATCATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAACCTGC
GGGC TCAACTCGCAGCCTGCAC TTGAACTATGTGCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGAATTCCAGG
TGTAAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGC TGGCCTAAAAC TG/
CGCTGA GGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCACGCCCTAACGTTTGT
TACCAGTTGTTGGGGGTTTTAACCTCAGTAACGAACCTAACGGATTAAGTAGACC GCCTGGGGACTATGC
TCGCAAGAGTGAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGTCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAT
GATACGCGAAAAACCTCACCTAGGCTTGACATGGAGTGAATCATGTAGAGATACATGAGCCTTCGGGCC
GCTTACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGC
GCAACCCTCACCTTATGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCGTAAGGAAC TGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGCGGGGATGACGTCAAATCCTCATGGCCTTTATGTCTAGGGCAACACAGTGTACAATGGCCGGTA
CAAAGGGTAGCCAACTCGCAGGGGGGAGCTAATCTCAAAAATCCGGTCCCAGTTCCGATTGGAGTCTGC
AACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC GGA
CCTTG TACACACCGCCC GTCACACCCTGAGTGGGGAGCACCCGAAGTGGTCTTTGCCAACCGCAAGC
AAGCAGACTACTAAGGTGAAACTCGTGAAGGGGGTG 3'

```

Foram utilizados os *primers* 16SF1/16SR1 *forward* ou *reverse* e 16SF2/16SR2 *forward* ou *reverse*. Em preto, códon de iniciação e em vermelho as sequências dos iniciadores utilizados.

Figura 5 - Análise de homologia das sequencias nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia com as sequencias nucleotídicas depositadas no banco de dados

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP001221.1	Leptospira interrogans serovar Lai str. IPAV chromosome 1, complete	2647	5294	100%	0.0	99%
AB010300.2	Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601 chromosome I, complet	2647	5294	100%	0.0	99%
FJ154553.1	Leptospira interrogans serovar Hardjo-prajitno strain Hardjoprajitno 1	2647	2647	100%	0.0	100%
EU581713.1	Leptospira interrogans strain CCZ45 serogroup Icterohaemorrhagiae	2647	2647	100%	0.0	99%
AB016823.1	Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130, chr	2647	5287	100%	0.0	99%
FJ154559.1	Leptospira kirschneri serovar Pomona strain 5621 16S ribosomal RNA	2641	2641	100%	0.0	99%
FJ154561.1	Leptospira interrogans serovar Canicola strain Hond Utrech IV 16S rli	2639	2639	99%	0.0	99%

A figura mostra a lista de sete alinhamentos correspondentes às sorovariedades classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. kirchneri*.

As análises realizadas com as sequências nucleotídicas dos isolados Bolívia e Lagoa, usando o algoritmo Blastn mostraram 100% de identidade com a sequência nucleotídica da espécie *L. interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo genótipo Hardjoprajitno.

sequências nucleotídicas foram identificadas entre as cepas Lagoa e Bolívia

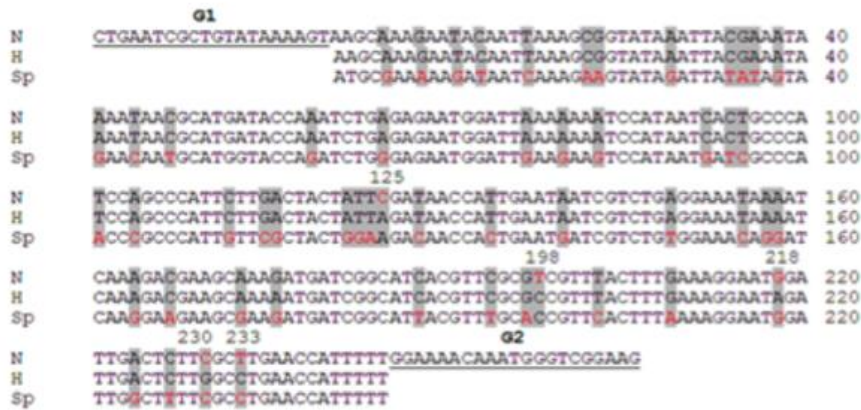
4.3 ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA DE *LEPTOSPIRA SPP*

4.3.1 Estudo comparativo da região *secy* (G1-G2) de isolados da sorovariedade Hardjo

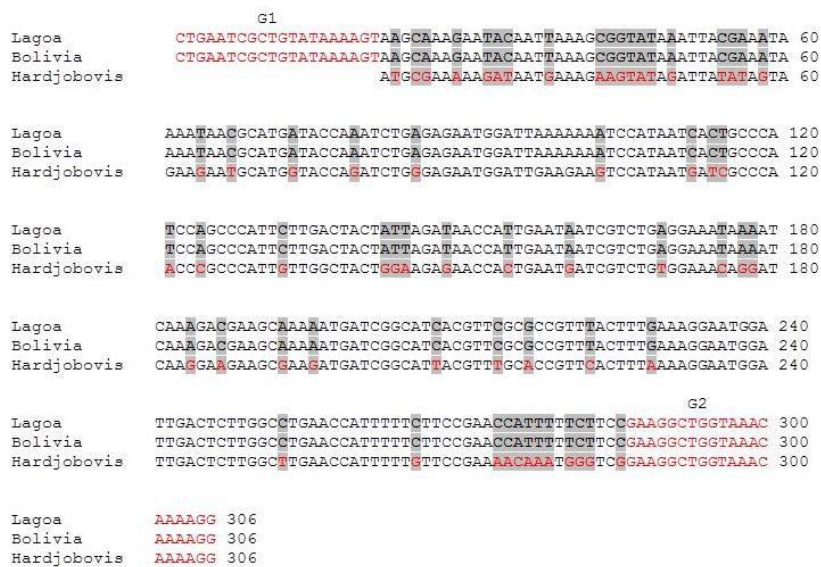
O estudo da região *secy* em isolados do gênero *Leptospira* é indicado para a caracterização e classificação de cepas bacterianas classificadas no gênero *Leptospira spp.* Nesta etapa do estudo foram realizadas reações de amplificação em cadeia de polimerase com obtenção do fragmento de 285 bp da cepa de referência Hardjo (OMS), classificada no genótipo hardjoprajitno, cepa Sponselee (HB), classificada na sorovariedade Hardjo genótipo Hardjobovis e a cepa isolada Norma. O alinhamento de nucleotídeos com aplicação da ferramenta CLUSTAL W (Thompson et al., 1987). Foram identificados polimorfismos entre as sequências nucleotídicas das cepas classificadas na espécie *L. interrogans* sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno e na espécie *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo genótipo hardjobovis. Polimorfismos pontuais foram identificados entre as cepas Noma-CTG e Hardjo-OMS, ao contrário um perfil homogêneo de

Figura 6 - Alinhamentos de seqüências nucleotídicas (285 bp) referentes à região *secy* (G1-G2) de isolados classificados no gênero *Leptospira*

A



B



A figura A mostra o alinhamento dos isolados N (Norma-CTG), H (Hardjo - OMS) e Sp (hardjobovis). Em cinza estão grifadas as regiões nucleotídicas polimórficas encontradas entre os isolados e em vermelho estão grifados os nucleotídeos polimórficos encontrados nas cepas classificadas no genótipo hardjoprajitno e hardjobovis. A figura B mostra o alinhamento da região *secy* (G1-G2) entre os isolados Lagoa, Bolívia, classificadas no

genótipo hardjoprajitno e cepa *Sponselee*, classificada no genótipo hardjobovis. Em cinza estão grifadas as regiões nucleotídicas polimórficas encontradas entre os isolados e em vermelho estão grifados os nucleotídeos polimórficos encontrados nas cepas classificadas nos genótipos hardjoprajitno e hardjobovis. Nas extremidades das seqüências estão grifados os iniciadores usados no trabalho.

4.3.2 Regiões antigênicas

4.3.2.1 Amplificação e sequenciamento parcial do gene *Loa22*

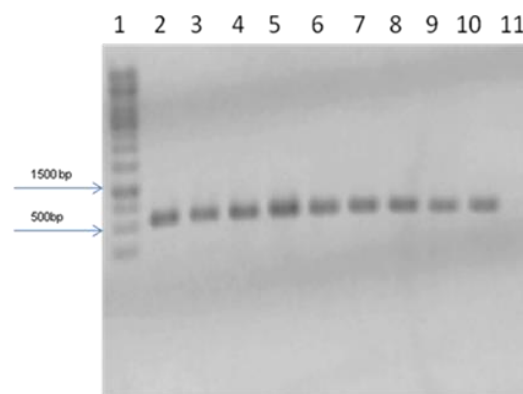
A análise comparativa dos isolados do gênero *Leptospira spp* foi realizada inicialmente com a escolha de regiões descritas com elevado potencial de associação com mecanismo de virulência na interação patógeno- hospedeiro. O objetivo deste trabalho nesta etapa foi avaliar se genes associados com a codificação de proteínas antigênicas poderiam ser sugeridos para a caracterização de isolados do gênero. Desta forma, o primeiro gene avaliado foi *Loa22*.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) do gene *Loa22* foi executada com um par de iniciadores desenhados com base nas sequências nucleotídicas do gene *Loa22* das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* do gênero *Leptospira*. A amplificação parcial do gene gerou um fragmento com aproximadamente 560 bp para todas as cepas bacterianas analisadas. Os produtos de amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, como mostrado na Figura 8.

No gel da Figura 8 as canaletas de 2 a 10 mostram o produto de amplificação de diferentes sorovariedades, classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Pode-se observar a amplificação de uma única banda principal em todas as amostras. Os amplicons obtidos foram analisados em gel de agarose 1%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizados em transluminador com luz UV. Os amplicons específicos obtidos foram

purificados (conforme descrito na seção 4.4) e reamplificados com os iniciadores *forward* e *reverse* utilizados na amplificação inicial para o sequenciamento. No total foram analisados aproximadamente oito sequenciamentos de cepas de referência das sorovariedades Lai e Copenhageni para a confirmação da autenticidade das sequências resultantes do sequenciamento. No estudo das sequências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia foi identificado um valor de identidade de 99% com a sorovariedade Copenhageni, Lai IPAV e Lai 56601 e 98% de identidade com a sorovariedade manilae, classificada na espécie *L. interrogans* (Figura 9).

Figura 7 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (*primers*) *Loa 22F/Loa 22R* analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo



Canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, sorovar Hardjo – genótipo Hardjobovis; can. 3, Tarassovi; can. 4, cepa Sejroe; can. 5, cepa Bolívia; can. 6; cepa Hardjo-OMS; can. 7, cepa Norma - CTG; can. 8; sorovariedade Copenhageni; can. 9, cepa Lagoa; can. 10, sorovariedade Lai; can. 11,c-.

Figura 8 - Análise entre as seqüências de nucleotídeos obtidas das cepas Lagoa e Bolívia e seqüências depositadas em banco de dados

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AE016923.1	Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130, chr	870	870	82%	0.0	99%
CP001221.1	Leptospira interrogans serovar Lai str. IPAV chromosome 1, complete	865	865	82%	0.0	99%
AE010300.2	Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601 chromosome 1, complete	865	865	82%	0.0	99%
AB096686.1	Leptospira interrogans serovar manilae gene for OmpA family outer m	837	837	82%	0.0	98%

A figura mostra a lista de quatro alinhamentos correspondentes à sorovariedades, classificadas na espécie *L. interrogans*.

Figura 9 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos referentes ao gene *Loa22* de isolados de *Leptospira* spp

```

Lagoa      TTATTGTTGTGGTGC GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACTCTTCTATTTTTAGCATCTTT 60
OMS        TTATTGTTGTGGTGC GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACTCTTCTATTTTTAGCATCTTT 60
CTG        TTATTGTTGTGGTGC GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACTCTTCTATTTTTAGCATCTTT 60
Lai        TTATTGTTGTGGTGC GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACTCTTCTATTTTTAGCATCTTT 60
Copenhageni TTATTGTTGTGGTGC GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACTCTTCTATTTTTAGCATCTTT 60
Bolivia    TTATTGTTGTGGTGC GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACTCTTCTATTTTTAGCATCTTT 60
HB         TTATTGTTGTGGAGCG GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACCCCTCTGTTTTAGCGTCTTT 60
Sejro     TTATTGTTGTGGAGCG GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACCCCTCTGTTTTAGCGTCTTT 60
Tarassovi  TTATTGTTGTGGAGCG GGAAGTCGCAAAACGGAAAGTGACCCCTCTGTTTTAGCGTCTTT 60
          * * *

Lagoa      CGCATCAAGACCAGA AACTGGCTCGGAAGAACC GGCCACCTTTAGTAACGATACGATTTCG 120
OMS        CGCATCAAGACCAGA AACTGGCTCGGAAGAACC GGCCACCTTTAGTAACGATACGATTTCG 120
CTG        CGCATCAAGACCAGA AACTGGCTCGGAAGAACC GGCCACCTTTAGTAACGATACGATTTCG 120
Lai        CGCATCAAGACCAGA AACTGGCTCGGAAGAACC GGCCACCTTTAGTAACGATACGATTTCG 120
Copenhageni CGCATCAAGACCAGA AACTGGCTCGGAAGAACC GGCCACCTTTAGTAACGATACGATTTCG 120
Bolivia    CGCATCAAGACCAGA AACTGGCTCGGAAGAACC GGCCACCTTTAGTAACGATACGATTTCG 120
HB         GGCATCGAGTCCGGA AACAGGTTCTGAGGAGCCGGCCCTTTTCGCAATAATACGATTTCG 120
Sejro     GGCATCGAGTCCGGA AACAGGTTCTGAGGAGCCGGCCCTTTTCGCAATAATACGATTTCG 120
Tarassovi  GGCATCGAGTCCGGA AACAGGTTCTGAGGAGCCGGCCCTTTTCGCAATAATACGATTTCG 120
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Lagoa      TGGTAATCCCTTGT TTTGATTAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
OMS        TGGTAATCCCTTGT TTTGATTAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
CTG        TGGTAATCCCTTGT TTTGATTAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
Lai        TGGTAATCCCTTGT TTTGATTAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
Copenhageni TGGTAATCCCTTGT TTTGATTAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
Bolivia    TGGTAATCCCTTGT TTTGATTAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
HB         GGGTGATTCCCTTGT TTTGATCAAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
Sejro     GGGTGATTCCCTTGT TTTGATCAAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
Tarassovi  GGGTGATTCCCTTGT TTTGATCAAAAGCTTGTTAACTGCATTTCACGAAAGCTCAGAGTAAA 180
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Lagoa      AAATATTTCCCTTT TTTTAGCACCTTCTGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
OMS        AAATATTTCCCTTT TTTTAGCACCTTCTGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
CTG        AAATATTTCCCTTT TTTTAGCACCTTCTGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
Lai        AAATATTTCCCTTT TTTTAGCACCTTCTGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
Copenhageni AAATATTTCCCTTT TTTTAGCACCTTCTGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
Bolivia    AAATATTTCCCTTT TTTTAGCACCTTCTGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
HB         AAATATTTCCCTTT TTTTAGCTCCTTCAGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
Sejro     AAATATTTCCCTTT TTTTAGCTCCTTCAGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
Tarassovi  AAATATTTCCCTTT TTTTAGCTCCTTCAGCTTGTTCGGGACCGATCGCATCCGGTGTGTCCTG 240
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Lagoa      TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
OMS        TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
CTG        TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
Lai        TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
Copenhageni TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
Bolivia    TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
HB         TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
Sejro     TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
Tarassovi  TAATTTCAAGAGCGT AACTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGT 300
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Lagoa      TTGTTTTAGACCAC TCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATC 360
OMS        TTGTTTTAGACCAC TCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATC 360
CTG        TTGTTTTAGACCAC TCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATC 360
Lai        TTGTTTTAGACCAC TCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATC 360
Copenhageni TTGTTTTAGACCAC TCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATC 360
Bolivia    TTGTTTTAGACCAC TCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATC 360
HB         TTACCTTAGACCAT CCACTGAAATCACCAGGATTGACATCCGCTTTTTTGTAGCTGAATC 360
Sejro     TTACCTTAGACCAT CCACTGAAATCACCAGGATTGACATCCGCTTTTTTGTAGCTGAATC 360
Tarassovi  TTACCTTAGACCAT CCACTGAAATCACCAGGATTGACATCCGCTTTTTTGTAGCTGAATC 360
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Lagoa      CAGGACGAGTTAAAC CCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
OMS        CAGGACGAGTTAAAC CCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
CTG        CAGGACGAGTTAAAC CCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
Lai        CAGGACGAGTTAAAC CCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
Copenhageni CAGGACGAGTTAAAC CCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
Bolivia    CAGGACGAGTTAAAC CCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
HB         CTGGGCGAGTTATTC CATCGGGATATCTAAAGTCTTTCAATTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
Sejro     CTGGGCGAGTTATTC CATCGGGATATCTAAAGTCTTTCAATTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
Tarassovi  CTGGGCGAGTTATTC CATCGGGATATCTAAAGTCTTTCAATTTTTTCGTTTAAAGAATCTG 420
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Lagoa	CGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCG	480
OMS	CGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCG	480
CTG	CGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCG	480
Lai	CGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCG	480
Copenhageni	CGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCG	480
Bolivia	CGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCG	480
HB	CAATCGCTTCCGGAGAGTTAACGTGACACTTCTATTGTCAGCAGCGGATTGCTCTTGGG	480
Sejroe	CAATCGCTTCCGGAGAGTTAACGTGACACTTCTATTGTCAGCAGCGGATTGCTCTTGGG	480
Tarassovi	CAATCGCTTCCGGAGAGTTAACGTGACACTTCTATTGTCAGCAGCGGATTGCTCTTGGG	480
	* * * * *	
Lagoa	TTGAAGGCTCAGGAGCTGCGGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAGAGAGTGAATG	540
OMS	TTGAAGGCTCAGGAGCTGCGGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAGAGAGTGAATG	540
CTG	TTGAAGGCTCAGGAGCTGCGGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAGAGAGTGAATG	540
Lai	TTGAAGGCTCAGGAGCTGCGGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAGAGAGTGAATG	540
Copenhageni	TTGAAGGCTCAGGAGCTGCGGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAGAGAGTGAATG	540
Bolivia	TTGAAGGCTCAGGAGCTGCGGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAGAGAGTGAATG	540
HB	CTGACGGCTCAGGAGCTGCAGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAAAGAGTGAATG	540
Sejroe	CTGACGGCTCAGGAGCTGCAGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAAAGAGTGAATG	540
Tarassovi	CTGACGGCTCAGGAGCTGCAGATTCCTCTTTTTTTTCAGCAGAGGAGCAAAGAGTGAATG	540
	* *	
Lagoa	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
OMS	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
CTG	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
Lai	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
Copenhageni	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
Bolivia	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
HB	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
Sejroe	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560
Tarassovi	AAAATGCAATTGCACCGAGC	560

A figura mostra as sequências das cepas Lagoa, Bolívia, Norma-CTG, sorovariedades Lai e Copenhageni, classificadas na espécie *L. interrogans* e cepas Sejroe, Tarassovi e genótipo hardjobovis, classificadas na espécie *L. borgpetersenii*.

A seguir foi analisado o alinhamento da região com as duas principais espécies patogênicas do gênero *Leptospira spp.* O alinhamento demonstrado acima foi executado no *Clustal W*, disponível no programa *Expasy tools* e é referente às sequências de nucleotídeos de sorovariedades classificadas nas espécies *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii*. Na análise foi verificada a presença de polimorfismos entre as sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, confirmando a conservação de característica

do grau de espécie no gênero *Leptospira spp* da região descrita como Loa22.

4.3.2.2 Análise “*in silico*” das sequências nucleotídicas do gene *Loa22* em *Leptospira spp*

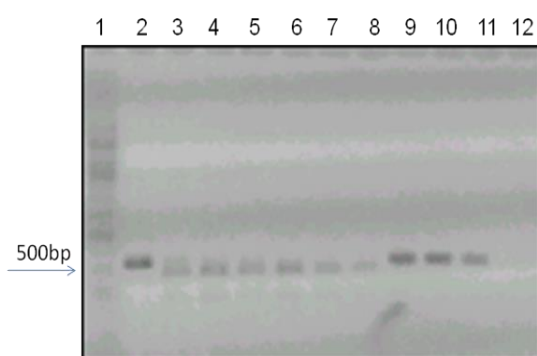
Na análise do banco de dados as sequências nucleotídicas referentes ao gene *Loa22* das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* foram identificadas, e em seguida, foram submetidas à análise no programa *Nebcutter* para a identificação de sítios de restrição. Na análise comparativa dos resultados foi identificado um sítio de restrição para a enzima *HINDIII* (5'-CTTGTT-3') presente em sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans* na posição 141 da sequência nucleotídica e não

foi observado este sítio em isolados classificados na espécie *L. borgpetersenii*.

4.3.2.3 Análise de restrição do gene *Loa22* com *HINDIII* em *Leptospira spp*

A etapa seguinte foi a realização da digestão dos amplicons obtidos com os iniciadores referentes ao gene *Loa 22*. Assim, os amplicons positivos foram incubados com a enzima de restrição *HINDIII*, conforme descrito na seção 5. Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose 1%, corados em solução de brometo de etídeo e visualizados em transluminador com luz UV. Nos resultados obtidos foram observadas diferenças de tamanho entre as bandas de sorovariedades classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* com confirmação da presença de sítio de restrição em isolados pertencentes à espécie *L. interrogans*, incluindo os isolados Lagoa e Bolívia (Figura 11).

Figura 10 - Eletroforese do produto de digestão com *HindIII* do fragmento de 560 bp (*Loa22*) de *Leptospira spp*



Canaleta 1: Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, sorovariedade Lai

(controle sem enzima); can. 3, sorovariedade Lai; can. 4, sorovariedade Copenhageni; can. 5, cepa Bolívia; can. 6, Hardjo OMS; can. 7, Norma CTG; can. 8, cepalagoa; can. 9., hardjobovis; can. 10, sejroe; can. 11, Tarassovi; can. 12, c-.

Os resultados obtidos com a análise do gene *Loa22* demonstraram que a amplificação (PCR) associada à técnica de RFLP possibilita a diferenciação de espécies patogênicas (*Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii*) do gênero *Leptospira spp*. As análises dos isolados Lagoa e Bolívia confirmaram que estas cepas bacterianas pertencem à espécie *L. interrogans*, confirmando os resultados obtidos no sequenciamento parcial.

4.3.2.4 Análises “*in silico*” de sequências do gene *LigB* em *Leptospira spp*

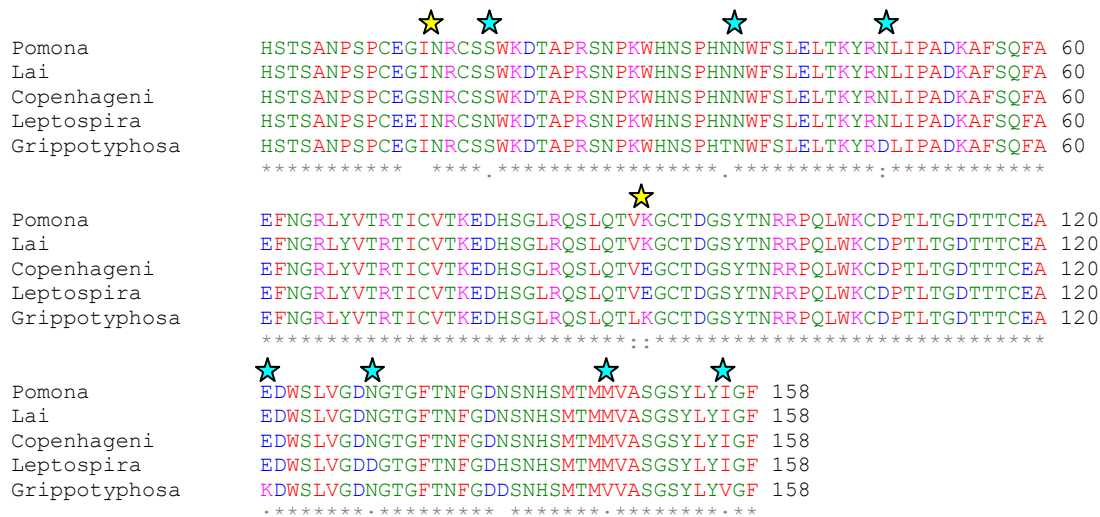
Com o objetivo de comparar diferentes sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans*, na qual está classificado o genótipo Hardjoprajitno, escolhemos a região codificadora de proteína associada a mecanismos de adesão na interação bactéria-hospedeiro.

Inicialmente, o estudo do gene *LigB* foi realizado mediante análise das sequências nucleotídicas (5670 bp) e traduzidas (1889 aa) das sorovariedades Lai, Copenhageni, Pomona e Griptothyphosa, classificadas na espécie *L. interrogans*. O alinhamento no programa *Clustal W* da sequência traduzida total indicou que a região com maior polimorfismo na sequência corresponde à porção C-terminal da proteína com início na posição 1817 da sequência até a posição 1860 (Figura 11).

Em seguida, esta porção C-terminal da sequência do gene *LigB* foi submetida à análise de homologia com sequências

depositadas em banco de dados, utilizando o algoritmo “*protein blast*”. Os resultados estão demonstrados na Figura 12.

Figura 11 - Alinhamento das sequências traduzidas “in silico” do gene *LigB* de *Leptospira spp*



Os símbolos marcam os resíduos polimórficos presentes entre as sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans* e os asteriscos indicam os resíduos altamente conservados entre os isolados.

Figura 12 - Análise de homologia entre a sequência de nucleotídeos referente à porção C-terminal do gene *LigB* e sequências depositadas em banco de dados

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AAPT4326.1	immunoglobulin-like B protein [Leptospira interrogans serovar pomona]	332	332	100%	2e-109	100%
NP_713938.1	LigB-like protein [Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601] >gb	332	332	100%	2e-109	100%
YP_000468.1	hypothetical protein LIC10464 [Leptospira interrogans serovar Coper]	342	342	100%	1e-107	99%
ACH8293.1	LigB [Leptospira interrogans]	340	340	100%	2e-105	97%
AAPE4726.1	LigB [Leptospira kirschneri serovar grippotyphosa]	339	339	100%	6e-105	96%
ACH8298.1	LigB [Leptospira interrogans serovar Kennewicki]	337	337	100%	2e-104	96%
ACH8308.1	LigB [Leptospira interrogans serovar Pomona]	337	337	100%	2e-104	96%
ZP_09233023.1	LigB lipoprotein [Leptospira santarosai str. 2006030832]	295	296	100%	1e-89	82%
ACH8169.1	LigB [Leptospira noguchii]	292	292	100%	2e-88	81%
ZP_09263107.1	LigB-like protein [Leptospira noguchii str. 2006001870]	292	292	100%	2e-88	81%
ZP_09266996.1	LigB lipoprotein [Leptospira welli str. 2006001855]	289	289	100%	2e-87	80%
ACH8101.1	LigB [Leptospira welli]	289	289	100%	2e-87	80%
YP_800047.1	LigB lipoprotein [Leptospira borqpeterseni serovar Hardjo-bovis JB19]	289	289	100%	2e-87	80%
YP_798783.1	LigB lipoprotein [Leptospira borqpeterseni serovar Hardjo-bovis LS50]	289	289	100%	3e-87	80%
ZP_09264828.1	LigB-like protein [Leptospira welli str. 2006001855]	223	223	100%	2e-64	60%
ZP_09287222.1	LigB-like protein [Leptospira licerasiae serovar Varillal str. MMD0835]	223	223	100%	4e-64	62%

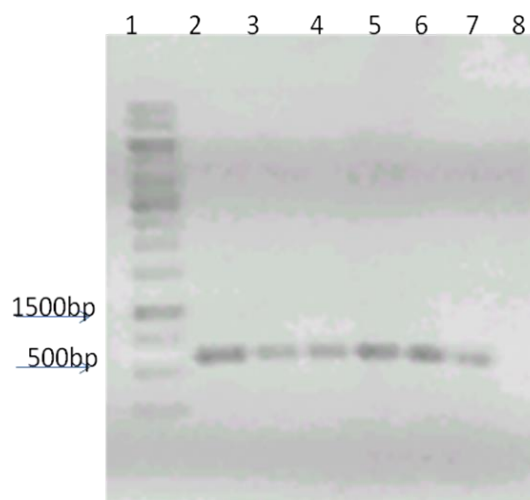
A figura mostra a lista de 16 alinhamentos correspondentes à sorovariedades, classificadas nas espécies *L. interrogans*, *L. Kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii* e *L. santarosai*.

A partir deste estudo e análise da sequência nucleotídica correspondente fez-se a construção dos iniciadores (*LigB1* e *LigB2*) com base nas sequências analisadas para a amplificação e sequenciamento parcial do gene *LigB* nas sorovariedades classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, incluindo os isolados regionais Lagoa, Bolívia e Norma.

4.3.2.5 Amplificação e sequenciamento parcial do gene *LigB*

Com o objetivo de obter a sequência nucleotídica da espécie *L. Interrogans*, sorovariedade Hardjo (subtipo hardjoprajitno) indisponível no banco de dados (GenBank) e realizar a comparação deste subtipo com outras sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans*, foi realizada amplificação parcial do gene *LigB* e sequenciamento nucleotídico da região. Na amplificação de fragmentos específicos referentes ao gene *LigB* foram utilizados os iniciadores *LigB1* e *LigB2* que deram origem a um amplicon específico de aproximadamente 560 bp em todas as cepas bacterianas analisadas. Os produtos obtidos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com solução de brometo de etídeo, como mostrado na Figura 14.

Figura 13 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (primers) *LigBF*/*LigBR*



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo: canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, sorovariedade Lai; can. 3, sorovariedade Copenhageni; can. 4, Hardjo (OMS); can. 5, Norma-CTG; can. 6; cepa Bolívia; can. 7, cepa Lagoa; can. 8; c-.

No gel demonstrado acima a partir da canaleta 2 à canaleta 7 é possível observar um produto específico amplificado correspondente a um fragmento de aproximadamente 560 bp. Os amplicons positivos obtidos foram purificados e reamplificados para o sequenciamento parcial do gene *LigB*. No sequenciamento das cepas positivas foram utilizadas sequências *forward* e *reverse* na amplificação inicial. Foram selecionadas as sequências referentes às cepas controle da reação com o objetivo de confirmar a identificação das cepas bacterianas utilizadas no estudo. As sequências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia foram analisadas no programa NCBI com aplicação do

algoritmo “*nucleotide blast*” para a identificação dos isolados bacterianos

Figura 14 - Análise de homologia entre as sequências de nucleotídeos obtidas das cepas Lagoa e Bolívia e sequências depositadas em banco de dados

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP011331.1	Leptospira interrogans serovar Lai str. IPAV chromosome 1, complete	874	874	100%	0.0	99%
AF134962.2	Leptospira interrogans serovar Lai str. 56901 chromosome 1, complete	873	874	100%	0.0	99%
AF134961.2	Leptospira interrogans serovar pomona immunoglobulin-like B protein	873	874	100%	0.0	99%
AF134963.2	Leptospira interrogans serovar Copenhagen str. Focruz LI-130, chr1	861	841	100%	0.0	99%
EU200471.1	Leptospira interrogans serovar Kennewicki strain PO-06-047 LigB (ligB)	813	813	100%	0.0	97%
EU200469.1	Leptospira interrogans strain Kito LigB (ligB) gene, complete cds	813	813	100%	0.0	97%
EU200468.1	Leptospira interrogans serovar Pomona isolate pPLIGB LigB (ligB) gene	813	813	100%	0.0	97%
AF134972.2	Leptospira kirschneri serovar grippothyphosa strain 8952 LigA (ligA) a	789	789	100%	0.0	96%
CP000245.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-Bovis LS50 chromosome 1	331	331	94%	3e-87	80%
CP000244.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-Bovis JB197 chromosome 1	326	326	94%	1e-85	80%

A figura mostra a lista de 10 alinhamentos correspondentes à sorovariedades, classificadas nas espécies *L. interrogans*, *L. Kirschneri*, *L.borgpetersenii*, *L.noguchii* e *L.santarosai*.

Na análise de identidade dos isolados foram obtidos resultados de 99% de identidade com as sorovariedades Lai, Pomona e Copenhageni, em seguida foi observado o valor de 97% de identidade com

a sorovariedade *Kennewicki* cepa Kito e isolado Pomona cepa PI, 96% de identidade com a sorovariedade *grippothyphosa* e 80% de identidade com a sorovariedade Hardjo genótipo Hardjobovis, como demonstrado na Figura 15. A partir dos resultados obtidos as sequências nucleotídicas dos isolados foram alinhadas no programa *Clustal W* e os resultados estão demonstrados na Figura 16

Figura 15 - Alinhamento das sequências nucleotídicas de 510 bp do fragmento referente ao gene *LigB* em *Leptospira* spp

Hardjoprajitno	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
Hardjo (OMS)	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
Bolivia	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
lagoa	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
Pomona	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
Lai	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
Cop	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	GGATCAATC	60
Kennewicki	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	AAATCAATC	60
Kito	ATAATGGAAGTATAATACTACTCTACCAGT	CAAATCCTAGTCCTTGTGAGG	AAATCAATC	60
	30	52		
Hprajitno	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Hardjo	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Bolivia	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
lagoa	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Pomona	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Lai	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Cop	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Kennewicki	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
Kito	GTTGGTTCCA	TTGAAAGACACAGCACCTAGATCCAATCC	AAAGTGGCATAA	120
	71	102		
Hprajitno	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Hardjo	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Bolivia	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
LAGOA	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Pomona	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Lai	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Cop	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Kennewicki	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Kito	CATAACAATTGGTTTTTCACTGGAGCTTACAAGTATCGGAATTTAATTCGGCGGATAAA			180
Hprajitno	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Hardjo	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Bolivia	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
LAGOA	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Pomona	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Lai	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Cop	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Kennewicki	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Kito	GCATTCTCTCAATTCGCAGAATTTAACGGAAGATTGTATGTAACAAGAACGATCTGCGTA			240
Hprajitno	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Hardjo	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Bolivia	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
LAGOA	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Pomona	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Lai	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Cop	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Kennewicki	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
Kito	ACGAAAGAAGATCACTCCGGACTCAGACAAAGTTTACAAACTGTG	AAAGTTGTACGGAC		300
		286		
Hprajitno	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Hardjo	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Bolivia	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
LAGOA	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Pomona	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Lai	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Cop	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Kennewicki	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Kito	GGAAGTTATACAAATCGAAGACCCCAACTTTGGAAATGTGATCCGACTCTAACCGGCGAT			360
Hprajitno	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Hardjo	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Bolivia	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
lagoa	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Pomona	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Lai	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Cop	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Kennewicki	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
Kito	ACAACAACCTG	GAAGCAGAAGATTGGTCTTTAGTAGGATATAAC	CGGAACCGGATTTACA	420
	372	400 405	414	

Hprajitno	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Hardjo	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Bolivia	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
LAGOA	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Pomona	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Lai	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Cop	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Kennewicki	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
Kito	AACTTTGGAGACAATTCCAATCACAGTATGACGATGATGGTTGCAAGTGGATCTTATCTC	480
	433	
Hprajitno	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Hardjo	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Bolivia	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Lagoa	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Pomona	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Lai	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Cop	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Kennewicki	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510
Kito	TACATAGGTTTTGATAACGAAAACGGAATTC	510

Em amarelo, as regiões polimórficas encontradas entre as sorovariedades Lai, Copenhageni, Hardjo e Pomona, classificadas na espécie *L. interrogans*.

Foram identificados polimorfismos entre as sorovariedades e espécies do gênero *Leptospira spp.* Diferenças entre os isolados da sorovariedade Hardjo, Copenhageni, Lai e Pomona foram identificadas nas posições 30 e 400 da sequência do gene *LigB*. As posições 102, 286, 372 da sequência nucleotídica da sorovariedade Lai apresentam-se idênticas às sequências dos isolados classificados na sorovariedade Hardjo e diferencial à sorovariedade Copenhageni. As sorovariedades kito e kennewicki apresentam elevada homologia nesta posição do gene *LigB* e polimórficas em relação às sorovariedades Hardjo, Lai e Copenhageni.

Os resultados mostram que a porção C-terminal da proteína codificada pelo gene *LigB* apresenta capacidade discriminatória para a identificação de sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans*. As sorovariedades Lai, Copenhageni e Pomona apresentaram

sequências com identidade própria das sorovariedades. As cepas classificadas na sorovariedade Hardjo apresentaram perfil homogêneo das sequências nucleotídicas e diferencial quando comparadas às demais sorovariedades.

4.4 LÓCUS *rfb*

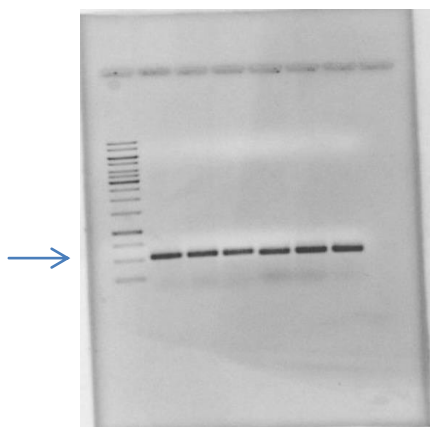
O locus *rfb* da *L. Interrogans*, sorovariedade Hardjo (subtipo hardjoprajitno) apresenta composição única no gênero *Leptospira spp.* Desta forma, foram selecionados quatro genes codificantes do locus *rfb* e investigados nas cepas regionais Lagoa, Bolívia e Norma e comparados com com cepas de referência classificadas no gênero *Leptospira spp.*

4.4.1 Amplificação e sequenciamento parcial do gene WZY (ORF14) em *Leptospira spp*

No gênero *Leptospira* a região envolvida com a codificação do antígeno-O é descrita como WZY- Orf14. Com o objetivo de comparar o perfil de amplificação, e em seguida, as sequências nucleotídicas da região foi construído um

par de iniciadores referentes ao gene WZY (Orf14) com o objetivo de identificar e comparar perfis de amplificação e sequências de nucleotídeos da região reconhecida como antígeno-O polimerase de cepas de referência e isolados do gênero *Leptospira* spp. Os iniciadores foram construídos a partir de sequências de referência disponíveis no banco de dados do NCBI. Inicialmente foi realizado o alinhamento das sequências no programa *Clustal W*, disponível no ExPasy tool e então selecionada a sequência para a construção dos iniciadores (*primers*).

Figura 16 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (*primers*) ORF14F/ORF14R



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo: canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, sorovar Hardjo –genótipo Hardjobovis; can. 3, sorovariedade Hardjo(OMS); can. 4, cepa Bolívia; can. 5, cepa Mini-CTG; can. 6; cepa Norma-CTG; can. 7, cepa Lagoa; can. 8; controle negativo (C-).

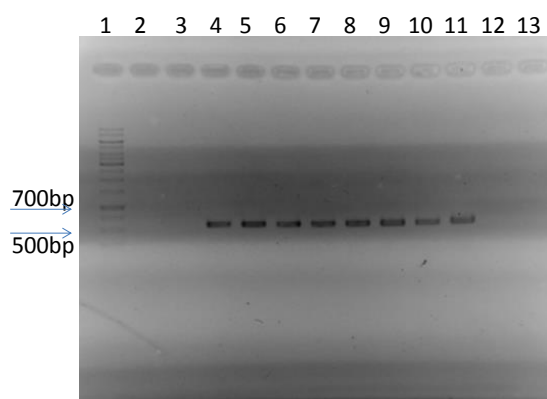
O gel demonstrado na figura 17 mostra que todas as cepas analisadas foram positivas, uma vez que houve a amplificação de uma banda de aproximadamente 500 bp em todas as amostras. Os amplicons obtidos foram purificados e então sequenciados com os iniciadores (*primers*) específicos *forward* ou *reverse* utilizados na reação inicial (Orf14F ou Orf14R). As sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa e Bolívia foram submetidas à análise de homologia com sequências depositadas em banco de dados utilizando o algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI (National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.4.2 Amplificação e sequenciamento parcial da região Orf22

Estudos prévios descreveram que as ORFS 21 e 22 de *L. interrogans* sorovariedade Hardjo *subtype* hardjoprajitno foram adquiridas de *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo genótipo Hardjobovis. Para avaliar se esse perfil de homologia poderia ser confirmado nos isolados de Minas Gerais, selecionamos a ORF 22 para avaliação das cepas e comparação com cepas de referência classificadas no mesmo sorogrupo e assim determinar o nível de identidade da região descrita como fundamental na característica fenotípica na sorovariedade Hardjo. Para a análise comparativa de diferentes sorovariedades classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* foi construído um par de *primer* com base nas sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados (NCBI) das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. A reação em cadeia de

polimerase (PCR) foi realizada com os iniciadores ORF22 (F) e ORF22 (R) com amplificação parcial do gene com um fragmento de aproximadamente 500 bp. Em seguida o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

Figura 17 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico com os iniciadores Orf22F/Orf22R.



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Canaleta 1. Padrão de peso molecular 1 Kb; can. 2, sorovariedade Lai; can. 3, sorovariedade Copenhageni; can. 4, sejroe; can. 5, Bolívia; can. 6, Hardjo OMS; can. 7, norma CTG; can. 8, hardjobovis; can. 9, lagoa; can. 10, mini; can.11, hebdomadis; can. 12, canicola; can. 13, controle negativo (c-).

O resultado do gel acima demonstra a presença de amplicons nas canaletas de 4 a 11. Nas canaletas 2 (sorovariedade Lai), 3 (sorovariedade Copenhageni), 12 (sorovariedade Canicola) e 13 (controle negativo) não há confirmação da presença de amplicons. Os amplicons com tamanhos esperados foram purificados e reamplificados com os *primers* ORF22-F ou ORF22-R para o sequenciamento. Foram analisadas no mínimo 10 seqüências de nucleotídeos referentes às cepas de referência Sejroe genótipo Hardjobovis e Hardjoprajitno (OMS) utilizadas como controle de reação da PCR e do sequenciamento. Para os isolados Lagoa e Bolívia foi construída uma seqüência consenso a partir das análises das seqüências *forward* e *reverse* obtidas no sequenciamento (Figura 18).

As seqüências nucleotídicas obtidas para os isolados Lagoa e Bolívia foram submetidas à análise de homologia com seqüências depositadas em banco de dados, utilizando o algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI (National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados são mostrados na Figura 19

Figura 19 - Seqüência nucleotídica do produto de amplificação a região Orf22 dos isolados Lagoa e Bolívia

```

5'ATGAATCCTTTAGTTTCTATCGTAATCCATGTTATAATTATGGCCGATATATTCACGAAACCGTTGA
GAGTATATTGAGACAGAGATATAAAAATTGGGAAGTAATAATCGTAGATGATGGATCTAACGATCCAT
TTACAATTTCAATTATAGAGGAGTACAAAAATAAATCTGGTTTTACGGTTTTATCTATTACTCGTTCTG
GACCTTCGACGGCGGTAATATTGGGATTGATACGGCTCAAGGAGAGTTTATACTTCTTTGGATTG
GGACGATAGGATTCACGAGGATTATCTTTTGGAGGCGATATCCGCTTACAAAAAGAATCCGCTTTTA
AGGATTGTATATTGTGAAGCGGAGTTTTTCGGATCTATAAAAGGGAAATGGAATCTTCCTGAATATC
GTTTTCCGAATATACTTTTAGACAATTGTATATTGTGTCTGCAGTATTTAGAAAATCAGATTGGAAGG
AAGTTGGTGGGTTTAATGAAAATATGAAAACGAATGGGAGGATTATGATTTTTGGCTTTCGTTGATT
GA..3'

```

Foram utilizados os *primers* Orf22F/Orf22R *forward* ou *reverse*. Em vermelho e negrito, códon de iniciação e em vermelho as sequências dos iniciadores utilizados.

Figura 18 - Análise de homologia entre as sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados Lagoa e Bolívia e sequências depositadas em banco de dados

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF144879.1	Leptospira interrogans rfb locus, complete sequence	989	989	100%	0.0	100%
F757689.1	Leptospira interrogans serovar Hebdomadis strain C401 O-antigen ge	905	905	100%	0.0	97%
CP000250.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis JB197 chromosome 1,	817	817	100%	0.0	94%
CP000248.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis L550 chromosome 1,	817	817	100%	0.0	94%
AF028135.1	Leptospira borgpetersenii lipopolysaccharide o-antigen biosynthetic l	817	817	100%	0.0	94%

A figura mostra a lista de cinco espécies de leptospiros que apresentaram alinhamentos significativos com as sequências amplificadas com os *primers* ORF22-F – ORF22-R.

A comparação da sequência de nucleotídeos com sequências depositadas em banco de dados mostra elevada identidade com locus de biossíntese de lipopolissacarídeo do antígeno-O, sendo 100% de identidade com o locus rfb de *Leptospira interrogans*, 97% de identidade com a sorovariedade Hebdomadis, classificada na espécie *Leptospira interrogans* e 94% de identidade com a sorovariedade Hardjo *Leptospira borgpetersenii*. Nota-se que a sorovariedade Hebdomadis apresentou a segunda maior identidade com os isolados. Na classificação taxonômica estes microrganismos estão classificados na mesma espécie de Lagoa e Bolívia e pertencem ao mesmo sorogrupo. A terceira maior identidade foi encontrada com o genótipo Hardjobovis, classificados na

sorovariedade Hardjo e espécie *L. borgpetersenii*.

Nestes resultados foi possível confirmar a homologia da sequência nucleotídica utilizada como iniciadores da reação entre cepas classificadas no mesmo sorogrupo, neste caso, sejrøe, pertencentes às espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Os resultados das análises das sequências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia permitiram classificar os isolados no sorogrupo sejrøe.

4.4.3 Estudo filogenético de Orf22 – locus rfb

Com a finalidade de realizar o estudo filogenético do gene Orf22 presente no sorogrupo Sejrøe a sequência nucleotídica do genótipo hardjoprajitno foi traduzida “*in silico*”, usando o programa “Translate Tool”, do servidor *Expasy* (seção). A sequência de aminoácidos está apresentada na Figura 21.

Figura 19 - Sequência hipotética de aminoácidos para a proteína do gene Orf22 do locus rfb

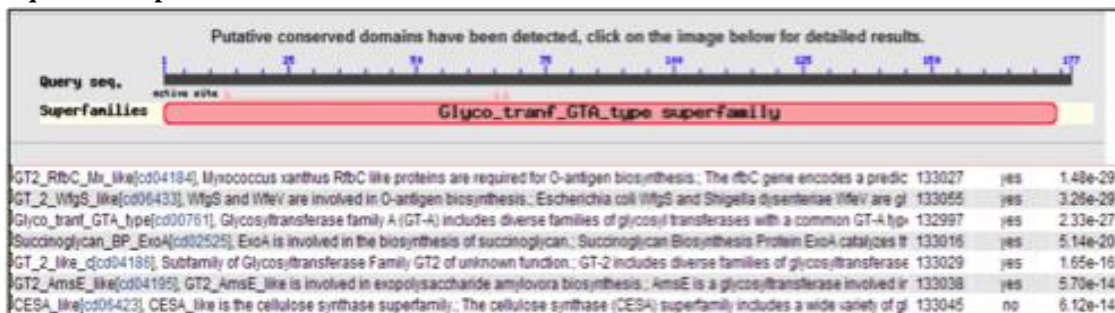
```
LRQRYKNWEVIIVDDGSNDPFTISIIIEEYKNKSGFTVLSITRSGPST
ARNIGIDTAQGEFILPLDSDDRIHEDYLLLEAISAYKKNPSLRIVYCE
AEFFGSIK GKWNLP EYRFPNILLDNCIFVSAVFRKSDWKEVGGFN
ENMKNEWEDYDFWLSLIEKGGKVYRIPKVLFFYYRIGHS
```

Tradução “in silico” da sequência nucleotídica referente ao gene ORF22 localizado no locus rfb do genótipo hardjoprajitno, sorovariedade hardjo, espécie *Leptospira interrogans*

A sequência de aminoácidos traduzida a partir da sequência nucleotídica foi submetida à análise de homologia com

sequências depositadas em banco de dados, utilizando o algoritmo “protein blast”, disponível no NCBI (National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados são mostrados na Figura 22

Figura 22 - Análise da homologia entre a sequência traduzida “in silico” referente à ORF22 e sequências depositadas em banco de dados



As setas na parte superior da figura mostram a posição dos resíduos de sítio ativo da proteína envolvidos na reação enzimática classificados na superfamília GTA de glycosyltransferases. Logo abaixo, é mostrada a lista de proteínas que apresentam alinhamentos significativos com a sequência de ORF22.

A comparação da sequência predita de aminoácidos do gene ORF22 com as sequências presentes no banco de dados

do NCBI demonstrou elevada homologia com glycosyltransferases da família GT2, incluindo sequências codificadas por genes como *rfbC* da espécie *Myxococcus xanthus*, *WfgS* da espécie *Escherichia coli* e *WfeV* de *Shigella dysenteriae* envolvidas com a biossíntese do antígeno-O. Nota-se também a ocorrência de homologia deste domínio conservado com a proteína de membrana *ExoA* envolvida na biossíntese de succinoglycano. Este composto é descrito

como um expopolissacarídeo de elevado peso molecular composto por repetidas unidades de octossacarídeos. Na análise comparativa da sequência traduzida de ORF22 de *Leptospira interrogans*, sorovariedade hardjo, genótipo

hardjoprajitno com sequências homologas à região protéica de succinoglycan foram identificadas sequências de aminoácidos conservados com diversos grupos de microrganismos, como mostrado na Figura 23.

Figura 23 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ExoA do banco de dados com a sequência traduzida da Orf22

	1	60
Candidatus Kuenenia	FVTIIMP	IRNEASF
L.interrogans	LVSIVI	PCYNYGR
Nitratiruptor sp.	KISVII	PIIYNEEK
Methanosarcina mazei	FVSVVVG	IRNEERY
Desulfovibrio alaskensis	FITVVM	PVRNEEQ
Clostridium kluysteri	TVSIII	IPVNEELY
Photorhabdus luminescens	NISVIC	PIILNEEK
Candidatus Kuenenia	DIIIR	VDGHA
L.interrogans	EFILP	LDSDD
Nitratiruptor sp.	EYVIR	LDAHS
Methanosarcina mazei	DFVAF	TGDGCK
Desulfovibrio alaskensis	DIFLV	VVDGH
Clostridium kluysteri	DIVVR	VDAHAL
Photorhabdus luminescens	EYIAR	IDAHS

Em vermelho estão indicados os domínios conservados e em azul os domínios não conservados entre os diferentes grupos bacterianos.

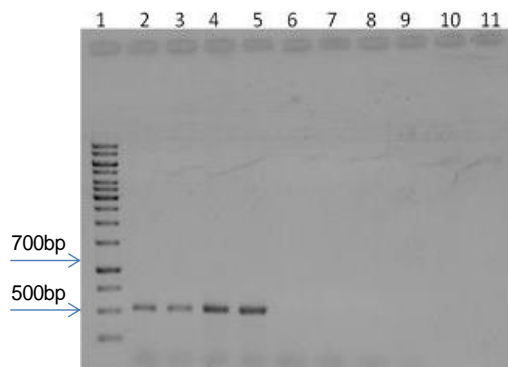
4.4.4 Identificação do genótipo dos isolados de *Leptospira spp* classificados na sorovariedade hardjo

4.4.4.1 Amplificação parcial e sequenciamento da ORF36

Com o objetivo de realizar a confirmação do genótipo dos isolados Lagoa e Bolívia do gênero *Leptospira spp* foi escolhida a utilização do gene ORF36 para a tentativa de amplificação e sequenciamento parcial da região. A partir da análise da

sequência de nucleotídeos do gene ORF36 foi desenhado um par de iniciadores (*primers*) para amplificação de um fragmento de 489bp referentes à região. No procedimento foram escolhidas cepas controle classificadas em diversas sorovariedades e espécies de leptospiros, além dos isolados Lagoa, Bolívia, Norma-CTG e Mini-CTG. A realização da PCR utilizando este par de iniciador gerou um fragmento específico com tamanho aproximado de 500 bp. Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com solução de brometo de etídeo (Figura 24).

Figura 24 - Eletroforese de produtos amplificados a partir de DNA genômico usando os iniciadores (*primers*) Orf36F e Orf36R



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo: Canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, Norma-CTG; can. 3, cepa Hardjo (OMS); can. 4, cepa Bolívia; can. 5, cepa Lagoa; can. 6; cepa Mini-CTG; can. 7, cepa hardjobovis; can. 8; sorovariedade Lai;

can. 9, sorovariedade Copenhageni can. 10, cepa Bataviae; can. 11, c-.

No gel apresentado na figura 24 as canaletas 2 a 5 mostram o produto de amplificação com uma única banda principal, o que corresponde às cepas Norma (CTG), Hardjo (OMS), Bolívia e Lagoa correspondente a um amplicon com tamanho aproximado de 500 bp, já nas canaletas de 6 a 10 não foi observado produto positivo de amplificação por PCR. Os amplicons positivos foram purificados e reamplificados com os iniciadores (*primers*) iniciais *forward* e *reverse* para a reação de sequenciamento. Foram selecionadas as sequências referentes às cepas controle da reação para confirmar as sequências geradas no sequenciamento. As sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa, Bolívia, Norma-CTG foram submetidas no banco de dados no algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI e os resultados são mostrados na Figura 25.

Figura 205 - Análise de homologia entre as sequências nucleotídicas obtidas dos isolados Bolívia e cepa Hardjo (OMS) de sequências depositadas em banco de dados

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF144879.1	Leptospira interrogans rfb locus, complete sequence	1142	1142	100%	0.0	99%

A figura mostra a única sequência que apresentou alinhamento significativo com a sequência de DNA da região ORF36.

As sequências nucleotídicas obtidas das cepas Lagoa, Bolívia e Hardjo (OMS) foram avaliadas no GenBank quanto

à identidade das sequências geradas. Foi confirmado que os isolados Lagoa e Bolívia pertencem a espécie *L. interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo (subtipo hardjoprajitno). A presença desta região somente no genótipo hardjoprajitno

espécie *L. interrogans* sugeriu a realização do estudo filogenético da região. A partir desses dados as traduções “*in silico*” da sequência de nucleotídeos do gene ORF36

foram executadas com o programa “*Translate Tool*”, do servidor *ExpasyTools*. A sequência de aminoácidos é apresentada a seguir na Figura 26.

Figura 26 - Sequência hipotética de aminoácidos para a proteína do gene Orf36do lócus rfb

```
MPLMKTKELAIIDCLTKYKLELKD KFESSIQEVGVRYCYLDDLLPDSANRIGSVFPDKVIMRLMSSFRERKYTSKKFDQFDQILKNI  
TFAIQDAGVIRLIEEITGVAQSPDPSLYAGGLSIMEKGNFLNPHIDNSHEMTRSMYRTLNLIIYYVKNKWSFEKGGNLELWDKKVKRN  
VTIESQFNRLVIMETNPWSVHSQQSCNG
```

Tradução “*in silico*” da sequência nucleotídica referente ao gene ORF22 localizado no lócus rfb do genótipo hardjoprajitno, sorovariedade hardjo, espécie *Leptospira interrogans*.

Para a comparação e avaliação da presença de polimorfismos nas sequências referentes ao gene ORF36, as sequências obtidas foram alinhadas no programa *CLUSTAL W*. O alinhamento das sequências está demonstrado na Figura 27.

Figura 217 - Alinhamento das sequências nucleotídicas referentes ao gene ORF36 de isolados de *Leptospira spp*

Lagoa	TGGATGGTCTCTGCTCGATTTCGGGGAAA ³⁰ TCCGGATATACTG ⁴⁰⁴² TGTGTTTCCCTGATAAGGT 60
CTG	TGGATGGTCTCTGCTCGATTTCGGGGAAA ³⁰ TCCGGATATACTG ⁴⁰⁴² TGTGTTTCCCTGATAAGGT 60
Hardjo	TGGATGGTCTCTGCTCGATTTCAGGGAAA ³⁰ TCCGGATATACTG ⁴⁰⁴² TGTGTTTCCCTGATAAGGT 60
Bolivia	TGGATGGTCTCTGCTCGATTTCAGGGAAA ³⁰ TCCGGATATACTG ⁴⁰⁴² TGTGTTTCCCTGATAAGGT 60
Lagoa	AAATATGAGATTGGATGTCGACTTTTAGAGAGCGAAAAATATACCTCGAAAAAATTTGATC 120
CTG	AAATATGAGATTGGATGTCGACTTTTAGAGAGCGAAAAATATACCTCGAAAAAATTTGATC 120
Hardjo	AAATATGAGATTGGATGTCGACTTTTAGAGAGCGAAAAATATACCTCGAAAAAATTTGATC 119
Bolivia	AAATATGAGATTGGATGTCGACTTTTAGAGAGCGAAAAATATACCTCGAAAAAATTTGATC 119
Lagoa	AATTTGATCAAATTTTGA ⁴⁵ AAAAATG ⁴⁷ GATCTTTTGCAATTCAGACGCTGGAGTGATAAGAT 180
CTG	AATTTGATCAAATTTTGA ⁴⁵ AAAAATG ⁴⁷ GATCTTTTGCAATTCAGACGCTGGAGTGATAAGAT 180
Hardjo	AATTTGATCAAATTTTGA ⁴⁵ AAAAATA ⁴⁷ TGACTTTTGCAATTCAGACGCTGGAGTGATAAGAT 180
Bolivia	AATTTGATCAAATTTTGA ⁴⁵ AAAAATA ⁴⁷ TGACTTTTGCAATTCAGACGCTGGAGTGATAAGAT 180
Lagoa	TAATAGAGAAATAACTGGCATTGTCG ²⁰⁸ ATCAGTCTCCTGACCCGTC ²⁰⁸ CCCTATATGCTGGGG 240
CTG	TAATAGAGAAATAACTGGCATTGTCG ²⁰⁸ ATCAGTCTCCTGACCCGTC ²⁰⁸ CCCTATATGCTGGGG 240
Hardjo	TAATAGAGAAATAACTGGCATTGTCG ²⁰⁸ CTCAGTCTCCTGACCCGTC ²⁰⁸ CCCTATATGCTGGGG 240
Bolivia	TAATAGAGAAATAACTGGCATTGTCG ²⁰⁸ CTCAGTCTCCTGACCCGTC ²⁰⁸ CCCTATATGCTGGGG 240
Lagoa	GCTTGAGCTTAATGGAAAAAGGAAATTTTAAATCCACATATCGATAATCTCATGAAA 300
CTG	GCTTGAGCTTAATGGAAAAAGGAAATTTTAAATCCACATATCGATAATCTCATGAAA 300
Hardjo	GCTTGAGCTTAATGGAAAAAGGAAATTTTAAATCCACATATCGATAATCTCATGAAA 300
Bolivia	GCTTGAGCTTAATGGAAAAAGGAAATTTTAAATCCACATATCGATAATCTCATGAAA 300
Lagoa	TGACGAGATCCATGTATAGA ³⁶⁰ ACTTTGAATCTCTTTATTATGTAATAAAAAATTTGGTCTT 360
CTG	TGACGAGATCCATGTATAGA ³⁶⁰ ACTTTGAATCTCTTTATTATGTAATAAAAAATTTGGTCTT 360
Hardjo	TGACGAGATCCATGTATAGA ³⁶⁰ ACTTTGAATCTCTTTATTATGTAATAAAAAATTTGGTCTT 360
Bolivia	TGACGAGATCCATGTATAGA ³⁶⁰ ACTTTGAATCTCTTTATTATGTAATAAAAAATTTGGTCTT 360
Lagoa	TGACGAGATCCACGAAAAAGGGGGTAACTTAGAACTCTGGGATAAAAAAGTAAACGCA 420
CTG	TGACGAGATCCACGAAAAAGGGGGTAACTTAGAACTCTGGGATAAAAAAGTAAACGCA 420
Hardjo	TGACGAGATCCACGAAAAAGGGGGTAACTTAGAACTCTGGGATAAAAAAGTAAACGCA 420
Bolivia	TGACGAGATCCACGAAAAAGGGGGTAACTTAGAACTCTGGGATAAAAAAGTAAACGCA 420
Lagoa	⁴²¹ ATGTAACATGGAAGCCAATTTAATCGTCTTGTGATTGTC ⁴⁶⁸ CCGGAA ⁴⁷³ ACGAA ⁴⁷³ CCCTGGT 480
CTG	⁴²¹ ATGTAACATGGAAGCCAATTTAATCGTCTTGTGATTGTC ⁴⁶⁸ CCGGAA ⁴⁷³ ACGAA ⁴⁷³ CCCTGGT 480
Hardjo	⁴²¹ GTGTAACATGGAAGCCAATTTAATCGTCTTGTGATTGTC ⁴⁶⁸ CCGGAA ⁴⁷³ TCGAA ⁴⁷³ CCCTGGT 480
Bolivia	⁴²¹ G ⁴²¹ TGTAACATGGAAGCCAATTTAATCGTCTTGTGATTGTC ⁴⁶⁸ CCGGAA ⁴⁷³ TCGAA ⁴⁷³ CCCTGGT 480
Lagoa	CTTTCATTCGTTTAGCAGTTACAGGACTGACC 512
CTG	CTTTCATTCGTTTAGCAGTTACAGGACTGACC 512
Hardjo	CTTTCATTCGTTTAGCAGTTACAGGACTGACC 512
Bolivia	CTTTCATTCGTTTAGCAGTTACAGGACTGACC 512

A figura mostra as sequências dos isolados classificados na sorovariedade hardjo, genótipo hardjoprajitno e as regiões em amarelo representam as regiões polimórficas entre as sequências e as posições dos polimorfismos. Em vermelho, as sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados no sequenciamento.

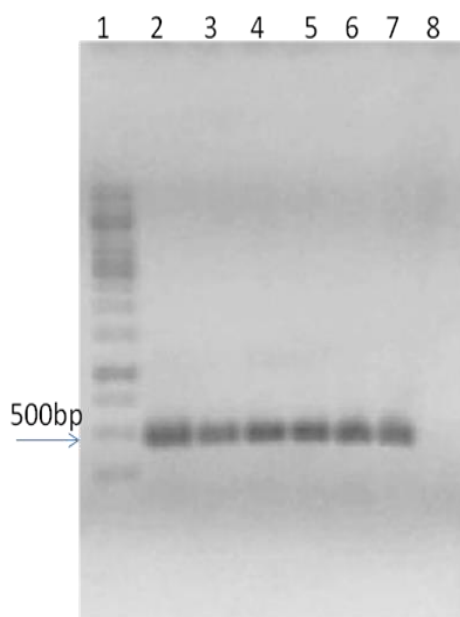
Na figura 27 é possível observar a ocorrência de polimorfismos entre as sequências de cepas classificados na sorovariedade Hardjo genótipo Hardjoprajitno. Na figura 27 é possível observar a formação de dois subgrupos, sendo o primeiro formado entre cepas Lagoa e Norma-CTG e o segundo formado por Bolívia e Hardjo (OMS).

4.4.5 Amplificação e sequenciamento parcial do gene WZX (ORF15)

Com o objetivo de avaliar as sequências nucleotídicas das cepas classificados na sorovariedade Hardjo subtipo hardjoprajitno foi realizada a amplificação do gene Orf15- WZX localizado no locus rfb do gênero *Leptospira spp.* Na reação da PCR-específica foi obtido um único amplicon, com tamanho de 578 bp para todas as cepas analisadas visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, representado na Figura 28. O produto amplificado de cada amostra foi purificado para a realização do sequenciamento e as sequências nucleotídicas resultantes foram alinhadas no programa *Clustal W* e identificados polimorfismos entre as cepas classificados na espécie *L. interrogans* e espécie *L. borgpetersenii* e 100% de homologia entre

as cepas classificadas na espécie *L. interrogans*, mostrado na Figura 28.

Figura 28 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (*primers*) WZXF/WZXR



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo: Canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, genótipo hardjobovis; can. 3, cepa Bolívia; can. 4, Hardjo-OMS; can. 5,

cepa Lagoa; can. 6; Norma-CTG; can. 7, sorovariedade Lai; can. 8; c-.

O gel apresentado na figura 28 mostra a presença de produtos amplificados em todos os isolados analisados. Observa-se um único amplicon com tamanho aproximado de 500 bp para todas as cepas analisadas. Sorovariedades classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* foram sequenciadas com os iniciadores (*primers*) *forward* ou *reverse*. Em seguida, as sequências nucleotídicas foram submetidas à análise no algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI.

As sequências nucleotídicas obtidas para os isolados Lagoa e Bolívia foram submetidas à análise de homologia com sequências depositadas em banco de dados, utilizando o algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI (National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados são mostrados na Figura 29.

Figura 29 - Sequência nucleotídica do produto de amplificação correspondente ao fragmento da região referente à WZXF/WZXR dos isolados Lagoa e Bolívia

```

ATGTTTTAGGAGTTGGATAGCCCGCTATCTAGGTCCTGACAGCTATGGAAAGTTAAATTACGTGATCGCCTATATT
GCGTTAATTGGTAGTTTTACAAATTTAGGCTTAGACGGGGTTGTTGTCAGAGAACTCATTAAAGAGAAAGCTCAAAA
ACAAGAAATTATCTTACCCTTTTTGTTACAATTGATCGCGGGAATATTCGCATACGGAGGCAATTTTACTCATT
CCAATTCCTAGACCGGATGAATCGGATCTATTTGGATGGTATTTCTCGTCGGGTTGACTCTTATTTTTCGCTCAGTT
GGAGTAATAAAATATTGGTATGAGGCCCAAGTTTATCCAAATACTTTGTATGGCTTGAAAACGGATTATTTTTGTGT
TTTCGGGAGTGCGTATACTATTGATTTTAAATGTTTCGGTGTGTTTGCCTTTATATGGGTCGGATTGATAGAATCATT
TATTAGTTTATTTGGTTATTTCTTTATTAATAAATATCATAATGGCTCTTTGTCTGTACTTCACGCAAATGGAAAAGGG
CTCAAACATTATTGAGAGATAGTTGGATGTTGTACTTTCAGGATTGGCCGTAATTGTATATGCGG

```

Foram utilizados os *primers forward* ou *reverse*. Em vermelho e negrito, códon de iniciação e em vermelho as sequencias dos iniciadores utilizados.

As sequências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia apresentaram identidade de 100% com a espécie *L. interrogans*, rfb locus, 99% de identidade

com as sorovarietades Lai, Grippothyphosa, Copenhageni, Hebdomadis, canicola e por fim, 81% de identidade com a espécie *L.*

borgpetersenii. Os resultados são mostrados na Figura 30.

Figura 30 - Análise de homologia das sequências de nucleotídeos obtidas das cepas Lagoa e Bolívia referentes à região Orf15 e sequências depositadas em banco de dados

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF146879.1	<i>Leptospira interrogans</i> rfb locus, complete sequence	1070	1070	100%	0.0	100%
CP001271.1	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai str. IPAV chromosome I, contig	1053	1053	100%	0.0	99%
AE010300.2	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai str. 56601 chromosome I, contig	1053	1053	100%	0.0	99%
F2976888.1	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Grippothyphosa strain lin6 O-antigen	1053	1053	100%	0.0	99%
F2976887.1	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Autumnalis strain lin4 O-antigen	1053	1053	100%	0.0	99%
U81226.2	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni rfb locus, complete sequence	1053	1053	100%	0.0	99%
AE016823.1	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni str. Flocruz L1-130	1053	1053	100%	0.0	99%
F2976889.1	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Hebdomadis strain C401 O-antigen	1037	1037	100%	0.0	99%
F2976886.1	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Canicola strain Gu44 O-antigen	1031	1031	100%	0.0	99%
AF316500.1	<i>Leptospira interrogans</i> strain L170 rfb locus, complete sequence	1026	1026	100%	0.0	99%
CP000350.1	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Hardjo-ovis JB197 chromosome I	436	436	99%	7e-119	81%
CP000248.1	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Hardjo-ovis L550 chromosome I	431	431	99%	3e-117	80%
AF078135.1	<i>Leptospira borgpetersenii</i> lipopolysaccharide o-antigen biosynthesis gene	431	431	99%	3e-117	80%

A figura mostra a lista de 13 alinhamentos correspondentes à sorovarietades, classificadas na espécie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*.

Os resultados referentes à Orf15 mostraram as cepas classificadas no genótipo hardjoprajitno apresentaram homologia com sorovarietades da espécie *L. interrogans*, indicando que esta região parece não estar envolvida com características sorológicas do gênero *Leptospira spp.*

4.5 ESTUDO DE SEQUÊNCIAS DE INSERÇÃO EM *LEPTOSPIRA SPP*

Nesta etapa do estudo foi realizada a análise dos elementos móveis IS1533 e IS1500 descritos no genoma das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, respectivamente.

4.5.1 Construção dos iniciadores para amplificação dos elementos móveis

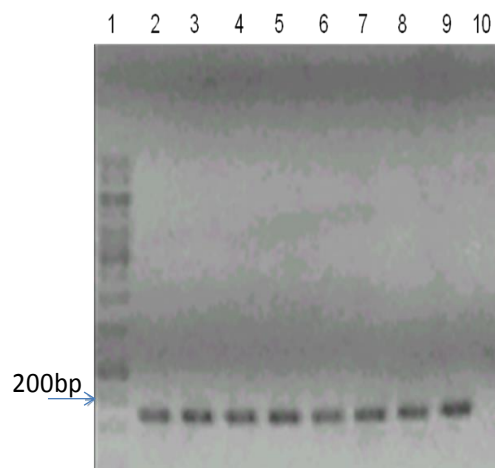
Para identificar e estimar o número de cópias das sequências de inserção IS1533 e IS1500 no genoma de bactérias da sorovarietade Hardjo e realizar a análise comparativa do número de cópias em diferentes cepas do gênero *Leptospira spp* foram associadas as técnicas *in silico* para avaliação de distribuição de sequências de IS1533 e IS1500 em genomas fechados de *L. interrogans* sorovarietade Copenhageni e *L. interrogans* sorovarietade Lai associados aos estudos *in vitro* de PCR convencional e Real Time – PCR.

Na construção dos iniciadores (*primers*) da PCR convencional e da técnica de Real Time – PCR das sequências de inserção IS1533 e IS1500 foram realizadas análises “*in silico*” dos cromossomos I e II

das sorovarietades Lai e Copenhageni disponíveis no banco de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information). Em seguida, foram selecionadas as regiões do genoma que apresentaram 100% de identidade com as sequências de inserção de interesse no presente estudo. Para a escolha dos iniciadores (*primers*) foram selecionadas as sequências nucleotídicas encontradas em elevada porcentagem de elementos móveis, com o objetivo de aumentar a possibilidade de identificação e, por conseguinte alcançar maior número de sequências de inserção distribuídas no genoma. Os iniciadores (*primers*) foram construídos para a PCR convencional com amplificação de fragmento de 130 bp e realização da técnica de Real -Time PCR.

Após as avaliações *in silico* das sequências nucleotídicas, os iniciadores foram utilizados na PCR convencional com amplificação de isolados regionais e cepas de referência. A execução da PCR com estes iniciadores gerou um fragmento apresentando tamanho de aproximadamente 130 bp, sendo o produto da amplificação por PCR analisado em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo (Figura 31).

Figura 31 - Eletroforese de produto amplificado a partir de DNA genômico usando os iniciadores (*primers*) IS1533



Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo: canaleta 1, Padrão de peso molecular 1Kb, can. 2, Hardjo (OMS); can. 3, sorovarietade pomona; can. 4, sorovarietade Lai; can. 5, cepa Norma-CTG; can. 6; cepa Bolívia; can.7, cepa Lagoa; can. 8; genótipo hardjobovis; can.9, sorovarietade canicola; can. 10, c-.

As canaletas de 2 a 9 mostram o produto de amplificação, no qual é possível observar uma única banda principal em todas as amostras, correspondente a um fragmento de aproximadamente 130 bp. Os amplicons positivos foram purificados de acordo com metodologia descrita na seção 4.4. e em seguida foram reamplificados com os iniciadores específicos forward e reverse, e então sequenciados.

As sequências nucleotídicas obtidas do sequenciamento referente aos isolados Lagoa, Bolívia, Norma-CTG, Hardjo-OMS e Hardjobovis foram analisadas para a confirmação da região de interesse, no qual foram submetidas à análise no banco de dados, utilizando o

algoritmo “*nucleotide blast*”, disponível no NCBI. Os resultados são mostrados nas

Figuras 32 e 33.

Figura 32 - Análise de homologia das seqüências de nucleotídeos dos isolados Norma-CTG e Lagoa com seqüências de banco de dados

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000351.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis JB197 chromosome 2,	134	804	100%	8e-29	97%
CP000350.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis JB197 chromosome 1,	134	1.200e+04	100%	8e-29	97%
CP000349.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis L550 chromosome 2,	134	804	100%	8e-29	97%
CP000348.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis L550 chromosome 1,	134	1.159e+04	100%	8e-29	97%
M82880.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis isolate RZ33 insertion	134	134	100%	8e-29	97%

A figura mostra a lista de cinco regiões com alinhamento significativo localizadas nos cromossomos I e II da espécie *L. borgpetersenii*.

Figura 33 - Análise de homologia das seqüências de nucleotídeos dos isolados Bolívia e a cepa de referência Hardjo (OMS)

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB215823.1	Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130, chr	207	207	100%	9e-51	98%
CP581321.1	Leptospira interrogans serovar Lai str. IPAV chromosome 1, complet	180	354	100%	2e-42	93%
AB210300.2	Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601 chromosome I, complet	180	354	100%	2e-42	93%
CP000350.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis JB197 chromosome 1,	147	1.204e+04	97%	2e-32	90%
CP000348.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis L550 chromosome 1,	147	1.204e+04	97%	2e-32	91%
CP000351.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis JB197 chromosome 2,	134	804	94%	2e-28	90%
CP000349.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis L550 chromosome 2,	134	933	94%	2e-28	90%
M82880.1	Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-bovis isolate RZ33 insertion	128	128	94%	7e-27	90%
X72673.1	<i>L. borgpetersenii</i> IS-like DNA	111	111	94%	8e-22	87%

A figura mostra a lista de nove regiões genômicas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, que apresentaram alinhamentos com regiões amplificadas com os iniciadores IS1533.

As seqüências nucleotídicas obtidas dos isolados e de cepas de referência

foram submetidas às análises no banco de dados com a aplicação do algoritmo “*nucleotide blast*” disponível no NCBI. As seqüências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Norma- CTG apresentaram 97% de identidade com a seqüência da espécie *L. borgpetersenii*, sorogrupo Sejroe,

sorovariedade Hardjo (subtipo hardjobovis), como mostrado na figura 33, enquanto nota-se uma porcentagem de 98% de identidade entre a sequência da cepa isolada Bolívia e a sequência depositada no banco de dados referente à espécie *L. interrogans*, sorovariedade Copenhageni.

Dentre as regiões genômicas analisadas no trabalho somente a sequência de inserção IS1533 revelou identidade dos isolados da sorovariedade Hardjo com a espécie *L. borgpetersenii*, com isso, a elevada porcentagem de identidade da região de IS1533 das cepas Lagoa e Norma - CTG com a espécie *Leptospira borgpetersenii*

sorovariedade Hardjo sugeriu a possibilidade de ocorrência de transferência lateral deste elemento móvel entre as cepas bacterianas.

A ocorrência de uma cópia completa da sequência de inserção IS1533 no genoma do gênero *Leptospira spp* foi descrita na espécie *L. borgpetersenii*, sorovariedade Hardjo (subtipo hardjobovis) (Bulach et al., 2006) e na espécie *L. interrogans*, soroviedades Lai e Copenhageni (Dr. Richard Zuerner – comunicação pessoal) com tamanho de 2.1 Kb como mostrado abaixo na Figura 34.

Figura 34 - Sequência nucleotídica referente à sequência de inserção IS1533 da espécie *L. interrogans*, sorovariedade Copenhageni

```

Leptospira interrogans sorovariedade copenhageni

1AACTGAAATAATTGCGTACATTTCTTTCCGGCCTATTTGGAGTCGTTTTCAACCAATTTGGCTGACAAGACTTGTCCGGTCAAGG
GGAAATTCGATCCTATGGAATTGGAAGAAATACTTTTTAAAAACAATAATTTATAATGATGATATTTGAAATTCATGTTTTATGA
GTTCTAGTTTCTTACGATCTAATCAAAAATTGGTCCAATCGACTTAGAGTTTTGTTAAATTTAGGCATGCTCCTTATGTAGGA
ACTATTACAAAATACTGATATTATCTGCGAATTACTAAAACGTGAACCATTTCAAACCTCAAATTAGACTTTTACCCAAACCTTTTG
GATATGTGGGAACCTACATAAGTTTAGTAATAAAACGAGATTCGAAAACCTACCAAGTAGACGAAACACATAAGACAAAATGG
CGCCCTTCTGGGCTTAAAACCGTGGGTTAGATGCAAGATTTGCATTTACCACAAAACAAGAAAACCGCAGAAGGAACGTAA
TGAAAAGAAAAGTATATGTAGGAATGGATGTCCACAAGAAACGATTCAAATTTGCATATTTAACGAGTAATACAAAAGGAAATGGT
GAAAGAACAACAGATAAAACATAATGAGGTTTCATATCAAAAATTCATCAACAACTCAAACAGAATGGAACGAAATTCATTGTT
GTTACGAAGCGGGAGTAACCGGCTATCCACTTTACAGATATCTAAAGTCTTTGGGAGTGAAGTGTATCCTTGTAGCACCCGGAA
AGATTTCCAGACAAAAGTTCTGATAAAATCAAACGGATAAAAGAGATGCGATCAAGTTAGCGAGATTATTACGAAGTGGGGATTT
AGAATCGATTCATGTTCCGAGTGAAGAAGACGAAGCAGTAAGGGATTATTTAAGATCCCGTGACAGTCTTCGTTTGGATTTAGGA
AGGAATCGTCAGAGGTTGATGAAGTTTCTATTAAGAAAGGGAATGTATATTCAACAACAAAGTATTGGACAGTCAGTCATTACAA
ATGTTGAATAATCTTCAATTTGAAAATGAGATCCTTTTCATGAAACGTTTTAACGACTATTACAGCCGAGTGAGAGTTCAAGAAGAG
AATCTCAAAGCGATGGATCAAAGATTCAAGAGATCGCGAAAAGTGAAGCTTTTAGAGAACGAGTGGGAATCTTAAGATGTTTTT
GAGGAGTGGATTATCTAACCGCAATGTTCTTGTCTCAGTGAGGTTAAACGACTTTTCGTAGATTCAAACCGCAGGTTCTTTTATGAG
CTTTTTAGGACTTGTTCCTGGAGAATATTCCAGCGGTTTCGAAAAGAAAACAACAGGGATTACAAAACCGGAAGTCCGAGACTT
AGAAGGATTTTACCGAAGCTGCTTGGCAGCATCGCTTCCCGGAACAGGAAGTAAGATCGTAGCCGCAAGAAGAACCGGACA
ACCTGCGTTAGTCGTTGCTTTAGCAGAAAAAGCTTCCCTTAAGGTTACACAAGAAATTTTCGTAACCTACAGCTAAGAGGAAAACT
CCTCAAGTAATGATAACCGCAGTTTCGAGAGAACTTTCCGGATTTCTTTGGGCAGCGATGAACTTGGTAGCTTAGAGTTAGAGTA
ATGTTTTCAATAGCTTAATTCGTTAGAGAAGATGTACGATAAAGGAGGAATACTTGTAGTTCAAGTGTGAAGCAATCTGCTT
TGCAGATTTGACCTACAACCGCACCCATAGGAAAGCGTTGTGCTGAGTTGTTTTAGACTAAGAACAGCTCCCGATGTATAGATT
ATCCTGCGGTATCCAACCGCGAATATCAGTCTGATCAATCGTCGCGAATGCTTTTCTCTAACGAGTTAAACTATTGAATGATTAA
AAAAAATTTTACTGCTCAGCTTGGGTGCGCCATATCAGAACTACTACAAAAGAAATTATCGAAAACAACGAACGGCGTTGAAAA
GAGGGTTTCTGTGGGAACCTACCACATTTAACTGAAGATTCAAATATGATTTTTTAAAGTTTTGAGGCAGACTCTAAATGCAAGCA
AATTAGGCAAAGTAATAGTTCTACAATTTTGAATTTATTTGATAAATCGTA (2.1Kb)

```

A sequência descrita acima foi gentilmente cedida por Dr. Richard Zuerner (United States Department of Agriculture – USDA- USA).

4.6 REAL TIME –PCR EM SEQUÊNCIAS DE INSERÇÃO DE *LEPTOSPIRA SPP*

4.6.1 Seleção de gene endógeno e genes alvo (IS1533 e IS1500)

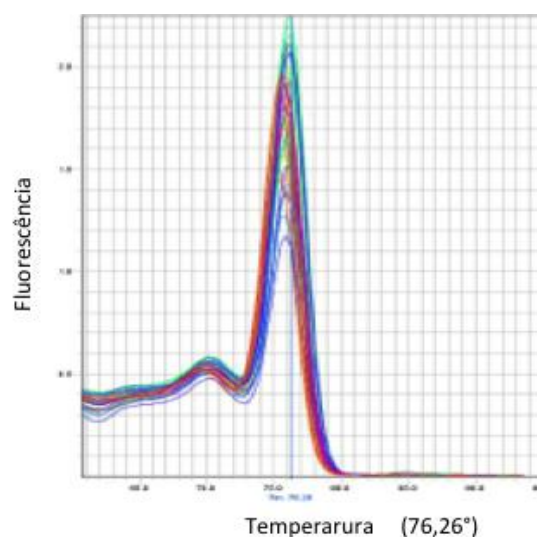
Nesta etapa do trabalho foi realizada a seleção do gene endógeno (controle) que apresenta-se no genoma com uma cópia completa no genoma e neste estudo foi escolhido o gene *secy*, como descrito por Ahmed et al. (2009). Para a determinação do número de cópias foram construídos iniciadores relativos aos genes-alvo referentes às sequências de inserção. Para o controle da reação de real-time PCR da IS1533 foi selecionada a *L. interrogans* sorovariedade Lai devido sequenciamento completo do genoma em banco de dados.

4.6.1a Amplificação do gene endógeno *secy*

Nesta etapa do trabalho foi realizada a amplificação do gene endógeno *secy* da sorovariedade Lai, com 13 diluições seriadas do DNA genômico a partir de uma amostra inicial de 700 ng na proporção de 1:1. Na reação de amplificação da cepa controle Lai com o gene *secy* foi obtida uma curva de temperatura de anelamento com valor de 76,6°C. A análise da curva de dissociação do

gene *secy* mostrou não haver picos referentes a formação de dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos de amplificações para todas as diluições do DNA (Figura 35).

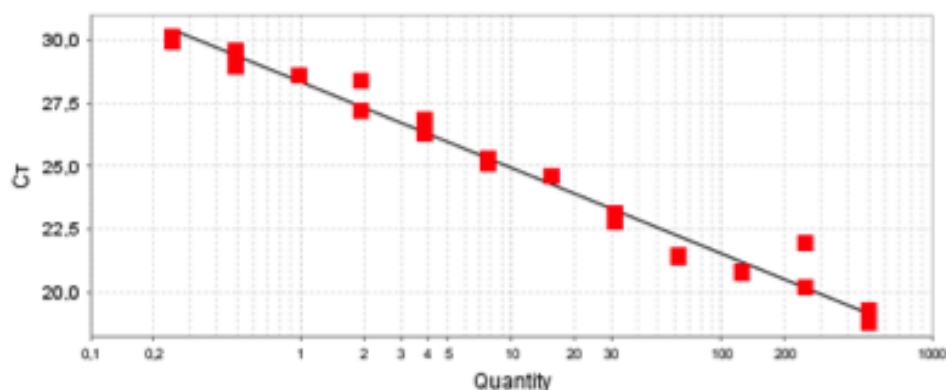
Figura 35 - Curva de dissociação do gene *secy* com a cepa classificada na sorovariedade Lai da PCR em tempo real um único ponto de temperatura de dissociação de 76,2°C



4.6.1b Curva padrão do gene endógeno *secy*

A curva padrão do gene endógeno *secy* foi estabelecida com a diluição seriada do DNA genômico da sorovariedade Lai utilizada como o controle da reação. Foram identificados valores de Ct que variaram de 21,6 a 30, como mostrado na Figura 36.

Figura 36 - Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie *L. interrogans* com os iniciadores (*primers*) da região *secy*



No gráfico estão indicados os valores de Ct em relação às diluições seriadas do DNA genômico.

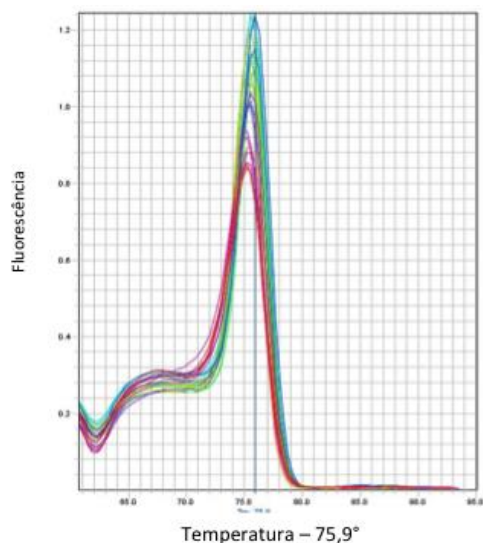
A validação da curva padrão para o gene endógeno *secy* foi analisada quanto aos valores de eficiência da reação, valor de *slope* (inclinação da reta indicando eficiência de amplificação) e valor de R^2 . Nesta curva padrão os resultados encontrados referentes à eficiência da reação (97,43%), valor de *slope* (-3,382) e R^2 (0,975). A partir da padronização dos valores de ct do gene endógeno, em seguida foram realizadas com a sequência de inserção IS1533.

4.6.2 Amplificação da sequência de inserção IS1533

Para o cálculo da estimativa do número de cópias da IS1533 foi realizada inicialmente a diluição seriada na proporção de 1:1 do DNA genômico a partir da quantidade de 700 ng de DNA gômico total da sorovariedade Lai. A amplificação específica do elemento móvel IS1533 foi confirmada com a identificação da curva de temperatura de anelamento do iniciador com o DNA controle analisado com temperatura

de *melting* (T_m) de 75,9°C com ocorrência de um pico de temperatura, indicando que não houve formação de dímeros de iniciadores (*primers*) na reação (Figura 37).

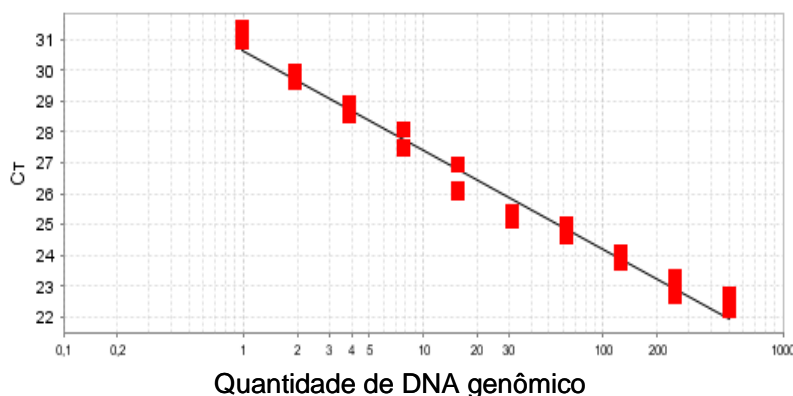
Figura 37 - Curva de dissociação do gene IS1533 da PCR em tempo real mostrando um único ponto de temperatura de dissociação de 75,9°C



4.6.1c - Curva padrão da sequência de inserção IS1533

A curva de dissociação da sequência de inserção IS1533 foi estabelecida com a diluição seriada do DNA genômico da sorovariedade Lai utilizada como o controle da reação. Foram identificados valores de Ct que variaram de 22 a 31, como mostrado na Figura 38.

Figura 38 - Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie *L. interrogans* com os iniciadores (*primers*) da região *secy*



No gráfico estão indicados os valores de Ct em relação às diluições seriadas do DNA genômico.

A validação da curva padrão para o gene endógeno *secy* foi analisada quanto aos valores de eficiência da reação, valor de *slope* (inclinação da reta indicando eficiência de amplificação) e valor de R^2 . Nesta curva padrão os resultados encontrados referentes à eficiência da reação (104,6%), valor de *slope* (-3,215) e $R^2(0,979)$.

4.6.3 Quantificação relativa do número de cópias das sequências de inserção IS1533 em *Leptospira spp*

Para realizar a quantificação relativa do número de cópias das amostras do estudo inicialmente foram obtidos os valores de Ct da reação de amplificação mediante a aplicação da técnica de real time PCR. Com os resultados em triplicata das amostras avaliadas no estudo foram obtidos os valores de Ct. Na quantificação relativa do número de cópias foi selecionada a metodologia de Ct comparativo, na qual é calculada a

variação do Ct do gene alvo – gene endógeno (normalizador), o valor de $\Delta\Delta Ct$ e em seguida foi efetuado o cálculo de quantidade relativa com a aplicação da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A partir dos resultados dos valores relativos das triplicatas calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi calculada a média (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de quantificação relativa e absoluta de IS1533 em *Leptospira spp*

Cepas de <i>Leptospira</i>	Gene	Média Ct	SD Ct	deltaCt SD	delta Ct	deltadeltaCt	2 ^{^deltadeltaCt}	Número de cópias
Bolivia	IS1533	25,726793	0,049935	0,192751	3,539529	1,68000	4,04597955	24,2758
Copenhagueni	IS1533	22,1872634	0,1226192	0,1418981	0	0	1	1
Hardjo(OMS)	IS1533	21,8794307	0,0676425	0,1241282	-0,3078327	1,227109909	2,8563854	8,71580
Norma(CTG)	IS1533	21,7971191	0,0939018	0,15647394	-0,3901443	0,700323105	1,4526342	17,1383
HB	IS1533	23,7434120	0,2748959	0,3501340	1,5561485	0,713933945	0,7888899	4,73333
Lagoa	IS1533	22,861251	0,0591072	0,0795818	0,6739883	0,969415665	2,5928357	15,55701
Pomona	IS1533	21,73593	0,0690079	0,0911748	-0,4513320	-0,107841492	0,83024078	4,98144
Sejroe	IS1533	22,127157	0,1492228	0,1519651	-0,0601062	2,099370956	1,8518234	11,11094
Wolffi	IS1533	22,74475	0,2377005	0,2909959	0,557493	1,692554474	2,2655346	13,59320
Lai	IS1533	24,232961	0,0391139	0,3663198	2,045698	1,144641876	1,0121624	6,072974

4.6.4 Quantificação absoluta do número de cópias de IS1533 de *Leptospira spp*

Para realizar a estimativa do valor absoluto do número de cópias da IS1533 foi aplicada a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor do número de cópias utilizado foi selecionado de dados da literatura e em relação à IS1533 foi utilizada a sorovariedade Lai como cepa controle da reação. Assim, foi aplicada a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no cálculo do valor absoluto do número de cópias. Para o estabelecimento do número de cópias distribuídas nas cepas deste estudo, inicialmente foram realizadas análises *in silico* para a avaliação do número

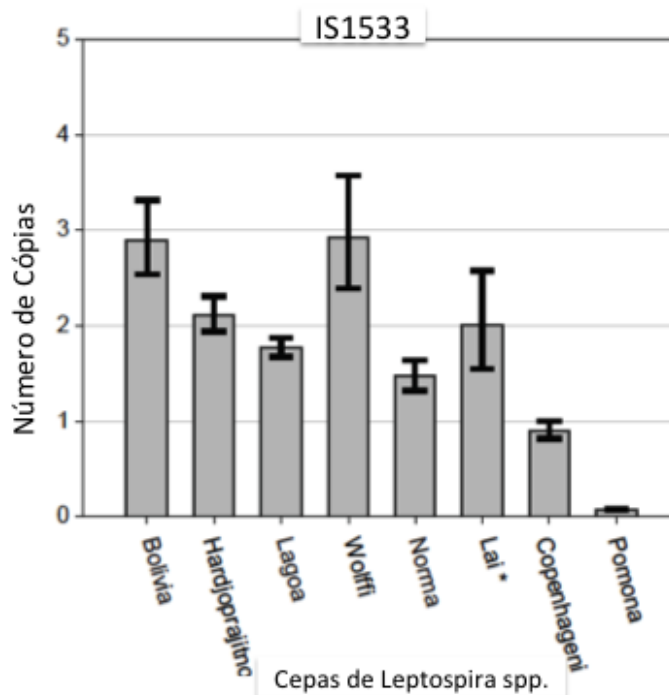
de sequências completas de IS1533 com similaridade de 100% com os iniciadores (*primers*) selecionados para os estudo *in vitro*. Assim, análises realizadas com aplicação do algoritmo Blastn indicaram a presença de uma cópia completa na sorovariedade Copenhagueni, classificada na espécie *Leptospira interrogans*.

Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* mostraram número reduzido do elemento móvel IS1533 em cepas bacterianas classificadas nos sorogrupos Sejroe e Icterohaemorrhagiae. Os valores obtidos para as cepas isoladas Lagoa, Bolívia e Norma apresentaram-se entre 1,6 e 2,3, os quais não foram muito divergentes

quando comparados com as cepas de referência classificadas na espécie *L.interrogans*. Infelizmente, não foi o estabelecimento do número de cópias da cepa classificada na espécie *L.borgpetersenii* sorovariedade Hardjo-Bovis, visto que o número excessivo destes elementos móveis gerou resultados inespecíficos no processo de amplificação do material genômico. Grande número destes elementos com 95% de similaridade com os iniciadores utilizados

para a amplificação geraram resultados inadequados para a comparação, visto que o objetivo era a observação da validação dos estudos *in silico* com as análises *in vitro* e os iniciadores foram desenhados visando a amplificação das cepas classificadas em ambas as espécies *L.interrogans* e *L.borgpetersenii* como ilustrado na Figura 39.

Figura 39 - Análise de variância (ANOVA *–one way*) dos valores de ΔC_t do gene normalizador (*secy*) e gene alvo (IS1533) das sorovariedades do gênero *Leptospira spp*



A análise de varância dos valores médios de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das sorovariedades pomona, Hardjo cepa Hardjo (OMS), sorovariedade Lai, sorovariedade Hardjo cepa Lagoa, sorovariedade Copenhageni, cepa Bolívia, cepa HB (genótipo hardjobovis), sorovariedade wolffi, sorovariedade Hardjo (Norma –CTG).

A representação gráfica da distribuição do elementos móvel IS1533 está demonstrada na figura 39. O número absoluto do número de cópias de IS1533 apresenta relevância quando observamos as cepas classificadas no sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovariedade Pomona, Lai e Copenhageni. O isolado Norma mostra-se semelhante às cepas de referência OMS e Lagoa., enquanto o isolado Bolívia apresenta-se semelhante a sorovariedade Wolffi também classificada no sorogrupo Sejroe.

4.6.5 Sequência de inserção IS1500

4.6.5.1 Amplificação do gene endógeno *secy*

O cálculo da estimativa do número de cópias do elemento móvel IS1500 foi realizado inicialmente com a padronização da curva padrão da sorovariedade Lai utilizada como controle de amplificação do iniciador IS1500 e estabelecimento dos valores de Ct. Foram realizadas diluições seriadas do DNA genômico a partir da quantidade de 500 ng do DNA total na proporção de 1:1.

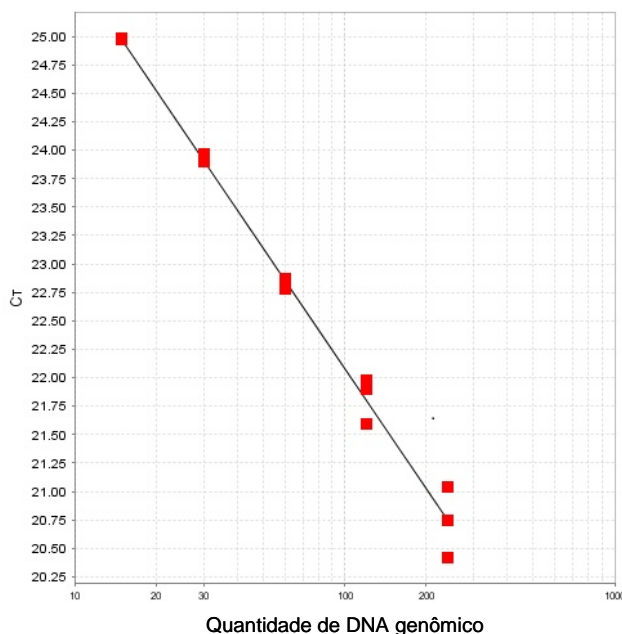
4.6.5.2 Curva padrão do gene endógeno *secy*

A curva padrão estabelecida com a diluições seriadas do DNA genômico da

sorovarietade Lai (controle) a partir da quantidade de 350 ng permitiu a determinação dos valores de Ct que

apresentaram variação de 20 a 25, conforme indicado na Figura 40.

Figura 40 - Curva padrão da sorovarietade Lai, espécie *L. interrogans* com os iniciadores (*primers*) da região *secy*



No gráfico estão indicados os valores de Ct em relação às diluições seriadas do DNA genômico.

A validação da curva padrão para o gene alvo IS1500 foi analisada quanto aos valores de eficiência da reação, valor de slope (inclinação da reta indicando eficiência de amplificação) e valor de R^2 . Nesta curva padrão os resultados encontrados referentes à eficiência da reação (107,2%), valor de *slope* (-3,161) e

$R^2(0,996)$. A partir dos valores obtidos com a cepa controle foram realizadas as amplificações em triplicatas das cepas isoladas e cepas de referência descritas na tabela 10. Os valores de Ct foram utilizados para o cálculo de ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$, mostrados na Tabela 5.

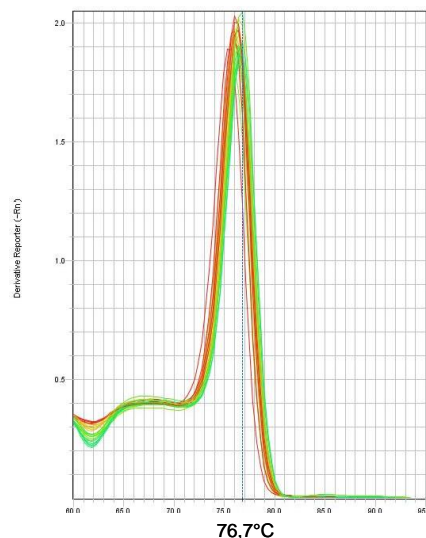
Tabela 5 - Valores de quantificação relativa e absoluta de IS1500 em *Leptospira spp*

Cepas de <i>Leptospira</i>	Gene	Média Ct	SD Ct	deltaCt SD	Delta Ct	Deltadelta Ct	2 [^] deltadeltaCt	Número de cópias
Bolivia	IS1500	23,884643	0,0727199	0,0827517	2,5995540	1,999048233	4,04597955	24,2758
Copenhageni	IS1500	21,285089	0,2396263	0,3311314	0	-0,017440796	1	6
Hardjo(OMS)	IS1500	20,675079	0,1237552	0,1689937	-0,6100101	1,496749878	2,8563854	8,71580
Norma(CTG)	IS1500	21,095544	0,0516416	0,0577764	-0,1895446	0,521230698	1,4526342	17,1383
HB	IS1500	23,412624	0,6053271	0,6054425	2,1275348	-0,359544754	0,7888899	4,73333
Lagoa	IS1500	21,331163	0,0614248	0,1597318	0,0460739	1,357089996	2,5928357	15,55701
Pomona	IS1500	19,340366	0,7505227	0,7510401	-1,9447231	-0,285839081	0,83024078	4,98144
Sejroe	IS1500	23,212120	0,0869398	0,6899976	1,9270305	0,871505737	1,8518234	11,11094
Wolffi	IS1500	22,47332	0,0765612	0,1042068	1,1882324	1,162410736	2,2655346	13,59320
Lai	IS1500	24,512205	0,2069295	0,2465989	3,2271156	0	1,0121624	6,072974

4.6.5.3 Amplificação da sequência de inserção IS1500

Para o cálculo da estimativa do número de cópias da IS1500 foi realizada inicialmente a diluição seriada na proporção de 1:1 do DNA genômico a partir da quantidade de 700 ng de DNA genômico total da sorovariedade Lai. A amplificação específica do elemento móvel IS1500 foi confirmada com a identificação da curva de temperatura de anelamento do iniciador com o DNA controle analisado com temperatura de *melting* (T_m) como mostrado na Figura 41.

Figura 41 - Curva de dissociação da região IS1500 da PCR em tempo real mostrando um único ponto de temperatura de dissociação de 76,7°C

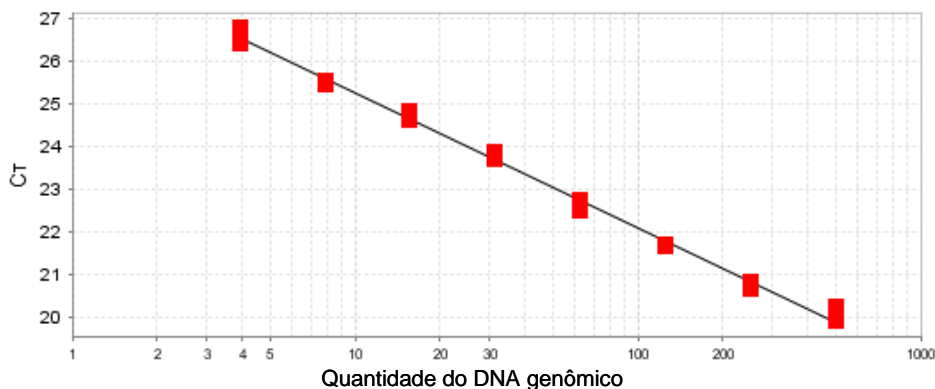


4.6.5.4 Curva padrão da sequência de inserção IS1500

A curva padrão da sequência de inserção IS1533 foi estabelecida com a diluição seriada do DNA genômico da sorovariedade pomona utilizada como o controle da reação. Foram identificados

valores de Ct que variaram de 20 a 27, como mostrado na Figura 42.

Figura 42 - Curva padrão da sorovariedade Lai, espécie *L. interrogans* com os iniciadores (*primers*) da região *secy*



No gráfico estão indicados os valores de Ct em relação às diluições seriadas do DNA genômico.

4.6.5.5 Quantificação relativa do número de cópias das seqüências de inserção IS1500 em *Leptospira spp*

Para realizar a quantificação relativa do número de cópias das amostras do estudo inicialmente foram obtidos os valores de Ct da reação de amplificação mediante a aplicação da técnica de real time PCR. Com os resultados em triplicata das amostras avaliadas no estudo foram obtidos os valores de Ct. Na quantificação relativa do número de cópias foi selecionada a metodologia de Ct comparativo, na qual é calculada a variação do Ct do gene alvo – gene endógeno (normalizador), o valor de $\Delta\Delta Ct$ e em seguida foi efetuado o cálculo de quantidade relativa com a aplicação da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.6.5.6 Quantificação absoluta do número de cópias de IS1500 de *Leptospira spp*

Para realizar a estimativa do valor absoluto do número de cópias da IS1500 foi aplicada a equação (Número de cópias) $\times 2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor do número de cópias utilizado foi selecionado de dados da literatura e em relação à IS1500 foi utilizada a sorovariedade Lai como cepa controle da reação. Assim, foi aplicada a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no cálculo do valor absoluto do número de cópias. Para o estabelecimento da quantificação absoluta do número de cópias das cepas do estudo foi selecionada a cepa Lai, na qual foi avaliada a distribuição das seqüências dos iniciadores em todo o genoma desta bactéria. Para a avaliação foi aplicado o algoritmo Blastn e identificação do número de seqüências completas dos iniciadores para validação dos estudos *in*

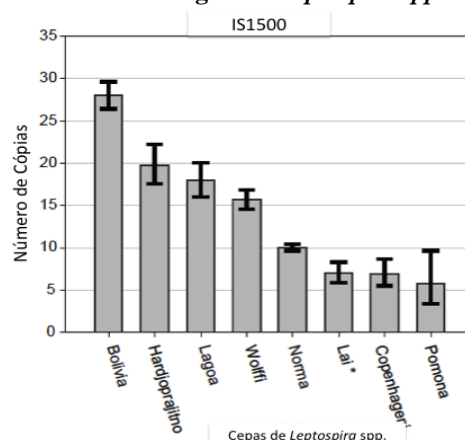
in vitro conduzidos com as cepas isoladas e de referência.

Os resultados encontrados para as cepas bacterianas classificadas no sorogrupo Sejroe (Norma, Lagoa, OMS e Wolffi) demonstraram elevado número de cópias de IS1500 quando comparadas aos resultados observados para as cepas classificadas no sorogrupo Icterohaemorrhagiae, dentre elas, sorovariedades Lai, Copenhageni e Pomona. As diferenças encontradas entre os valores absolutos do número de cópias entre os isolados regionais Lagoa, Bolívia e Norma foram de aproximadamente de 16 cópias, 24 cópias e 9 cópias, respectivamente. Interessante observar que a cepa classificada na sorovariedade Wolffi apresentou o número de 13 cópias, semelhante ao isolado Lagoa.

No sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* os números encontrados de sequências completas de elementos móveis classificados como IS1500 foram significativamente menores, dentre os quais as cepas Lai e Copenhageni apresentaram números idênticos de cópias de IS1500, totalizando seis cópias, enquanto a cepa classificada na sorovariedade Pomona apresentou aproximadamente cinco cópias de IS1500 distribuídas no genoma. A representação gráfica abaixo (Figura 43) ilustra diferenças significantes entre as cepas isoladas no Estado de Minas Gerais. As cepas Lagoa e Bolívia, isoladas em um mesmo surto de leptospirose apresentaram resultados mais similares quando comparadas com a cepa Norma obtida em um isolamento distinto.

Figura 43 - Análise de variância (ANOVA – one way) dos valores de ΔCt do gene

normalizador (*secy*) e gene alvo (IS1500) das sorovariedades do gênero *Leptospira* spp



A análise de variância dos valores médios de 2 ($^{-\Delta Ct}$) das sorovariedades pomona, Hardjo cepa Hardjo (OMS), sorovariedade Lai, sorovariedade Hardjo cepa Lagoa, sorovariedade Copenhageni, cepa Bolívia, cepa HB (genótipo hardjobovis), sorovariedade wolffi, sorovariedade Hardjo (Norma –CTG).

A representação gráfica dos resultados ilustra diferenças significantes entre as cepas isoladas no Estado de Minas Gerais. As cepas Lagoa e Bolívia, isoladas em um mesmo surto de leptospirose apresentaram resultados mais similares quando comparadas com a cepa Norma obtida em um isolamento distinto.

4.7 APLICAÇÃO DO ESTUDO MOLECULAR EM CEPAS DE LEPTOSPIRA SPP

Os estudos de biologia molecular em procariotos tem contribuído para a identificação e caracterização de microrganismos, permitindo avaliar mecanismos de infecção de agentes

infecciosos. As análises moleculares do genoma de procariotos tem apresentado significativa aplicação na pesquisa de marcadores genéticos para o diagnóstico de doenças infecciosas.

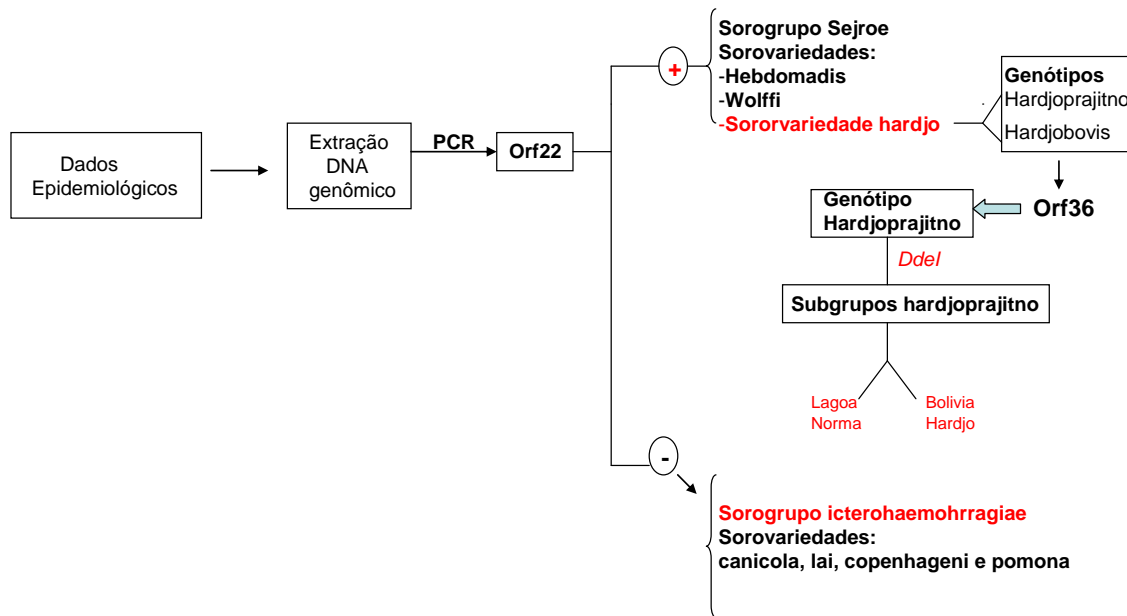
Neste estudo a seleção de regiões codificadoras de proteínas antigênicas foi realizada com o propósito de confirmação da classificação taxonômica de cepas de referencia de *Leptospira spp* e identificação de isolados do genero *Leptospira* com o objetivo de sugerir marcadores genéticos para a identificação de espécies, sorogrupos e genótipos do genero *Leptospira*. Estudos prévios de leptospirose demonstraram o uso de marcadores genéticos selecionados a partir de lipoproteínas conservadas para a identificação e caracterização de cepas de *Leptospira spp*.

Nos resultados obtidos neste trabalho com base nas análises de genes componentes do locus rfb foi possível confirmar que determinadas regiões genômicas apresentam correlação direta com perfis sorológicos dos isolados classificados no sorogrupo sejroe, espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Os resultados obtidos com o gene Orf22 possibilitaram identificar homologia da região somente em sorovariedades classificadas no sorogrupo sejroe, agrupando cepas com características sorológicas similares, permanecendo possível a diferenciação em sorovariedade e espécie genômica.

O locus rfb representa uma região genômica de grande valor no estudo e na comparação dos genótipos hardjorpajitno e hardjobovis, classificados nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, respectivamente. Na análise *in silico* das sequências nucleotídicas da região as regiões intergênicas próximas a determinados genes mostram que as diferenças de composição da região não está restrita a determinados genes, mas é uma característica possível de identificação em regiões distintas envolvidas na biossíntese do antígeno-O.

No estudo do locus rfb foi confirmado que o gene Orf36 descrito somente no geótipo hardjoprajitno, espécie *L. interrogans* encontra-se somente em isolados classificados neste genótipo. A presença desta região genômica somente no genótipo hardjoprajitno permite sugerir esta região genômica como marcador genético para a identificação e diagnóstico da leptospirose bovina. A associação da reação em cadeia de polimerase (PCR) com o uso de enzimas de restrição para clivagem de regiões específicas do DNA podem colaborar na identificação específica de cepas mais frequentes envolvidas na leptospirose bovina. O estudo "*in silico*" das sequências nucleotídicas obtidas com os iniciadores da região Orf36 mostraram que existe a possibilidade de diferenciação de isolados classificados no mesmo genótipo do gênero *Leptospira* (Figura 44).

Figura 44 - Representação esquemática de identificação de isolados do gênero *Leptospira* com aplicação de genes Orf22 e Orf36 localizados no locus rfb da sorovariedade Hardjo, genótipo hardjoprajitno, espécie *L.interrogans*



4.8 PIROSEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DO GENOMA DA CEPA NORMA

O sequenciamento completo do genoma da espécie *Leptospira interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno cepa Norma foi realizado a partir de 5 ng de DNA genômico com integridade previamente analisada. O sequenciamento foi realizado de acordo com o descrito no item 3.12.1 com uso de reagentes da série Titânio (GS-FLX Titânium Series Reagents) e o equipamento 454. Foram realizadas duas metodologias de sequenciamento sendo a primeira descrita como *shotgun* e a segunda conhecida como *Paired-end Tags*. Na metodologia de *shotgun* foi identificado um total de 603.466 reads, totalizando 240.390.839 bases, já na análise de *paired-end* foram identificadas

581.843 reads contendo extremidades dos fragmentos, totalizando, após a extração do adaptador, 911.237 reads e 193.364.067 bases.

A Figura 45 mostra a distribuição de *reads* por tamanho referente ao sequenciamento da cepa Norma. Os perfis obtidos são similares aos descritos pelo fabricante com maior distribuição equilibrada das sequências com tamanho médio de 400 bases.

As sequências obtidas foram submetidas ao programa Newbler (454 Life/Science / Roche) para montagem preliminar e realizada em conjunto com a aplicação dos programas FGAP e Jcontigsort (Piro et al., 2014) para adequada montagem dos dois cromossomos. A montagem final do genoma mostrou que os dois cromossomos da cepa Norma foram completamente sequenciados,

sendo que o cromossomo I montado apresenta um total de 4.406.719 bp e os segundo cromossomo apresenta 355. 432 bp.

Em resumo, as análises realizadas indicam que o sequenciamento realizado foi suficiente para obtermos o genoma completo da cepa Norma, uma vez que as *reads* obtidas cobrem 100% da sequência do genoma das sorovarietades Lai e

Copenhageni, classificadas na espécie *Leptospira interrogans* (Figura 45).

A montagem final do genoma mostrou que os dois cromossomos da cepa Norma foram completamente sequenciados, sendo que o cromossomo I montado apresenta um total de 4.406.719 bp e os segundo cromossomo apresenta 355. 432 bp e a figura 46 ilustra a circularização e distribuição de CDS e demais constituintes do genoma, como indicado na Figura 46.

Figura 45 - Distribuição das sequências geradas no sequenciador 454 por tamanho em bases

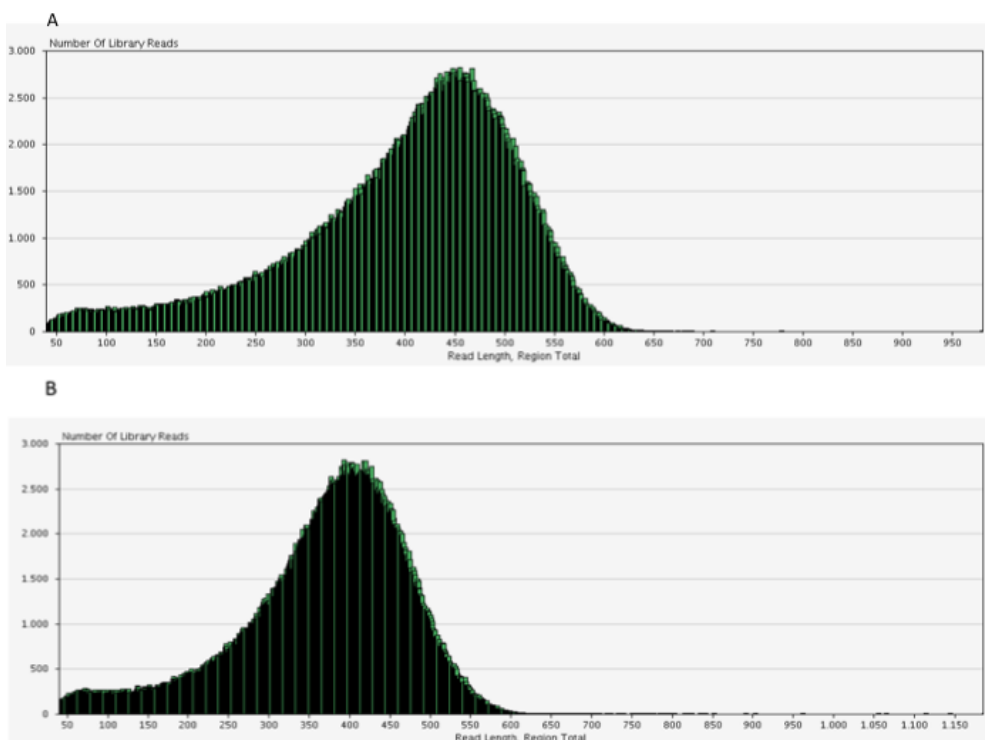
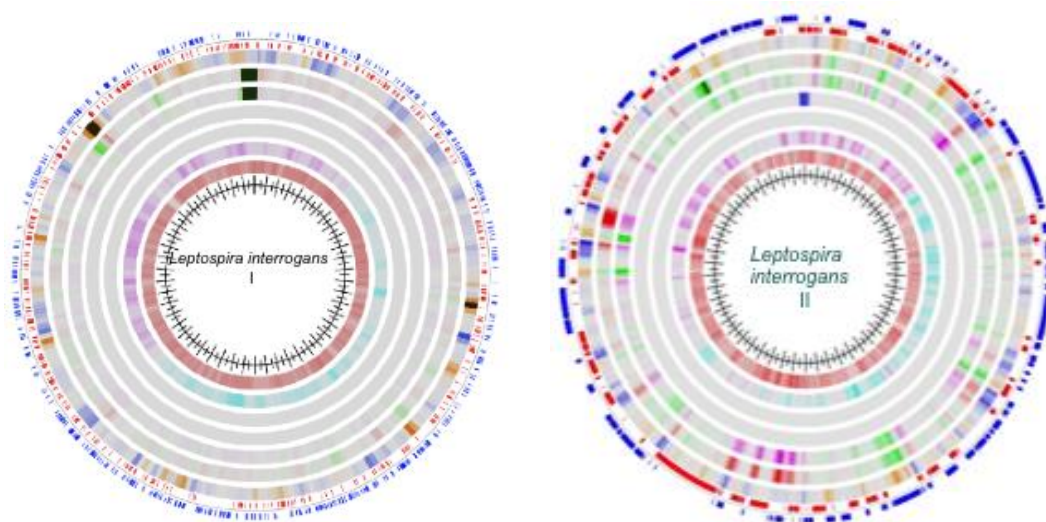


Figura 46 - Montagem dos cromossomos (I e II) referentes à sequência completa do genoma da espécie *L. interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno



A figura 45 é uma composição de imagens geradas como resultados do sequenciador 454 e referem-se às duas regiões da placa em que foram realizadas as duas metodologias do sequenciamento (A) *shotgun* e (B) *paired – end*. Os gráficos mostram os tamanhos das sequências (em bases) no eixo X e o número de sequências (*reads*) no eixo Y

As figuras ilustram, em vermelho, a distribuição de CDS (regiões codificadoras do genoma) anotadas como hipotéticas ou preditas, em azul estão representadas as CDS com função estabelecida, em verde as sequências de tRNA e em azul claro em região central da figura os genes rRNA ribossomal.

4.9 IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DOS ISOLADOS DE *LEPTOSPIRA SPP*

Na classificação taxonômica atual são reconhecidas aproximadamente 300

sorovariedades distribuídas em 24 sorogrupos de leptospiros. A identificação de isolados deste gênero diverge de demais gêneros bacterianos, utilizando análises sorológicas e genômicas para a determinação filogenética (Faine et al., 1999). A aplicação de grupos de anticorpos monoclonais para a identificação de sorovariedades é indicada como a metodologia mais eficaz na diferenciação de cepas com características fenotípicas idênticas (trabalho sorológico). O conhecimento do sorogrupo e sorovariedade de isolados do gênero são realizados com a utilização de métodos como MAT e anticorpos monoclonais, respectivamente (Faine et al., 1999).

Nesta etapa do trabalho, selecionamos os anticorpos monoclonais de acordo com características epidemiológicas da região como hospedeiro do isolado e histórico de isolamentos de leptospiros de determinada região geográfica. As

soroviedades Hardjo e Mini foram descritas no estado de Minas Gerais obtidas a partir da espécie bovina (Moreira, 1994). A partir destas informações dois anticorpos selecionados para o sorogrupo Sejroe e específicos para as soroviedades Hardjo e mini foram aplicados neste estudo.

As análises sorológicas indicaram que os isolados Lagoa e Bolívia pertencem ao sorogrupo Sejroe soroviedade Hardjo. É importante ressaltar que em inquéritos epidemiológicos em Minas Gerais a soroviedade prevalente corresponde à soroviedade Hardjo. Distintos estados brasileiros como São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Paraná apresentam o mesmo perfil epidemiológico. Países com grandes rebanhos bovinos como Estados Unidos e Austrália descrevem a participação da soroviedade Hardjo no desenvolvimento da doença.

4.10 IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE LEPTOSPIRA SPP

A identidade de microrganismos bacterianos está diretamente associada às sequências codificadoras para o 16S rRNA ribossomal. A região ribossomal é indicada para o reconhecimento ao nível de espécie de grande número de gêneros bacterianos, incluindo o gênero *Leptospira spp.*

Nesta etapa do trabalho, construímos *primers* para a região 16S rRNA ribossomal com o objetivo de amplificação e sequenciamento de 1350 bp dos isolados Lagoa e Bolívia e nove cepas de referência desta família bacteriana.

No estudo das homologies das sequências nucleotídicas obtidas dos

isolados Lagoa e Bolívia, observamos 100% de identidade do isolados com sequência da espécie *L. interrogans*, soroviedade Sejroe genótipo hardjoprajitno disponível no GenBank e 99% de homologia com diferentes soroviedades classificadas na mesma espécie.

Ao considerarmos cepas L550 e JB197, classificadas na soroviedade hadjo, genótipo hardjobovis e espécie *L. borgpetersenii* o percentual de homologia com o genótipo hardjoprajitno reduz e é encontrado um valor de 97% de identidade entre as sequências. A partir dessas análises é possível concluir que em leptospiros a região 16S rRNA ribossomal é responsável por atribuir características de espécie a este gênero bacteriano, assim como nos demais gêneros bacterianos. Estudos prévios com cepas de leptospiros, utilizando a região 16S rRNA ribossomal para a identificação de cepas bacterianas demonstraram que a capacidade de discernimento da região atinge o grau de espécie (Ahmed et al., 2006 Gonçalves et al., 2010).

4.11 ANÁLISE COMPARATIVA DE ISOLADOS DO GÊNERO LEPTOSPIRA

O sequenciamento completo de duas espécies patogênicas do gênero *Leptospira spp* possibilitou o estudo de diferentes regiões genéticas que compõem o genoma de leptospiros. Com base nestes dados, inicialmente foram escolhidas três regiões antigênicas, incluindo genes *Loa22*, *LigB* e locus *rfb*.

No grupo dos genes que codificam para proteínas com características imunogênicas encontra-se o gene *Loa 22*.

Estudos prévios confirmaram o elevado nível de expressão desta proteína no processo infeccioso da leptospirose (Ristow et al., 2001).

O gene *Loa22* não havia sido utilizado em estudos taxonômicos de identificação de cepas de *Leptospira spp.* Neste estudo foi demonstrado que as espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* apresentam polimorfismos na sequência de nucleotídeos referente ao gene *Loa 22*. Um sítio de restrição diferencial para a enzima de restrição *HindIII* foi identificado em sorovariedades da espécie *L. interrogans*, enquanto nas sorovariedades classificadas na espécie *L. borgpetersenii* não foi identificado o sítio de restrição para esta enzima, indicando assim que esta região do genoma pode ter aplicação para a identificação e caracterização de isolados do gênero *Leptospira spp.*

Em busca de genes ainda associados com virulência no gênero *Leptospira spp* identificamos o gene *LigB* que apresenta em sua estrutura domínios de imunoglobulinas foi descrito em todas as espécies patogênicas de leptospirosas e aplicado na tipificação de isolados do gênero *Leptospira spp* (Mc Bride et al., 2009). Estudos “*in silico*” da sequência de nucleotídeos do gene *LigB* possibilitaram a identificação de região polimórfica correspondente à porção C-terminal da sequência nucleotídica traduzida. No alinhamento das sequências nucleotídicas de cepas sequenciadas e de sequências depositadas no banco de dados (GenBank) foram verificados polimorfismos entre as sorovariedades *Lai* e *Copenhageni*, cepas classificadas na sorovariedade *pomona* e um perfil homogêneo entre as sequências de nucleotídeos da sorovariedade *hardjo*, assim

foi possível diferenciar cepas de diferentes sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans*.

Tradicionalmente, a classificação taxonômica do gênero *Leptospira spp* em nível de sorovariedade é realizada com aplicação de metodologia sorológica. Nesta etapa do estudo verificou-se que a identificação dos isolados do gênero *Leptospira spp* pode ser realizada com análises moleculares dos microrganismos. A terceira região antigênica selecionada para o estudo comparativo de isolados do gênero *Leptospira* foi o locus *rfb*.

Na sorovariedade *Hardjo* a região codificadora do antígeno-O é identificada como ORF14-WZY (Kalambaheti et al., 1999). Neste estudo verificamos a amplificação da região ORF14 em cepas da sorovariedade *Hardjo* e nos isolados *Lagoa* e *Bolívia*. No estudo das sequências de nucleotídeos dos isolados *Lagoa* e *Bolívia* foi identificada 99% de identidade com a sorovariedade *Hebdomadis*, *Wolffi*, e em seguida na sorovariedade *Hardjo* genótipo *hardjobovis*. A similaridade entre cepas da sorovariedade *Hardjo* já havia sido relatada, por isso já era esperada, porém foi observado que a região codificadora da ORF14 conserva características de espécie. Identificamos elevada identidade do genótipo *hardjoprajitno* com a sorovariedade *Hebdomadis*, classificada na espécie *L. interrogans*. Por outro lado, estudos prévios descreveram que a ORF14 do genótipo *hardjoprajitno* foi adquirido do genótipo *hardjobovis* (De La Pena-Moctezuma et al., 1999).

O locus *rfb* na sorovariedade *Hardjo* genótipo *hardjoprajitno* foi comparado e diferenças na organização e

número de regiões codificantes foram identificadas, como por exemplo, a ORF36 localizada entre as ORFs 3 e 4 (De La Peña-Moctezuma et al., 1999).

A identificação de homologia da sequência nucleotídica relativa à Orf22 entre sorovariedades classificadas no sorogrupo Sejroe indica que esta região provavelmente não tem participação direta na característica fenotípica da sorovariedade Hardjo, contrário ao descrito pelo autor DeLa Peña-Moctezuma et al. (1999). Por outro lado, estes dados corroboram com estudos prévios descritos por Kwentz et al. (1993), em que a partir do sorogrupo Hebdomadis diferentes subgrupos autônomos foram descritos, dentre eles, o sorogrupo Sejroe e Mini. Desta forma os isolados com idêntica classificação sorológica apresentam elevado grau de similaridade na análise de regiões componentes do locus *rfb* relacionadas com a biossíntese do antígeno-O.

A análise de homologia das sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa e Bolívia, sorovariedade hardjo, espécie *L. interrogans* demonstrou elevada homologia com as sorovariedades hebdomadis e wolffi, seguido pelo genótipo hardjobovis, espécie *L. borgpetersenii* (Kmentz et al., 1993). O gene Orf22 mostrou-se específico na identificação de sorovariedades classificadas no sorogrupo sejroe, sugerindo que a região apresenta elevado potencial para a identificação de bactérias classificadas no sorogrupo sejroe.

No locus *rfb* a região o gene Orf22 é responsável por codificar glycosiltransferase assim como outros genes que participam da biossíntese do antígeno-O. Análises utilizando as ferramentas Blast X e PSI-Blast indicaram homologia com o

domínio conservado referente à proteína *ExoA*, um expopolissacarídeo envolvido na síntese de biofilme. A identificação de homologia com diferentes regiões proteicas de uma proteína codificada por um único sorogrupo pode inferir características de adaptação ao meio ambiente e hospedeiro de sorovariedades classificadas no sorogrupo sejroe.

Estudos prévios indicam que os expopolissacarídeos participam na manutenção do agente bacteriano no meio ambiente. Regiões codificantes de proteínas de virulência no gênero *Leptospira* apresentaram capacidade de formação de biofilme, sendo assim diferentes regiões codificantes de proteínas antigênicas podem apresentar propriedades diferenciais no mecanismo de virulência, incluindo a interação bactéria-hospedeiro e permanência no meio - ambiente.

No estudo do locus *rfb* a análise da ORF15 confirmou os relatos na literatura com identificação de elevada identidade da sequência nucleotídica com as sorovariedades Lai e Copenhageni (De La Peña-Moctezuma et al., 1999). No genoma bacteriano algumas propriedades e características de regiões codificadoras apresentam semelhanças independentes do gênero de estudo. O antígeno-O é reconhecido como importante região associada à virulência e antigenicidade em diversos patógenos. No estudo de identidade das sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa e bolívia verificou-se 99% de identidade com a sequência da sorovariedade hebdomadis, wolffi e genótipo hardjobovis. A elevada identidade nesta região do genoma teoricamente poderia significar similaridades de virulência e patogenicidade dos microrganismos, mas na sorovariedade

Hardjo os resultados demonstram que a alta homologia indica semelhanças de características “fenotípicas” sorológicas entre os isolados.

Em estudos prévios do locus rfb o gene Orf36 foi identificado somente no genótipo hardjoprajitno, espécie *L. interrogans* (De La Peña-Moctezuma et al., 1999). Na análise do banco de dados verificou-se que a Orf36 encontra-se localizada entre a Orf4 e Orf5 da região. Para a confirmação do genótipo dos isolados Lagoa e Bolívia e comparação com sorovarietades das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* a realização da PCR específica foi utilizada para a confirmação do genótipo hardjoprajitno. Este dado corrobora com estudos descritos por De La Peña-Moctezuma (1999). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a sugestão de utilização deste gene como marcador genético na identificação de isolados a partir de surtos de leptospirose na espécie bovina, possibilitando assim o real conhecimento epidemiológico da doença com redução de reações cruzadas verificadas em exames sorológicos.

Análises da ORF36 mostraram a formação de dois grupos do genótipo hardjoprajitno, sendo o primeiro formado por cepas Bolívia e Hardjo (OMS) e o segundo grupo formado por Norma e Lagoa.

Na tradução “*in silico*” da sequência de nucleotídeos da Orf36 do genótipo hardjoprajitno observou-se a presença de um domínio proteico conservado de homologia com Fe⁺² oxygenase. Dentre as regiões classificadas nesta família foi encontrado o gene Alkb, envolvido na formação de biofilmes em bactérias e presente no genoma da espécie

saprófita *Leptospira biflexa* (Barragan et al., 2011).

A identificação de genes originalmente identificados na cepa Norma permite sugerir a ocorrência transferência lateral de genes entre estes microrganismos e pode ser compreendida sob o aspecto de nicho ecológico do microrganismo. Em leptospirosas, as espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* possuem a capacidade de sobrevivência no ambiente por diferentes períodos de tempos, sendo que a espécie *L. interrogans* apresenta maior tolerância do que a espécie *L. borgpetersenii* (Bullach et al., 2006). A formação de biofilmes parece estar diretamente relacionada com a manutenção do agente no meio ambiente e, considerando a espécie *L. interrogans* esta propriedade pode estar relacionada com aquisição de genes originados da espécie saprófita *Leptospira biflexa*.

De acordo com Barragan et al. (2011), a adaptação ao ambiente pode sugerir a ocorrência de aquisição de genes relacionados ao metabolismo bacteriano. A adaptação ao meio ambiente corresponde a um fator diferencial entre as espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Relatos da literatura de Bulach et al. (2006) descreveram que a espécie *L. borgpetersenii* sofreu redução genômica de 700Kb em relação à espécie *L. interrogans* com perda de regiões genômicas envolvidas com o metabolismo bacteriano, assim é possível sugerir que o genótipo hardjoprajitno, classificado na espécie *L. interrogans* apresenta componentes genômicos de metabolismo bacteriano provavelmente ausentes no genótipo hardjobovis, classificado na espécie *L. borgpetersenii*.

A constituição do locus rfb do genótipo hardjoprajitno com regiões intercaladas da sorovariedade Copenhageni e do genótipo hardjobovis sugere que no aspecto evolutivo e na relação bactéria - hospedeiro parece ter sido favorável à sobrevivência do microrganismo. Na comparação com o genótipo hardjobovis, o genótipo hardjoprajitno parece ser menos adaptado à espécie bovina e corresponder ao genótipo mais patogênico da sorovariedade hardjo.

Na genotipagem de cepas bacterianas os elementos móveis têm sido descritos como importantes marcadores genéticos na caracterização e diferenciação de isolados bacterianos. No gênero *Leptospira* as sequências de inserção IS1533 e IS1500 estão presentes no genoma das espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* (Zuerner et al., 1995, Bulach et al., 2006). Curiosamente, as sequências nucleotídicas das cepas Lagoa e Norma-CTG apresentaram 99% de identidade com a sorovariedade Hardjo genótipo hardjobovis espécie *L. borgpetersenii*. Esta homologia inesperada sugeriu que as cepas Norma CTG e Lagoa poderiam ter adquirido o elemento móvel do genótipo hardjobovis. Tendo como referência o genoma completo da espécie *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo genótipo hardjobovis são descritas aproximadamente 25 cópias completas do elemento móvel IS1533 e grande número de cópias completas. A partir da associação de resultados obtidos com os relatos da literatura foi sugerido que as cepas Norma-CTG e Lagoa poderiam apresentar uma cópia completa do elemento móvel IS1533 no genoma.

Com o advento do sequenciamento completo da cepa bacteriana Norma,

classificada no genótipo hardjoprajitno foi possível confirmar a presença de um elemento com 1340 bp com identidade de 99% com a sequência nucleotídica referente ao elemento móvel IS1533. De acordo com os resultados obtidos com análises de bioinformática é sugerida a presença de vários elementos móveis com esta classificação dispersos no genoma.

Considerando que a presença do genótipo hardjoprajitno no Brasil possivelmente decorre de constante aquisição de animais e material genético reprodutivo é razoável aceitar a aquisição da sequência completa do elemento móvel IS1533 do genótipo hardjobovis. Por outro lado, analisando fatores epidemiológicos de confirmação do isolamento do agente em território nacional sabe-se que o genótipo hardjobovis não foi confirmado no Brasil. Diante do exposto, a sorovariedade que possui uma cópia completa no genoma do elemento IS1533 com isolamento confirmado no Brasil corresponde à espécie *L. interrogans* sorovariedade Copenhageni. Estudos prévios da sorovariedade hardjo, genótipo hardjobovis demonstraram elevada eficácia na diferenciação de cepas do gênero *Leptospira spp* mediante a análise de IS1533 (Zuerner et al., 1995. A diferenciação de isolados com base nas sequências de inserção não se limita à identificação do número de cópias do elemento móvel, mas sim inclui diferentes fatores como homologia de região do elemento móvel, localização do elemento no genoma dos microrganismos e efeitos secundários à transposição do elemento móvel, levando a alteração de transcrição de genes flanqueados por sequências de inserção.

Estudos prévios referentes a análises de determinação do número de

cópias do elemento móvel ISLin1 e organização cromossomal nas soroviedades Lai e Copenhageni demonstraram diferenças significativas entre os dois isolados classificados na espécie *L. interrogans* com direta correlação da presença do grande número de elementos móveis no genoma dos microrganismos com diferenças na organização estrutural dos cromossomos destes agentes bacterianos (Nascimento et al., 2004).

Na análise dos resultados obtidos na técnica de Real time PCR relativos à *sequência* de inserção IS1533 em cepas classificadas na soroviedade Hardjo genótipo hardjoprajitno foi identificado um grande número de cópias deste elemento móvel em isolados regionais e na cepa de referência Hardjo - OMS. Os valores absolutos encontrados para as soroviedades Lai e Copenhageni mostraram diferenças significativas entre as soroviedades classificadas na espécie *L. interrogans*. Estes dados sugerem que a aplicação da técnica de Real time-PCR associado à análise de Ct comparativo para a determinação do número de cópias entre cepas bacterianas pode ser válida na tipificação bacteriana.

Estudos prévios do genoma completo na soroviedade hardjo, genótipo Hardjobovis, descritos por Bulach et al. (2006), confirmaram com o sequenciamento completo do genoma das cepas L550 e JB197 a presença de 77 e 84 cópias completas de IS1533, mostrando diferenças entre cepas com idêntica classificação genômica. Aproximadamente 25 sequências parciais de cópias de IS1533 estão distribuídas no genoma promovendo a evidência de frequente transposição e

eventos de recombinação que alteram a organização genômica.

Estudos da sequência de inserção IS1500 realizados por Pacciarini et al. (1992), analisaram o elemento móvel em cepas classificadas na espécie *L. interrogans* soroviedades pomona e *icterohaemorrhagiae* e determinaram que a localização genômica deste elemento móvel está correlacionado relação com regiões do genoma que sofreram grandes rearranjos genômicos.

Com o objetivo de caracterizar isolados classificados na soroviedade Hardjo e diferentes soroviedades da espécie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* foi realizada a quantificação relativa e absoluta do número de cópias da sequência de inserção IS1500. Diferenças significativas foram identificadas entre as cepas do genótipo hardjoprajitno Nas soroviedades Lai e Copenhageni verificou-se idêntico número de cópias entre os isolados e estes dados corroboram com o descrito na literatura por Nascimento et al. (2004) que descreveram igual número de cópias do elemento móvel IS1500 para as duas soroviedades. O estudo da sequência de inserção IS1500 em cepas classificadas no subtipo Kennewicki pertencentes à soroviedade pomona possibilitou a identificação e caracterização de 15 grupos bacterianos classificados no gênero *Leptospira* (Zuerner et al., 1995).

A comparação dos resultados gerados na quantificação absoluta e relativa dos elementos móveis IS1500 e IS1533 mostra que o maior número de diferenças significativas em cepas classificadas na espécie *L. interrogans* foi identificado com a IS1500 diretamente relacionada com a

ocorrência de rearranjos genômicos nesta espécie genômica. Em estudos prévios de imunização de rebanho bovino com diferentes formulações vacinais contendo a cepa isolada Norma-CTG e a cepa de referência Hardjo (OMS) indicaram diferenças no controle da leptospirose bovina com resultados eficazes obtidos nas formulações contendo as duas cepas da sorovariedade Hardjo (Moreira, 1994).

No estudo atual a comparação das cepas Norma-CTG e Hardjo (OMS) revelou diferenças nas regiões Orf36, na quantificação do número de cópias da IS1500, análise de homologia da região IS1533 e provável formação de dois grupos com idêntica classificação taxonômica.

O estudo dos elementos móveis do genoma em *Leptospira* sugere que o número variável de sequências de inserção no genoma possa contribuir para promover diferenças em propriedades distintas nos mecanismos de virulência (interação hospedeiro-bactéria) e antigenicidade dos microrganismos, assim como já descrito em outros gêneros bacterianos, como, por exemplo, em *Streptococcus sp* (Spelleberg et al., 2000), *Staphilococcus sp* (Koskela et al., 2009) e em *Vibrio cholerae* (Dumontier et al., 1998).

A análise genética comparativa parcial de sorovariedades classificadas nas espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* permitiu identificar regiões genômicas com elevado potencial como marcador genético no diagnóstico diferencial na leptospirose bovina. A redução das reações cruzadas no diagnóstico dessa patologia com o conhecimento real de cepas envolvidas no processo infeccioso em determinada região geográfica permite a

sugestão de iniciativas adequadas e pontuais para o controle da leptospirose bovina, como a formulação de vacinas regionais e implementação de medidas de controle e prevenção da leptospirose.

4.12 GENOMA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SOROGRUPO SEJROE SOROVARIETADE HARDJO GENÓTIPO HARDJOPRAJITNO

O sequenciamento completo e identificação de CDS revelou uma significativa diferença do repertório de genes responsáveis por composição do genoma de uma sorovariedade classificada na espécie *L. interrogans*, ainda que na comparação de cepas classificadas nesta espécie genômica estes microrganismos sejam específicos para diferentes hospedeiros. Os fatores relacionados com esta especificidade ainda não foram elucidados. Por outro lado, o estudo genômico do genótipo hardjoprajitno possibilitou a identificação de genes potencialmente envolvidos com características atribuídas especificamente às características fenotípicas responsáveis por atribuir um caráter diferencial aos isolados bacterianos classificados na sorovariedade Hardjo.

Por exemplo, o genoma da cepa Norma apresenta o sistema de biossíntese de proteínas *heme* homólogo a duas espécies genômicas, *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Por outro lado, igualmente a sorovariedades classificadas na espécie *L. interrogans*, possui a mesma distribuição de genes de hemolisinas e envolvidas no

processo de patogenia da doença. Além disso, possui em sua estrutura genômica as três proteínas intactas com domínios *immunoglobulin-like*, representando um diferencial quanto à identificação de genes relacionados à virulência do microrganismo.

Finalmente, os resultados da análise do pirosequenciamento do genoma da sorovariedade Hardjo genótipo hardjoprajitno, que exibe fenótipo virulento à espécie bovina são extremamente promissores para explicar geneticamente a estrutura de isolados bacterianos classificados na sorovariedade Hardjo. Nossos resultados indicam a presença de diferenças adicionais entre cepas classificados na espécie *L. interrogans*. Entre essas diferenças está a observação de genes adicionais envolvidos com o metabolismo bacteriano

5 CONCLUSÕES

A aplicação dos anticorpos monoclonais F106C9 e F16C28 permitiu a identificação dos isolados Lagoa e Bolívia no sorogrupo Sejroe e sorovariedade Hardjo.

No estudo da região conservada 16S rRNA ribossomal foi possível confirmar a classificação das cepas Lagoa e Bolívia na espécie *L. interrogans*.

Na análise comparativa de cepas de *Leptospira* com o gene *Loa22* associada à enzima de restrição HindIII foi possível diferenciar as espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*.

Na análise de homologia das sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa e Bolívia obtidas com a amplificação da região do gene *LigB* mostrou que os

isolados apresentam elevada homologia com sorovariedades da espécie *L. interrogans*. Foi possível identificar diferenças entre as sorovariedades Lai, copenhageni e pomona, classificadas na espécie *L. interrogans*.

A análise das sequências de nucleotídeos dos isolados Lagoa e Bolívia referente ao gene Orf14 (WZY) foi possível identificar elevada identidade com sorovariedades hebdomadis e wolffi, classificadas na espécie *L. interrogans*.

No estudo do gene Orf15 (WZX) a homologia das sequências nucleotídicas das cepas Lagoa e Bolívia mostrou identidade elevada com a sorovariedade Copenhageni, espécie *L. interrogans*, confirmando a aquisição desta região do locus *rfb* desta sorovariedade.

A amplificação da PCR convencional referente ao gene Orf22 demonstrou que a presença desta região só é observada em cepas classificados no sorogrupo sejroe. As sequências nucleotídicas dos isolados Lagoa e Bolívia mostraram que a identidade da espécie é conservada nesta região do genoma, no qual as maiores identidades para as duas cepas isoladas foram encontradas com cepas classificados no sorogrupo sejroe, espécie *L. interrogans*.

A Orf36 mostrou elevado grau de especificidade na amplificação da PCR convencional. A região demonstrou elevado potencial para ser aplicado como marcador genético no diagnóstico de leptospirose bovina para a confirmação do genótipo hardjoprajitno, espécie *L. interrogans*.

O estudo comparativo dos isolados classificados no genótipo hardjoprajitno indicou que as sequências de nucleotídeos

referentes ao gene Orf36 possibilitaram o agrupamento e diferenciação de isolados. A cepa Lagoa apresentou maior homologia com a cepa Norma-CTG e a cepa Bolívia maior homologia com a cepa Hardjo (OMS).

A tradução “*in silico*” da sequência do gene Orf36 mostrou homologia com domínio conservado presente no gene Alk presente em diferentes grupos bacterianos e descrito no genoma da espécie saprófita *Leptospira biflexa*. A presença do gene Orf36 somente na espécie patogênica *L. interrogans*, genótipo hardjopravitno sugere a ocorrência de aquisição genética através do mecanismo de transferência lateral de genes.

No estudo de homologia da sequência nucleotídica do elemento móvel IS1533 da cepa Norma-CTG e Lagoa foi verificada a elevada identidade com a sequência da sorovariedade hardjo, genótipo hardjobovis. A evidência de transferência lateral foi confirmada com o sequenciamento completo da cepa Norma-CTG e identificação de alinhamento com tamanho de 1.340 bp, sendo que a sequência completa do elemento de inserção possui 2.100 bp.

Na quantificação relativa e absoluta do número de cópias da IS1533 foram identificadas diferenças significativas entre cepas da sorovariedade Hardjo (Bolívia e Hardjo-OMS), sorovariedades Lai e Copenhageni e número idêntico de cópias das cepas Norma-CTG e hardjobovis, classificadas nas espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, respectivamente.

A análise da quantificação relativa e absoluta da IS1500 mostrou diferenças significativas entre as cepas Norma-CTG e Hardjo-OMS, Lagoa e Bolívia, Bolívia e

Norma-CTG, Hardjo (OMS) e Norma-CTG. O número idêntico de número de cópias foi identificado para as sorovariedades Lai e Copenhageni, classificadas na espécie *L. interrogans*.

REFERÊNCIAS

AHMADIAN, A.; EHN, M.; HOBER, S. HOBER. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*. v.363, p.83-94, 2006.

AHMED, A. et al. Development and validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *PLoS ONE*, v. 4, n.9, 2009.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v.215, n.3, p. 403-410,1990.

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

APPLYED Biosystems. Disponível em <<http://www.appliedbiosystems.com>>. Julho/2005.

BARIL, C. et al. Scattering of the rRNA genes on the physical map of the circular chromosome of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *J. Bacteriol.*, v.174, p.7566–7571, 1992.

BARRAGAN, V. A. et al. Interactions of leptospira with environmental bacteria from surface water. *Curr. Microbiol.*, v.62, p.1802-1806, 2011.

- BULACH, D. M. et al. Functional analysis of genes in rfb locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo, subtype hardjovovis. *Infect. Immun.*, v.68, n.7, p.3793- 3798, 2000.
- BULACH, D. M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.103, n.39, p.14560–14565, 2006.
- CERQUEIRA, G. M. et al. Distribution of the Leptospiral immunoglobulinlike (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp and application of ligB to typing Leptospiral isolates. *J. Med. Microbiol.*, v.58, n.9, p.1173–1181, 2009.
- CHIARELI, D.; COSATE, M.R.V.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, J.A.; TEIXEIRA, J.F.B.; MARCELINO, A.P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.7, p.633-639, 2012.
- CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev.*, v.28, n.3, p.291–318, 2004.
- DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A.; BULACH, D. M.; KALAMBAHETI, T.; ADLER, B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovarHardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjovovis. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.177, p.319–326,1999.
- DORAK, M. T. Real Time PCR Special Issue. v.25. 2004.
- DROEGE, M.; HILL, B. The genome sequencer FLX system--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J. Biotechnol.*, v.136, n.2, p.3-10, 2008.
- DRYSELIUS, R.; IZUTSU, K.; HONDA, T.; LIDA, T. Differential replication dynamics for large and small *Vibrio* chromosomes affect gene dosage, expression and location. *BMC Genomics*, v.26, n.9, p.559, 2008.
- DUMONTIER, S.; TRIEU-CUOT, P.; BERCHE, P. Structural and functional characterization of IS1358 from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, v.23, p.6101-6106, 1998.
- DUTTA, C.; PAN, A. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J. Biosci.*, v.27, p.27-33. 2002.
- ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.*, n.26, p.45–51, 1965
- ELLIS, W. A.; O'BRIEN, J. J.; CASSELLS, J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Veterinary Record*, v.118, n.1, p.11-13, 1986.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. The veterinary

- clinics of North America. *Food Animal Practice*, v.10, p.463-478, 1994.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p.186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. *Genome Research*, n.8, p.175-185, 1998.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. *Leptospira and Leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: MedScience, 1999.
- FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamshi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.21, p.267-287, 1928.
- FUKUNAGA, M.; MIFUCHI, I. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. *J. Bacteriol.*, v.171, n.11, p.5763-5767, 1989.
- FULLWOOD, M. J. et al. Next-Generation DNA Sequencing of Paired-End Tags (PET) for Transcriptome and Genome Analyses. *Genome Research*, v.19, n.4, p.521-532, 2009.
- GONÇALVES, A. T. et al. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. *Int. J. Infect. Dis.*, v.14, n.3, p.148-153, 2010.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, n.8, p.195-202, 1998.
- GRAVEKAMP, C. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.*, n.139, p.1691-1700, 1993.
- HAAKE, D.A. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J. Bacteriol.* v.175, p. 4225-4234, 1993.
- HAAKE, D. A. et al. Molecular evolution and mosaicism of *Leptospira* outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J. Bacteriol.*, v.186, n.9, p.2818-2828, 2004.
- HATHAWAY, S. C.; LITTLE, T. W. A.; PRITCHARD, D. G. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. *Veterinary Record*, v.119, p. 84-86, 1986.
- HOEBEECK, J; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. Real-time quantitative PCR as an alternative to Southern blot or fluorescence in situ hybridization for detection of gene copy number changes. *Methods Mol. Biol.*, v.353, p.205-226, 2007.
- INADA, R., IDO, Y.; HOKI, R., KAKENO; R., ITO, H. The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*). *J. Exp. Med.*, n. 23, p.377-403, 1916.
- JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. Growth at low

- temperatures. *J. Bacteriol.*, n.94, p.27–31, 1967.
- KALAMBAHETI, T.; BULACH, D.M.; RAJAKUMAR, K.; ADLER, B. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthetic locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjovis. *Microb Pathog.*, v.27, n.2, p.105-117, 1999.
- KOIDL, C.; BOZIC, M.; BURMEISTER, A.; HESS, M., MARTH, E.; KESSLER, H. Detection and differentiation of *Bordetella* spp. by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.2, p.347–350, 2007.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.226, p. 215–219, 2003.
- KOSKELA, A.; NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A.; PERSSON, L.; SÖDERQUIST, B. Prevalence of the ica operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.28, n.9, p.655-60, 2009.
- KWENTY, E.; DIKKEN, H. Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, Netherlands, 1993.
- LAWRENCE, G.J.; HENDRIX, W.R.; CASJENS, S. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *Trends in Microbiology*. v.9, n.11, p.535 – 540, 2001.
- MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, n.3, p.725-774, 1998.
- MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, v.437, p.376-380, 2005.
- MATSUNAGA, J. et al. Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release. *Microbiology*. v.153, p.3390-3398, 2007.
- MC BRIDE, A. J. et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect. Genet. Evol.*, v. 9, n.2, p.196–205, 2009.
- MYERS, D. M.; JELAMBI, F. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Argentina. *Trop Geogr Med*, v.27, n.1, p. 63–70, 1975.
- MOREIRA, E. C. *Avaliação de métodos para a erradicação de leptospiroses em bovinos*. 91f. 1994. Tese. (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.
- MOREY, R. E. et al. Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n.10, p.3510–3516, 2006.
- NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and

- pathogenesis. *J. Bacteriol.*, v.186, n.7, p. 2164-2172, 2004.
- NCBI Data in XML. 1994. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/data_specs/NCBI_data_in_XML.html>. Acesso em: 2011.
- NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.33, p.10-13, 2004.
- OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, v.405, p.299-304, 2000.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Romanha. Low-Stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *J. Med. Microbiol.*, v. 52, n.2 127-135, 2003.
- PACCIARINI, M.L. et al. Repetitive sequences cloned from *Leptospira interrogans* serovar hardjo genotype hardjoprajitno and their application to serovar identification. v.30, n.5, p. 1243-1249, 1992.
- PASTER, B. J. et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.*, v.173, n.19, p.6101-6109, 1991.
- PEROLAT, P.; LECUYER, I.; POSTIC, D.; BARANTON, G. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignation. *Res. Microbiol.*, v.1, n.144, p. 5-15, 1993.
- PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One*, v.3, n.2, p.e1607, Feb. 2008.
- RAMADASS, P. et al. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.42, p.215-219, 1992.
- REN, S.; FU, G.; JIANG, X.; ZENG, R.; XIONG, H. et al. Unique and physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. *Nature*, v.422, n.6934, p.888-893, 2003.
- RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for *Leptospira* virulence. *PLoS Pathog*, v.3, n.7, p.e97, 2001.
- ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.50, n.4, p.1449-1455, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning*; a laboratory manual. 2nd edit. Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHMID-APPERT, M. et al. Association of newly discovered IS elements with the dichloromethane utilization genes of methylotrophic bacteria. *Microbiology*, v.143, n.8, p.2557-2567, 1997.
- [SHIN, H. J.](#) et al. Kinetics of binding of LPS to recombinant CD14, TLR4, and MD-2 proteins. *Mol. Cells*, v.24, n.1, p.119-124, 2007.

- SIGUIER, P.; [FILÉE, J.](#); [CHANDLER, M.](#) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 9, n.5, p.526-531, 2006.
- SPELLERBERG, B. et al. Identification of a novel insertion sequence element in *Streptococcus agalactiae*. *Gene*, v.241, n.1, p.51–56, 2000.
- STUART, R. D. Weil's disease in Glasgow sewer workers. *BMJ*. p. 324–326, 1939.
- SYVANEN, M. Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annu. Rev. Genet.*, v. 28, p. 237–261, 1994.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS DG. "The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research*, v. 25, n.24, p.4876–4882, 1997.
- TORRES, A.G, LI, Y, TUTT, C.B, XIN, L., EAVES-PYLES T. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infect Immun*, v. 74, n.5, p. 2676–2685, 2006.
- TOUCHON, M.; ROCHA, E. P. Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.*, v. 24, n.4, p. 969–981, 2007.
- WAKABAYASHI, G. et al. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. *FASEB J.*, v.5, n.3, p.338-343, 1991.
- WOESE, R. C. Bacterial evolution. *Microbiol Reviews*, v. 51, n.2, p.221-271, 1987.
- 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. Bacteriol.*, v. 37, p. 407–415, 1987.
- ZUERNER, R. L.; ELLIS, W. A.; BOLIN, C. A.; MONTGOMERY, J. M. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.3, p.578–583, 1993.
- ZUERNER, L. R.; ALT, D.; BOLIN, C. IS1533-Based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.12, p.3284-3289, 1995.