



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA (LaBV)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, MUNICÍPIO NITERÓI, BRASIL.**

**UTILIZAÇÃO DE *Galleria mellonella* COMO MODELO BIOLÓGICO
EM ESTUDO EXPERIMENTAL COM *Leptospira* spp.**

EDUARDA FARIA RAYMUNDO

RECIFE, 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

UTILIZAÇÃO DE *Galleria mellonella* COMO MODELO BIOLÓGICO
EM ESTUDO EXPERIMENTAL COM *Leptospira* spp.

EDUARDA FARIA RAYMUNDO

Relatório de Estágio Supervisionado
Obrigatório realizado como exigência parcial
para a obtenção do grau de Bacharela em
Medicina Veterinária, sob orientação da Prof^a
Dr^a Erika Fernanda Torres Samico-Fernandes.

RECIFE, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R273u Raymundo, Eduarda Faria
UTILIZAÇÃO DE *Galleria mellonella* COMO MODELO BIOLÓGICO EM ESTUDO EXPERIMENTAL COM
Leptospira spp. / Eduarda Faria Raymundo. - 2024.
51 f. : il.

Orientadora: Erika Fernanda Torres Samico Samico-Fernandes.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Medicina Veterinária, Recife, 2024.

1. *Galleria mellonella*. 2. Laboratório. 3. Leptospirose. 4. Sorologia. 5. Molecular. I. Samico-Fernandes, Erika
Fernanda Torres Samico, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DE *Galleria mellonella* COMO BIOMODELO EM ESTUDO
EXPERIMENTAL COM *Leptospira* spp.**

Relatório elaborado por
EDUARDA FARIA RAYMUNDO

Aprovado em 05 /02/ 2024

BANCA AVALIADORA

Prof^ª Dr^ª Erika Fernanda Torres Samico-Fernandes
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof^ª Dra^a Renata Pimentel Bandeira de Melo
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Médica Veterinária Juliana de Souza Pedrosa
Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFF

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que fizeram parte da minha jornada acadêmica. Suas contribuições foram fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Valério e Christina, por todo amor e compreensão nos momentos mais intensos da graduação. Aos meus irmãos Luíza e Vinícius, e minha avó Dalbenes, pelo apoio durante essa etapa e por sempre estarem presentes mesmo com a distância. Aos meus primos, Kellen e Joaquim, pelo carinho proporcionado e por tornarem meus dias mais alegres.

Agradeço aos meus amigos que a universidade me apresentou, Lucas Sobral, Laura Maria, Dheborá e Rebeca vocês me apoiaram em cada etapa e em cada sonho, sem o acolhimento de vocês, eu não teria conseguido. Também aos amigos Caio, Roberto, Iara, Alê e Suzana, vocês tornaram os desafios mais leves e as conquistas mais significativas. Juntos, enfrentamos os obstáculos e fortalecemos laços que levarei para toda a vida, obrigada por serem minha família em Recife.

Um agradecimento aos meus professores e orientadores, Huber Rizzo, Carolina de Araújo, Renata Pimentel e Rinaldo Mota que fizeram parte dessa jornada, suas contribuições foram valiosas e inestimáveis. Em especial, à Prof^a. Dr^a. Erika, suas sábias orientações e seu acolhimento contribuíram para meu crescimento como pessoa, aluna e futura profissional. Minha gratidão se estende ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco e à sua equipe, lugar onde despertou minha paixão pela Medicina Preventiva, bem como meu interesse pela área acadêmica.

Agradeço, ainda, ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense- LaBV/UFF e toda a sua equipe, pela recepção calorosa e pelos ensinamentos durante o período de Estágio Supervisionado Obrigatório. Expresso minha gratidão, particularmente, ao Prof. Walter Lilenbaum e à Isabel Di Azevedo, pela oportunidade concedida. Também à Juliana Pedrosa, integrante da equipe do LaBV, pela orientação durante o desenvolvimento da pesquisa e por aceitar o convite para compor a banca avaliadora. Agradeço, ainda, ao Gustavo, pelo seu carinho e companheirismo durante essa etapa tão importante.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram durante esse percurso, sou imensamente grata por cada aprendizado e cada conquista.

EPÍGRAFE

"Welcome to the real world. It sucks. You're gonna love it!"

Monica Geller, Friends (1999).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Sala da sorologia	14
FIGURA 02	Sala da extração de DNA	15
FIGURA 03	Áreas designadas para biologia molecular	16
FIGURA 04	Purificação de DNA	16
FIGURA 05	Sala de esterilização.....	17
FIGURA 06	Preparo do meio de cultura EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris)	29
FIGURA 07	Difco <i>Leptospira</i> Enrichment EMJH (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA)	20
FIGURA 08	Preparo no meio de cultura em cabine de fluxo	20
FIGURA 09	Meios de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) em estufa DOB a 29°C	22
FIGURA 10	Microscópio de campo escuro	24
FIGURA 11	Estirpes de <i>Leptospira</i> spp. armazenadas em nitrogênio líquido.....	25
FIGURA 12	Preparo de placas para o Teste de Soroaglutinação Microscópica	26
FIGURA 13	Estufa bacteriológica a 37°C para incubação da placa para o Teste de Soroaglutinação Microscópica	26
FIGURA 14	(A) Controle negativo com <i>Leptospira</i> spp. livre no campo. (B) Amostra positiva com diminuição de <i>Leptospira</i> spp. no campo e presença de aglutinações...	27
FIGURA 15	Antissoros utilizados para sorogrupagem de culturas de <i>Leptospira</i> spp.	28
FIGURA 16	Esquema de titulação em placa para sorogrupagem	29
FIGURA 17	Agglutinação em diferentes titulação da sorogrupagem (A) Diluição 1:1600 (B) Diluição 1:204800	28
FIGURA 18	Desenho esquemático do ciclo de amplificação para <i>LipL32</i>	30
FIGURA 19	Gel de eletroforese com amplicons da Reação em Cadeia da Polimerase do gene <i>LipL32</i> . Poços 1-17: amostras; Poço 18: controle negativo da extração; Poço	

	19: controle positivo; Poço 20: controle negativo da PCR.....	31
FIGURA 20	Corrida de eletroforese em gel de agarose	33
FIGURA 21	Gel de eletroforese com amplicons da Reação em Cadeia da Polimerase do gene <i>SecY</i> de amostras purificadas	33
FIGURA 22	Larvas de <i>Galleria mellonella</i> em tamanho L6 acondicionadas em placa de Petri.	34
FIGURA 23	Coleta da hemolinfa de <i>Galleria mellonella</i> em cabine de fluxo. (A) Utilização de um alicate para o corte. (B) Aspiração do conteúdo com auxílio de uma pipeta.	35
FIGURA 24	Larvas de <i>Galleria mellonella</i> em placa de Petri após incubação em estufa a 37°C.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Técnicas desenvolvidas durante o período de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).....	18
TABELA 2	Espécies animais avaliadas quanto a sorologia durante o período de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) ...	18
TABELA 3	Cálculo do volume e concentração dos agentes químicos para confecção do coquetel STAFF.....	21
TABELA 4	Lista de estirpes de <i>Leptospira</i> spp. utilizadas como antígeno para o Teste de Soroaglutinação Microscópica no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBV/UFF) e seus respectivos sorogrupos.....	25
TABELA 5	Reagentes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com alvo <i>LipL32</i>	29
TABELA 6	Reagentes para <i>SecY</i> -nested	31
TABELA 7	Etapas para amplificação do gene <i>SecY</i> - <i>outer</i>	32
TABELA 8	Etapas para amplificação do gene <i>SecY</i> - <i>inner</i>	32

RESUMO

O presente trabalho tem como finalidade relatar as atividades desempenhadas durante o estágio supervisionado obrigatório (ESO), uma disciplina essencial para a conclusão do curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco. O estágio foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizado no Instituto Biomédico, na rua Prof. Hernani Melo, 101, 3º andar, sob a orientação da Profª Drª Érika Fernanda Torres Samico-Fernandes e supervisão da Profª Drª Maria Isabel Nogueira Di Azevedo, no período de 02/10/2023 a 22/12/2023. Durante o estágio, foi possível acompanhar a rotina do laboratório de Bacteriologia Veterinária, com foco especial no estudo e diagnóstico de *Leptospira* spp., participando ativamente na execução de exames sorológicos, moleculares e culturas bacteriológicas. Além disso, houve a oportunidade de acompanhar e auxiliar na produção de meios de cultura, manutenção das culturas de referência e congelamento de culturas de *Leptospira* spp. Ao longo desse período, foram desenvolvidas, também, práticas de extração e purificação de DNA, bem como as atividades de pesquisa realizadas no laboratório. Como resultado dessa experiência, foi possível redigir um artigo científico abordando a aplicabilidade da utilização de *Galleria mellonella* como biomodelo em estudos experimentais com *Leptospira* spp. Essa vivência proporcionou uma compreensão mais profunda das práticas laboratoriais, fortalecendo a formação acadêmica e ampliando o conhecimento no âmbito da Medicina Veterinária Preventiva.

Palavras-chaves: *Galleria mellonella*; Laboratório; Leptospirose; Sorologia; Molecular.

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO I	12
1.1	Introdução.....	12
1.2	Descrição do local do estágio	13
1.3	Descrição das atividades	16
	1.3.1 Casuística	16
	1.3.2 Meios de cultura EMJH, Fletcher, T80/40LH e Staff.....	18
	1.3.3 Cultivo e manutenção de <i>Leptospira</i> spp.	20
	1.3.4 Congelamento de culturas de <i>Leptospira</i> spp.	22
	1.3.5 Soroaglutinação microscópica (MAT)	23
	1.3.6 Sorogrupagem de culturas de <i>Leptospira</i> spp.	26
	1.3.7 Extração de DNA.....	27
	1.3.8 PCR para o gene <i>LipL32</i>	28
	1.3.9 Nested-PCR para o gene <i>SecY</i>.....	30
	1.3.10 Eletroforese em gel de agarose	31
	1.3.11 Purificação de DNA (amplicons).....	32
	1.3.12 Pesquisa experimental com <i>Galleria mellonella</i>.....	33
1.4	Discussão das atividades desenvolvidas	34
2.	CAPÍTULO II	39
2.1	Artigo científico	39
	Resumo	39
	Introdução	41
	Material e métodos	43
	Resultados e discussão	43
	Conclusão	45
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
4.	REFERÊNCIAS	47

1. CAPÍTULO I

1.1 Introdução

O estágio supervisionado obrigatório (ESO) visa proporcionar aos estudantes curso de Bacharelado em Medicina Veterinária uma oportunidade de imersão prática na área de interesse. Durante o período de vivência, o discente tem a oportunidade de participar de atividades com objetivo de adquirir experiência e conhecimento aplicáveis ao campo profissional. Essa disciplina é indispensável no currículo, contribuindo significativamente para a formação do aluno, esta possui carga horária total de 420 horas a serem cumpridas.

O presente ESO foi desenvolvido durante o período de 02/10/2023 a 22/12/2023 no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (LaBV-UFF), localizado no Instituto Biomédico, Rua Prof. Hernani Melo, 101, 3º andar. O estágio foi desenvolvido sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Érika Fernanda Torres Samico-Fernandes e supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Nogueira Di Azevedo.

O ESO foi delineado com o principal propósito de acompanhar a rotina do LaBV/UFF. Este laboratório desenvolve atividades de pesquisa e diagnóstico de bacterioses dos animais domésticos, com ênfase em Leptospirose. No âmbito das práticas programadas, destaca-se a participação na execução de culturas bacteriológicas, análises sorológicas e moleculares. Essas técnicas permitem a identificação e investigação da leptospirose, fornecendo o entendimento sobre a epidemiologia e patogênese dessa enfermidade em animais domésticos.

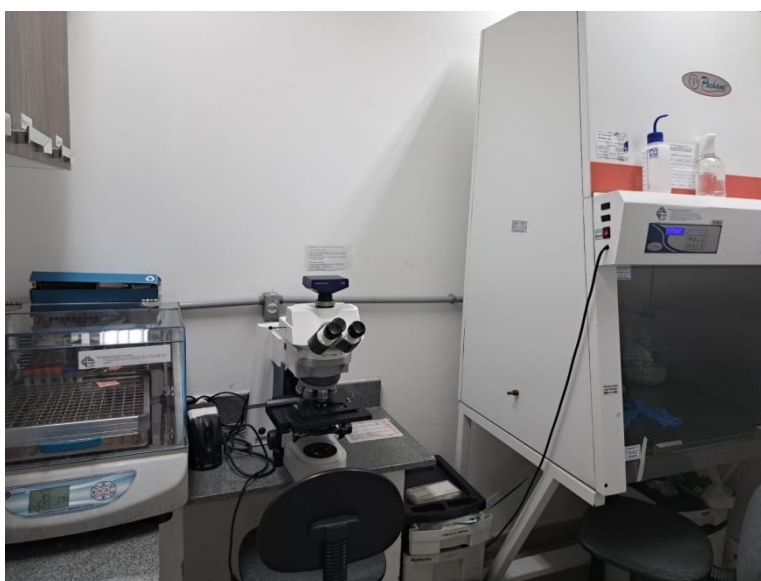
O período de vivência revelou-se de suma importância, visto que as atividades desenvolvidas proporcionaram a imersão na complexidade do diagnóstico de leptospirose, bem como compreender a importância das diferentes abordagens de diagnóstico. A experiência proporcionada contribuiu para o preparo na formação profissional e científica, importantes para enfrentar os desafios no âmbito da Medicina Veterinária.

1.2 Descrição do local do estágio

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBV), localizado no Instituto Biomédico da Universidade Fluminense (UFF). O LaBV é subdividido em seis áreas especializadas, sendo estas destinadas para a realização de análises sorológicas, análises moleculares, extração de DNA, purificação de DNA, área de esterilização e descontaminação de materiais, além das salas de estudos devidamente equipadas com bancadas e computadores. O laboratório tem como propósito específico conduzir pesquisas e diagnósticos relacionados à *Leptospira* spp. O responsável pela coordenação do laboratório é o Prof. Dr. Walter Lilenbaum, sendo a equipe composta por uma técnica, três pós-doutorandos, três doutorandos, seis mestrandos e cinco discentes envolvidos em projetos de iniciação científica.

Estruturalmente, a sala de sorologia (Figura 01) dispõe de um microscópio de campo escuro (ZEISS AX10 Imager. A2), uma balança de precisão, uma estufa incubadora B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) à 29°C, uma cabine de fluxo (Pachane® Pa400), uma incubadora com agitação orbital (QUIMIS®), um freezer, uma estufa bacteriológica (SOLAB SL-101), dois botijões de nitrogênio líquido (Figura 02). Esses equipamentos são utilizados para produção de meios de cultivo (meio EMJH, Fletcher e T80/40LH), cultivo de *Leptospira* spp. provenientes de amostras clínicas, manutenção de culturas de referência e congelamento de culturas de *Leptospira* spp.

Figura 01. Sala da sorologia.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

O Laboratório de Bacteriologia Veterinária possui uma área isolada para realização da extração de DNA (Figura 02), nesta há uma Luminária UVC Germicida (G-light), uma centrífuga 5810R, centrífuga (Eppendorf® 5810 R. 15amp version), de um vórtex (LHNH UNISCIENCE UniVortex) e de um banho seco (KASVI). Ainda, possuem kits comerciais da DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Califórnia, EUA) e Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA), utilizados para processar diferentes amostras biológicas.

Figura 02. Sala de extração de DNA.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

O local para realização das análises moleculares (Figura 03) dispõe de três freezers, duas geladeiras, um micro-ondas, uma capela AirClean® Systems AC600, um Workstation Bancada (Pachane®) para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), quatro termocicladores (QIAGEN® QIAamplifier 96), uma centrífuga de alta velocidade (Loccus), uma centrífuga (CENTRIBIO 80-2B), 1 máquina de eletroforese (PWSys PW600) e 1 transiluminador (LIFE TECHNOLOGIES TM TFX-35M).

Figura 03. Áreas designadas para biologia molecular.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

O espaço dedicado à purificação de DNA (Figura 04) é utilizado para assegurar a obtenção de material genético de alta qualidade, destinado para realização da caracterização genética. A bancada é equipada com kits de purificação PCR Clean-Up System (Promega, EUA) e uma centrífuga de alta velocidade (Loccus).

Figura 04. Local para purificação de DNA.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

A área designada para esterilização e descontaminação é equipada com uma Autoclave Vertical CS Primatec® (Figura 05). Este espaço era utilizado visando à garantia da ausência de microrganismos, assegurando a segurança nos procedimentos laboratoriais.

Figura 05. Sala de esterilização.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3 Descrição das atividades

1.3.1 Casuística

Durante o período de execução do ESO foram realizadas diversas atividades de rotina no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, estas relacionadas a projetos de pesquisas e diagnóstico de *Leptospira* spp. em animais domésticos e animais de produção. A demanda quanto ao diagnóstico de leptospirose era constante, visto que o laboratório possuía diversas parcerias com clínicas médicas, bem como realizava serviços terceirizados. As amostras recebidas eram devidamente etiquetadas de acordo com a natureza da amostra biológica, espécie analisada e local de coleta, e para a implementação da técnica solicitada, seguiam-se as recomendações estabelecidas pelo POP (procedimento operacional padrão). Na rotina do laboratório eram realizadas diversas atividades de rotina, dentre elas, era feita a produção de meios de cultivo, manutenção e congelamento de culturas de referência, bem como extração

de DNA, visando assegurar viabilidade e integridade dos métodos para diagnóstico aplicados. Para pesquisa, era realizado, ainda, a purificação de DNA para execução da caracterização genética em parceria com Fundação Oswaldo Cruz.

Tabela 01. Técnicas desenvolvidas durante o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).

Atividade	Frequência	Porcentagem
Teste de soroaglutinação microscópica (MAT)	269	35,63%
Avaliação de cultura de referência	144	19,07%
Repique de cultura de referência	144	19,07%
PCR- <i>LipL32</i>	58	7,68%
Extração de DNA	50	6,62%
Nested-PCR	30	3,97%
Purificação de DNA	30	3,97%
Preparo e armazenamento de culturas em nitrogênio líquido	28	3,7%
Preparo de meio de EMJH	1	0,13%
Preparo do coquetel STAFF	1	0,13%
Total	755	100%

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Dentre as atividades aplicadas, o teste de soroaglutinação microscópica (MAT) era a técnica mais solicitada (Tabela 01), visto que era utilizado como método de triagem a nível de rebanho. Enquanto a PCR, era a segunda técnica mais usual, empregada como diagnóstico definitivo, sobretudo, quando se referia à leptospirose genital bovina. O laboratório recebia amostras de diferentes espécies para o diagnóstico sorológico (Tabela 02).

Tabela 02. Espécies animais avaliadas quanto a sorologia para *Leptospira* sp. durante o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).

Espécie Animal	Quantidade	Percentual (%)
Bovino	168	57,34%
Caninos	72	24,57%
Equinos	28	9,56%
Asininos	25	8,53%

Total	293	100%
--------------	-----	------

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.2 Meios de cultura EMJH, Fletcher, T80/40LH e Staff

Eram utilizados os meios de cultura EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) Fletcher e T80/40LH (Tween 80/Tween 40 + Lactoalbumina Hibrolisada) para o isolamento e manutenção de culturas de bactérias do gênero *Leptospira*, além do coquetel de STAFF, usado com intuito de impedir contaminação dos meios. O EMJH é uma formulação líquida ou semissólida enriquecida com nutrientes essenciais para o crescimento dessas bactérias, proporcionando um ambiente adequado para sua multiplicação. Para o preparo, o meio EMJH (Figura 06) era pesado em uma balança de precisão e diluído em água destilada, em seguida, a mistura era autoclavada.

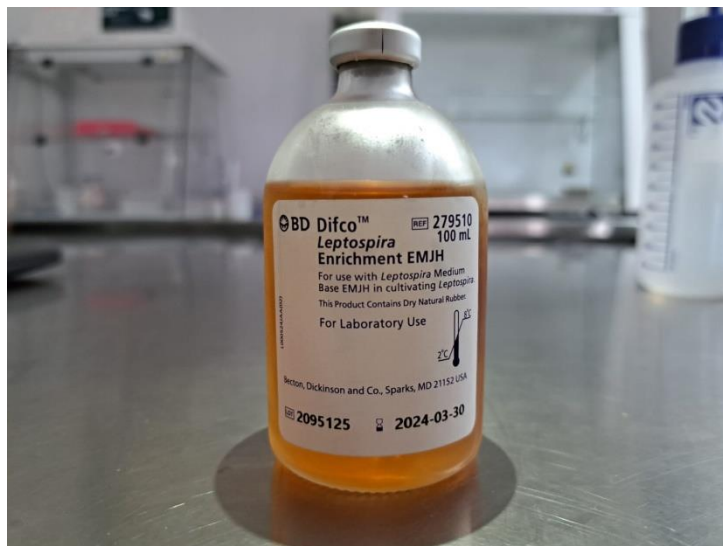
Figura 06. Preparo do meio de cultura EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris).



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Após a esterilização, a solução era suplementada com Difco *Leptospira* Enrichment EMJH (Becton Dick-inson, Sparks, MD, EUA) em cabine de fluxo (Figura 07).

Figura 07. Difco *Leptospira* Enrichment EMJH (Becton Dick-inson, Sparks, MD, EUA).



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

O meio de Fletcher também era utilizado para o isolamento de *Leptospira* spp., através da suplementação com soro de coelho, fornece nutrientes para o crescimento da bactéria. Seu preparo também era baseado na diluição do meio Fletcher em pó em água destilada, contudo, após autoclavagem, era adicionado soro estéril de coelho. Já o T80/40LH era necessário para o isolamento de estirpes de *Leptospira* spp. fastidiosas e o seu preparo fundamentava-se na utilização de ácidos graxos e agentes detoxificantes, sendo este mais empregado para o cultivo de amostras clínicas de bovinos e equinos.

Figura 08. Preparo no meio de cultura em cabine de fluxo.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Já o coquetel, denominado STAFF, é composto por substâncias antifúngicas, antimicrobianas e antineoplásicas. Essa solução era produzida visando impedir o crescimento de microrganismos que inibem o crescimento da *Leptospira* spp., comumente adicionado a meios de cultura da rotina. O preparo do coquetel STAFF era realizado adicionando os agentes químicos descritos na tabela 3 junto à água destilada previamente autoclavada, a solução era filtrada e mantida protegida da luz. Posteriormente, essa solução era adicionada ao meio de cultura (Ilustração 09).

Tabela 03. Cálculo do volume e concentração dos agentes químicos para confecção do coquetel STAFF.

Agente/Volume	1000 mL
Sulfametoxazol	0,4g
Trimetropim	0,2g
Anfotericina B	0,05g
Fosfomicna	4g
5-Fluoracil	1g

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.3 Cultivo e manutenção de *Leptospira* spp.

Culturas bacteriológicas eram realizadas a partir de amostras clínicas ou do ambiente, como: sangue, urina, água, tecidos ou fluido corpóreos. As culturas eram mantidas em estufa BOD em temperatura 29°C em meios líquido (Ilustração 10) e, após 4 dias, era passada para o meio semissólido. Essa técnica era empregada porque o meio líquido facilitava o processo de inoculação, bem como o repique das culturas, contudo o meio semissólido é capaz de mimetizar o tecido e manter a microaerofilia, importante para o crescimento de *Leptospira* spp. Essas amostras eram cultivadas com intuito de isolar e realizar diagnóstico para *Leptospira* spp., bem como estocar amostras de referência para utilização em análises sorológicas.

Figura 9. Meios de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris em estufa DOB a 29°C.

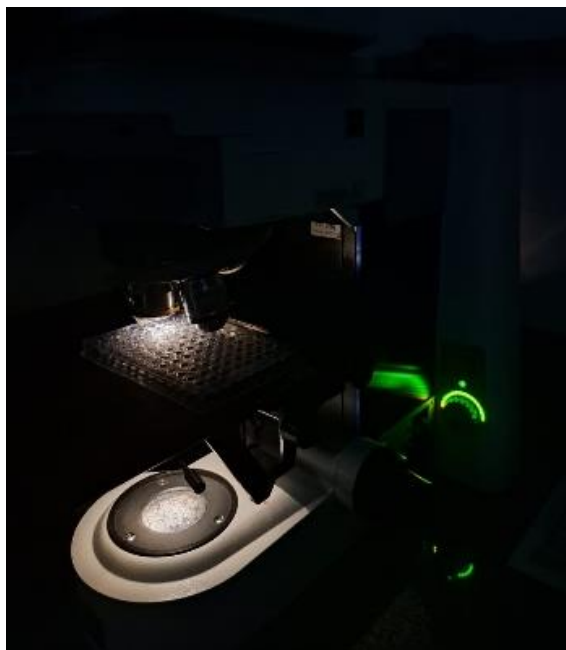


Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Para realização do cultivo, eram utilizados os meios EMJH, EMJH suplementado com coquetel de STAFF, Fletcher e T80/40LH, a escolha do meio variava conforme o material biológico utilizado e o nível de contaminação. As culturas eram manipuladas sempre em fluxo laminar visando impedir o risco de contaminações, já que o crescimento desse agente é lento, nesse contexto, o risco de crescimento de outros microrganismos era esperado.

A avaliação microscópica das culturas era feita visando identificar e caracterizar as bactérias de forma mais detalhada, incluindo verificar sua viabilidade e possíveis contaminações. As amostras clínicas eram observadas com 15 dias de inoculação, enquanto amostras de referência eram avaliadas com 7 dias após o repique. A análise era realizada em microscopia de campo escuro (Figura 10), visto que são bactérias que não coram com coloração de Gram, limitando sua visualização. Esse processo era feito por meio da preparação de uma lâmina microscópica com uma alíquota da cultura. Na visualização em microscópio, verifica-se a morfologia da bactéria, bem como a sua mobilidade, semelhantes à espirais finas e com rotação específica.

Figura 10. Microscópio de campo escuro.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Ainda, era feita a classificação quanto à concentração de *Leptospira* spp. e bactérias contaminantes por campo no microscópico. Nos casos de crescimento de *Leptospira* spp. e pouca contaminação (4:1), eram realizados dois novos repiques em meio líquido EMJH na diluição de 1:10. Quando era observado crescimento de *Leptospira* spp. com contaminação por outras bactérias (4:2, 4:3, 4:4), a cultura era submetida à filtração. Contudo, quando era visto pouco crescimento de *Leptospira* spp. e contaminação (*Leptospira* spp. < 4), era feito repique em meio líquido EMJH suplementado com coquetel STAFF.

Para manutenção de *Leptospira* spp. de referência, era feita a visualização em microscopia a cada 15 dias com intuito de avaliar seu crescimento e possíveis contaminações. A literatura comenta que cada repique *in vitro* promove queda na virulência da bactéria e, após 32 repiques, seria necessário realizar a passagem *in vivo*. Nesse contexto, as culturas de referência só eram repicadas de acordo com a utilização e contaminação observada. Na avaliação macroscópica era possível visualizar o aparecimento de uma zona de crescimento característico, denominado anel de Dinger, normalmente visto em repiques.

1.3.4 Congelamento de culturas de *Leptospira* spp.

O congelamento das culturas de *Leptospira* spp. era feito em nitrogênio líquido a -196°C (Ilustração 12), ocorria quando as estirpes estivessem em fase exponencial de crescimento (fase Log), normalmente, após 7 a 10 dias de repique, momento em que

estivessem apresentando bom crescimento, boa atividade e movimentação, além de estar livre de contaminação. Para o preparo, era feita a distribuição de dimetilsulfóxido (DMSO) filtrado em culturas previamente selecionadas em cada tubo. Vale salientar que todos os criotubos estavam devidamente etiquetados quanto ao sorovar em questão, data do repique e número de passagens *in vivo* e *in vitro*. Para o descongelamento, era retirado um tubo para descongelar naturalmente, posteriormente metade da amostra era inoculada em meio EMJH e a outra em EMJH com STAFF.

Figura 11. Estirpes de *Leptospira* spp. armazenadas em nitrogênio líquido.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.5 Soroaglutinação Microscópica (MAT)

Para a realização do MAT, é exigido o preparo do antígeno, do soro do animal, incubação e observação microscópica para a leitura e interpretação dos resultados (Ilustração 13). As culturas utilizadas eram de referência e distintas sorologicamente, já que na taxonomia da *Leptospira* spp., existem diferentes sorovares dentro de cada sorogrupo, portanto, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA), o material biológico deve ser testado para cada um deles. O estado do Rio de Janeiro é considerado endêmico e há conhecimento sobre a prevalência sorológica, nesse contexto, os sorovares utilizados eram de acordo com a literatura e espécie testada. Para a interpretação dos resultados, considerando a ocorrência de reações cruzadas, o diagnóstico sorológico era baseado em sorogrupos (Tabela 4).

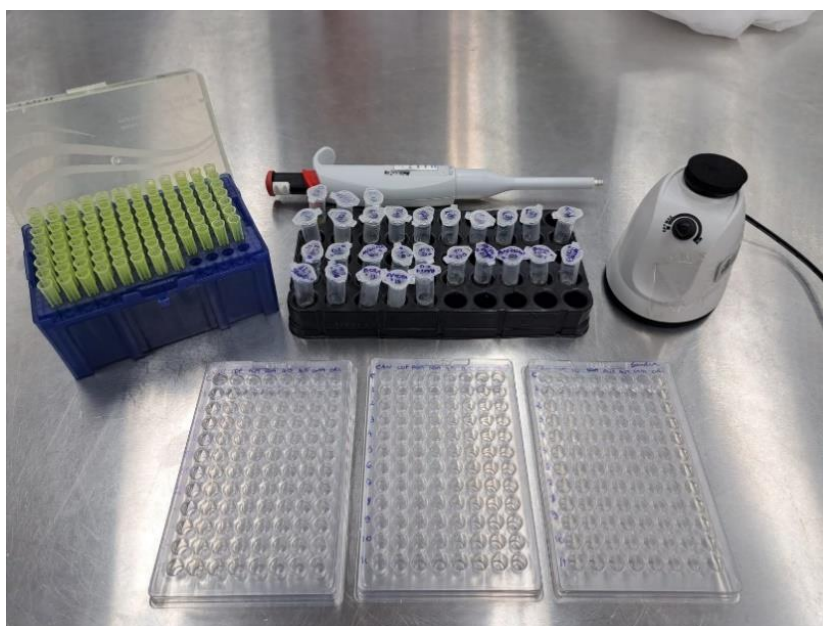
Tabela 4. Lista de estirpes de *Leptospira* spp. utilizadas como antígeno para o Teste de Soroaglutinação Microscópica no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (LabV-UFF) e seus respectivos sorogrupos.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>Leptospira interrogans</i>	Canicola	Canicola
<i>Leptospira interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
<i>Leptospira interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis
<i>Leptospira interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno
<i>Leptospira santarosai</i>	Sejroe	Guaricura
<i>Leptospira interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis
<i>Leptospira kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Australis
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Bratislava

Fonte: Adaptado de Mantins & Lilenbaum, (2013).

Para realização da técnica, iguais volumes de diluições seriadas do soro e cultura de *Leptospira* spp. eram desafiadas em placa de poços e incubadas por 1 hora e meia a 2 horas em estufa bacteriológica a 37°C (Figura 13).

Figura 12. Preparo de placas para o Teste de Soroaglutinação Microscópica.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

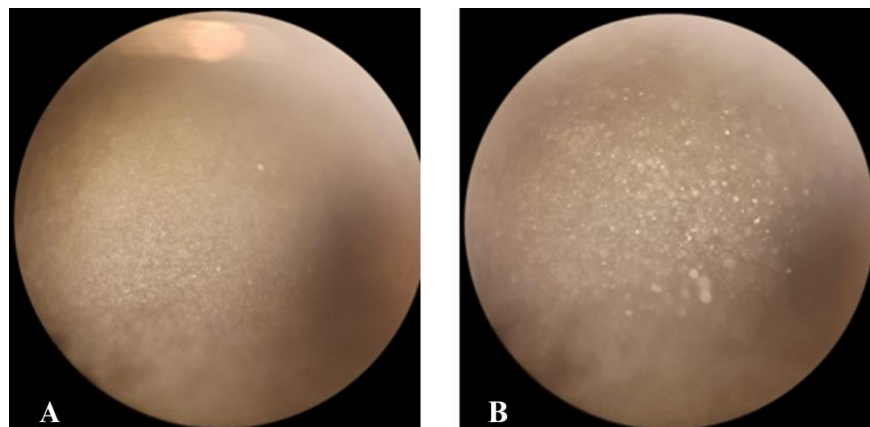
Figura 13. Estufa bacteriológica a 37°C para incubação da placa para o Teste de Soroaglutinação microscópica.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Para o preparo do antígeno, a recomendação era que para o teste fossem utilizadas culturas que tivessem 4 a 14 dias de repique em meio líquido, que tivessem sido incubadas entre 28 e 30°C, além de terem densidade $1-2 \times 10^8$ *Leptospira*/mL. Ainda, esses antígenos precisavam estar livres de contaminação e aglutinação, visando impedir a falha no processo de interpretação do teste. Em microscopia de campo escuro era realizada a leitura, e o resultado esperado se houvesse presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. era a aglutinação e conseqüente diminuição das bactérias livres no campo (Ilustração 15). A leitura era julgada como reagente quando houvesse menos 50% de espiroquetas livres em titulações acima de 1:100, sendo representado o título sorológico da maior diluição.

Figura 14. (A) Controle negativo com *Leptospira* spp. livre no campo. (B) Amostra positiva com diminuição de *Leptospira* spp. no campo e presença de aglutinações.

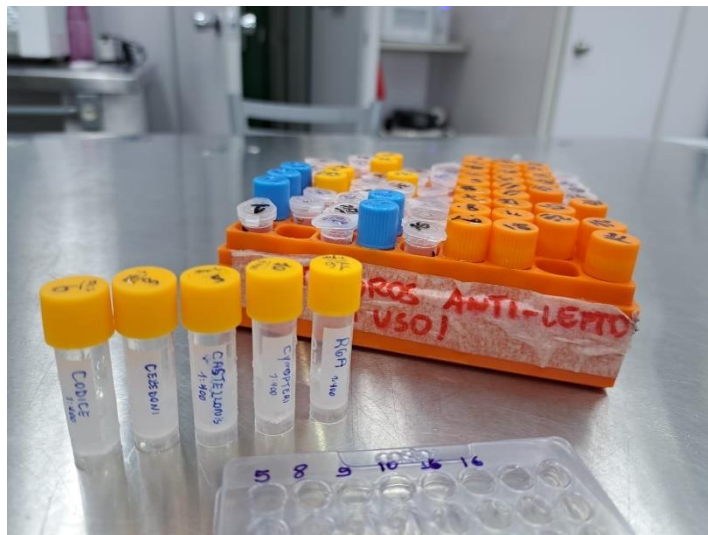


Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.6 Sorogrupagem de culturas de *Leptospira* spp.

Para execução do teste de sorogrupagem, era realizada uma soroaaglutinação microscópica através da inoculação antissoros previamente identificados em placas de poços com a amostra estudada (Ilustração 16). Para elaboração da técnica, era diluído o soro em proporção de 1:400, enquanto a cultura testada era diluída a 1:800 com solução salina. Posteriormente, a placa era submetida à incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 120 minutos. Para leitura, realizava a visualização em microscopia de campo escuro, sendo considerada reagente os poços que tivessem aglutinações em >50% de *Leptospira* spp. no campo. Esse método tinha como intuito de fazer a caracterização sorológica das cepas, visando detectar o sorogrupo e sorovar da amostra testada.

Figura 15. Antissoros utilizados para sorogrupagem de culturas de *Leptospira* spp.

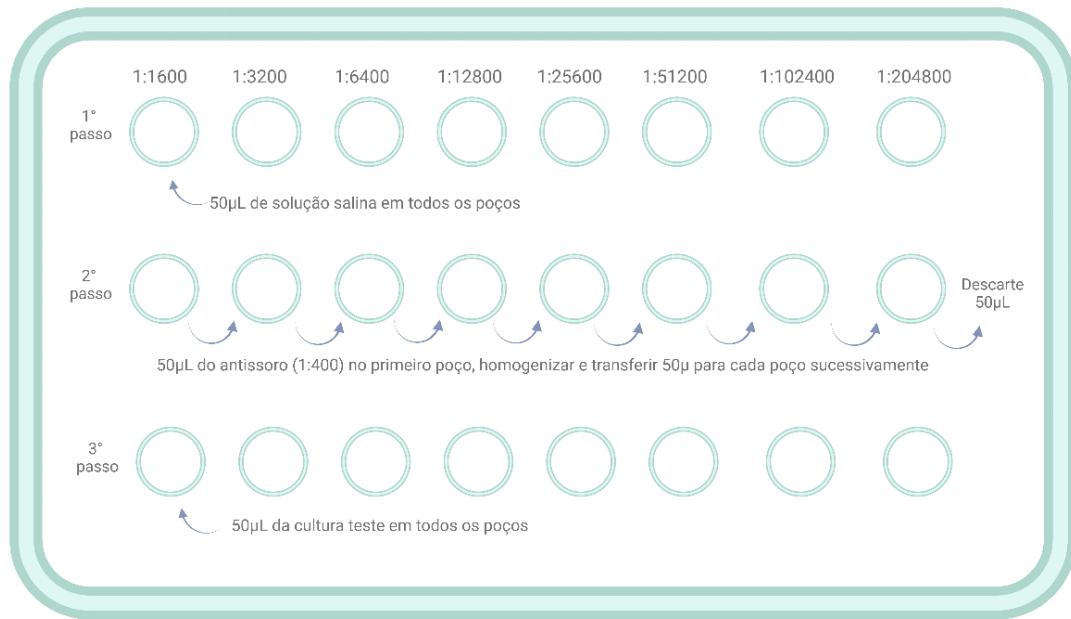


Fonte: Arquivo

pessoal (2023).

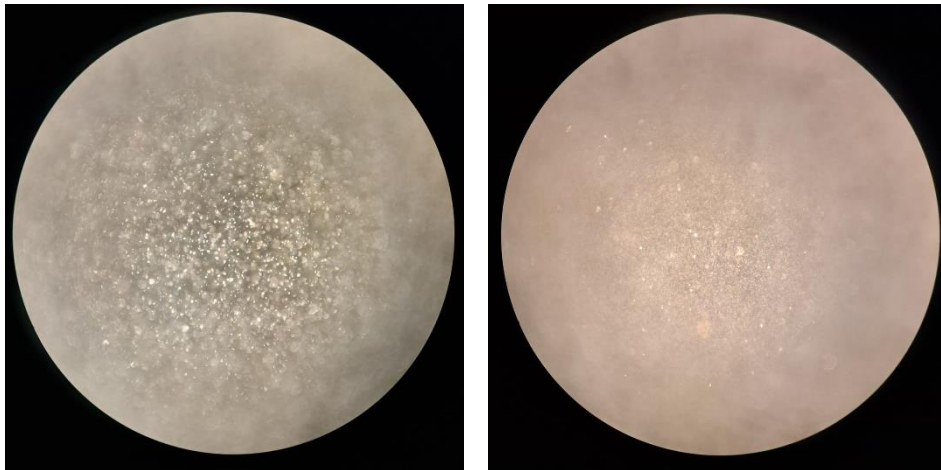
Era realizada a titulação quando as amostras reagiam a vários sorovares de um mesmo sorogrupo. Para isso, eram realizadas diluições dos antissoros em razão de dois, sendo de 1:1600 até 1:1.204.800 (Figura 16), sendo considerado o sorovar que chegasse a níveis de aglutinação nas maiores diluições (Figura 17).

Figura 16. Esquema de titulação em placa para sorogrupagem.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 17. Aglutinação em diferentes titulação da sorogrupagem (A) Diluição 1:1600 (B) Diluição 1:204800.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.7 Extração de DNA

A extração de DNA é um procedimento imprescindível para biologia molecular. Era realizada com intuito de obter o material genético puro para análises subsequentes, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Após a chegada das amostras para extração, estas eram previamente identificadas. O processo de extração envolve várias etapas, seguindo de acordo com o kit utilizado e as recomendações do fabricante. A escolha do kit empregado ocorria conforme o material biológico trabalhado, quando era utilizado muco cervicovaginal de vaca, urina e cultura, eram utilizados os kits da Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA), enquanto mucocervicovaginal de égua e

tecidos era necessário utilizar DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Califórnia, EUA). As etapas da extração são projetadas para garantir a integridade e pureza do material genético, proporcionando resultados confiáveis nas análises efetuadas.

1.3.8 PCR para o gene *LipL32*

A PCR é uma técnica utilizada com intuito de amplificar regiões específicas de DNA. A PCR para o gene *LipL32* era empregada como método diagnóstico direto para leptospirose, visto que se trata de um gene presente nas espécies patogênicas de *Leptospira* spp., para isso, eram utilizados fluidos e tecidos como material biológico. O procedimento baseia-se no preparo do mix em cabine adicionando oligonucleotídeos iniciadores (primers), água ultrapura, Taq polimerase, Buffer Cloreto de magnésio e bases nitrogenadas em concentrações específicas para cada reação (Tabela 05), posteriormente adicionavam-se as amostras de DNA individualmente em cada microtubo. Vale salientar que controles positivos e negativos eram adicionados à reação com objetivo de validar o processo. Essa solução era submetida a um termociclador, equipamento ajustado em tempo e temperatura conformem estabelecidos para cada reação. No termociclador, a solução passava pelas fases de desnaturação das fitas de DNA, anelamento dos primers às sequências específicas e posteriormente, etapa de extensão, momento em que são sintetizadas novas fitas de DNA utilizando a Taq polimerase e os nucleotídeos presentes. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão eram repetidos em ciclos dependendo da quantidade de DNA desejada.

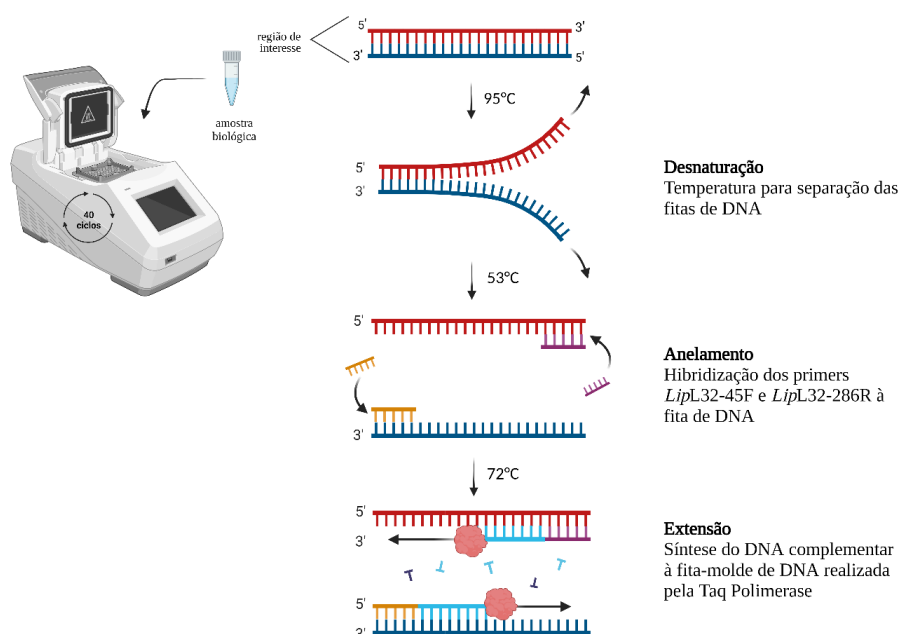
Tabela 05. Reagentes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com alvo o gene *LipL32*.

Reagente	Volume para uma reação (µL)
Água ultrapura	3,3
Buffer da Taq DNA Polimerase	1,25
MgCl₂	2
DNTP	1,25
Primer <i>LipL32</i>-45F	0,75
Primer <i>LipL32</i>-286R	0,75
Taq Polimerase	0,2
DNA da amostra biológica	3
Volume final	12,5

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para a reação PCR-*LipL32* inicia-se com temperatura à 95°C na fase de desnaturação inicial por 2 minutos, permanece por mais 30 segundos para desnaturação, para a hibridização dos primers a temperatura fica a 53°C por 3 segundos, enquanto na fase de extensão fica a 72°C por 1 minuto e, por fim, permanece por mais 5 minutos nessa temperatura para a extensão final, o ciclo de desnaturação, anelamento e extensão se repete por 40 ciclos (Figura 19). Vale salientar que para manutenção, permanece a 4°C por tempo indeterminado (Hamond et al., 2012).

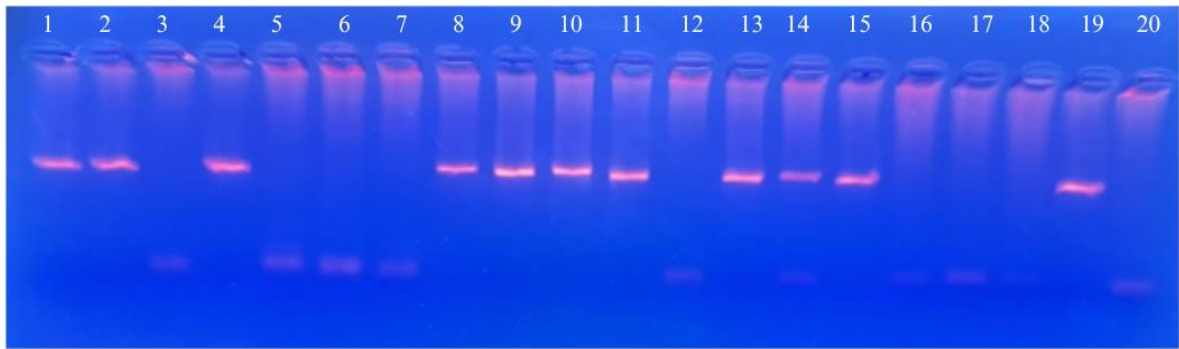
Figura 18. Desenho esquemático do ciclo de amplificação para *LipL32*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para a elaboração da técnica, são utilizados primers *LipL32_45F* - 5'AAG CAT TAC TTG CGC TGG TG 3' e *LipL32_286R* - 5'TTT CAG CCA GAA CTC CGA TT 3'), amostra de DNA de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130 como controle positivo, abrindo um fragmento de 242pb, enquanto para o controle negativo é aplicado água ultrapura. Após o término da reação, as amostras são submetidas a eletroforese e leitura em UV (Figura 19), ou congelamento a -20°C (Hamond et al., 2012).

Figura 19. Gel de eletroforese com amplicons da Reação em Cadeia da Polimerase do gene *LipL32*. Poços 1-17: amostras; Poço 18: controle negativo da extração; Poço 19: controle positivo; Poço 20: controle negativo da PCR.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.9 Nested-PCR para o gene *SecY*

Para realização da identificação da espécie, utiliza-se a nested-PCR visando amplificar o gene *SecY*. Para essa técnica, as amostras eram submetidas a duas etapas de amplificação com intuito de aumentar a sensibilidade e a especificidade na detecção de um alvo específico de DNA. A reação era conduzida usando diferentes reagentes (Tabela 06), sendo os primers *secY_outerF* (5'- ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') e *secY_outerR* (5'- CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC-3') para reação inicial. Posteriormente, os amplicons eram incluídos em uma segunda reação utilizando os primers *secY_inner_F* (5'- CCTCAGACGATTATTCAATGGTTATC-3') e *secY_inner_R* (5'- AGAAGAGAAGTTCCACCGAATG-3') (Grillová et al., 2020).

Tabela 06. Reagentes para *SecY*-nested.

Reagente	Volume para <i>SecY</i> outer (µL)	Volume para <i>SecY</i> inner (µL)
Água ultrapura	14,05	33,7
Buffer da Taq DNA Polimerase	2,5	5,0
MgCl ₂	1,75	3,0
DNTP	1,5	2,0
Primer <i>SecY</i> -F	1,0	1,5
Primer <i>SecY</i> -R	1,0	1,5
Taq Polimerase	0,2	0,3
DNA da amostra	3,0	3,0
Volume final	25,0	50,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os ciclos da reação ocorriam no termociclador com temperatura e tempo programado conforme descrito nas tabelas 7 e 8. Após o término da reação, seguia para eletroforese e leitura em fotodocumentador, ou congelamento das amostras a -20°C (Grillová et al., 2020; (Di Azevedo & Lilenbaum, 2021).

Tabela 7. Etapas para amplificação do gene *SecY-outer*.

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	5 min
Desnaturação	94°C	30 seg
Hibridização dos Primers	54°C	30 seg
Extensão	72°C	45 seg
Extensão Final	72°C	5 min
Temperatura de Manutenção	4°C	∞

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 8. Etapas para amplificação do gene *SecY-inner*.

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	94°C	5 min
Desnaturação	94°C	30 seg
Hibridização dos Primers	54°C	30 seg
Extensão	72°C	45 seg
Extensão Final	72°C	5 min
Temperatura de Manutenção	4°C	∞

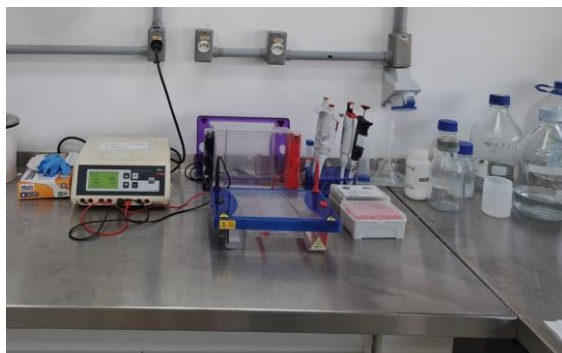
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

1.3.10 Eletroforese em gel de agarose

Para a realização da eletroforese, era preparado gel de agarose com concentração de 1,5% a partir da diluição da agarose em TBE a 0,5%. Em seguida, era adicionado o gel no molde e, após resfriamento e solidificação do gel, este era adicionado à cuba enchendo-a com tampão

TBE 0,5%. Para a corrida, era inoculado nos poços do gel 10 μ L das amostras associadas a ~~junto com~~ 3 μ L Gel Red (Gel RedTM Nucleic Acid - BIOTIUM) e 3 μ L de Azul de Bromo (6x Gel Loading Dye - Sinapse inc.), após ajustar os volumes realizava-se a corrida por 40 minutos (Figura 20). Para visualização do gel, este era posicionado em um transiluminador em luz UV a 100%.

Figura 20. Corrida da eletroforese em gel de agarose.

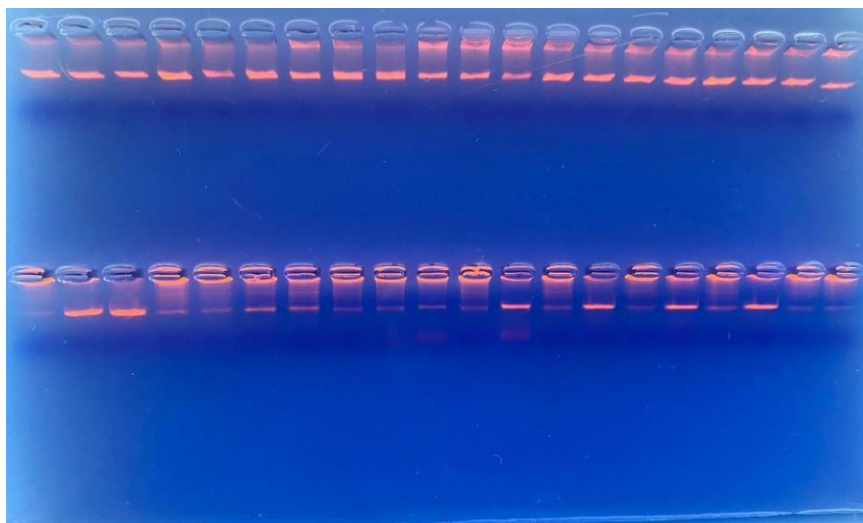


Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.3.11 Purificação de DNA amplificado (amplicon)

O processo de purificação de DNA amplificado (amplicon) é realizado com intuito de obter amostras de DNA de alta qualidade e livres de contaminantes. Isso porque o DNA extraído diretamente de uma amostra biológica geralmente contém impurezas, como proteínas, RNA, sais e outros compostos, que podem interferir em experimentos subsequentes. Essa técnica era realizada por meio da aplicação do kit PCR Clean-Up System (Promega, EUA) em amplicons positivos para o *SecY*-PCR, visando adquirir amostras apropriadas para o sequenciamento genético (Figura 21).

Figura 21. Gel de eletroforese com amplicons da Reação em Cadeia da Polimerase do gene *SecY* de amostras purificadas.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.2. 12 Estudo experimental com *Galleria mellonella*

Galleria mellonella vem sendo um modelo biológico amplamente utilizada na avaliação da virulência de fungos, bactérias, bem como em testagem de antimicrobianos. Isso ocorre devido às suas similaridades quanto a resposta imune a infecção, além de ser um biomodelo de baixo custo e por não necessitar de aprovação ética (Pereira et al., 2020). O LabV adquiria as larvas no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM), onde eram alimentadas com dieta artificial à base de farinha de trigo integral, aveia, granola grossa, glicerina e mel a cada dois dias. Para realização do experimento, eram utilizadas larvas no tamanho L6 (Clavijo-Giraldo et al., 2016).

A inoculação era feita via hemocélica usando uma seringa de Hamilton e uma agulha calibre 30, utilizando uma cepa de interesse. Posteriormente, as larvas eram adicionadas em placas de Petri (Figura 22) e incubadas em estufa a 37°C em tempo variável, conforme o objetivo do estudo (Prakoso et al., 2022).

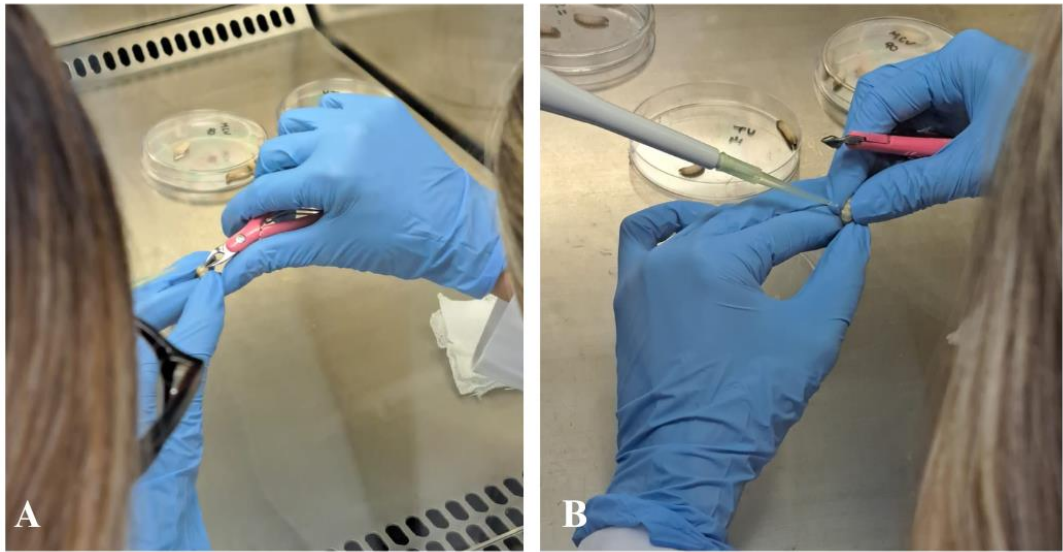
Figura 22. Larvas de *Galleria mellonella* em tamanha L6 acondicionadas em placa de Petri.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Após a incubação era realizado a desinfecção da superfície corpórea com etanol a 70% e coleta da hemolinfa com auxílio de uma pipeta e um alicate (Figura 23). O procedimento era realizado em cabine de fluxo com intuito de impedir a contaminação da amostra (Prakoso et al., 2022).

Figura 23. Coleta da hemolinfa de *Galleria mellonella* em cabine de fluxo. (A) Utilização de um alicate para o corte. (B) Aspiração do conteúdo com auxílio de uma pipeta.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

O conteúdo aspirado era cultivado em meio EMJH ou Meio EMJH com STAFF por 7 a 14 dias em estufa BOD a 29°C. Após o período de incubação, as amostras eram analisadas em microscopia de campo com intuito de verificar a presença ou ausência de *Leptospira* spp. (Adler & Moctezuma, 2010; Loureiro et al., 2015).

Figura 24. Larvas de *Galleria mellonella* em placa de Petri após incubação em estufa a 37°C.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

1.4 Discussão das atividades desenvolvidas

Diante dos dados relatados, pôde-se observar que as espécies domésticas, sejam elas de caráter produtivo ou de companhia foram analisadas durante o período de ESO no LaBV quanto à infecção por *Leptospira* spp., sobretudo, em bovinos, com o quantitativo amostral recebido de 57,34%. Ainda, percebe-se que, apesar do diagnóstico direto ser considerado mais sensível para leptospirose genital bovina, a sorologia foi o método comumente empregado durante o período analisado. O MAT foi utilizado com frequência, também, para a análise das amostras de caninos (24,57%), sendo menos usual em equinos (9,56%) e asininos (8,53%), como demonstrado na tabela 02.

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira* (Delgado et al., 2022). Essa doença é caracterizada por afetar diversas espécies de animais domésticos e selvagens, manifestando-se de maneiras clínicas variadas de acordo com o hospedeiro e o sorovar infectante. A *Leptospira* spp. é conhecida por sua elevada diversidade genética e sorológica, desempenhando um papel crucial no contexto epidemiológico (Loureiro & Lilenbaum, 2020; Pereira, 2022). As bactérias patogênicas são subdivididas sorologicamente em sorogrupos e sorovares de acordo com as diferenças na composição do açúcar e na orientação do lipopolissacarídeo (Adler & Mctezuma, 2010).

A leptospirose genital acomete, normalmente, animais de produção e é considerada de caráter crônico, sendo seus hospedeiros, considerados reservatórios e apresentam sintomatologia inaparente, tornando-os importantes agentes de manutenção da doença no rebanho (Loureiro & Lilenbaum, 2020; Aymée et al., 2022). Já os sorovares caracterizados como incidentais são associadas a quadros mais graves e agudos da doença. A compreensão a respeito da circulação dos sorovares a nível regional é de extrema relevância para a melhor compreensão da epidemiologia e controle da enfermidade (Adler & Moctezuma, 2010; Loureiro et al., 2019).

Em bovinos, Loureiro e Lilenbaum (2020) descreveram essa enfermidade em vacas como “Leptospirosis genital bovine” caracterizada por se tratar de uma enfermidade crônica e por causar alterações a nível reprodutivo, já sendo detectado DNA leptospiral em ovários, ovidutos, útero, fluidos vaginais e sêmen. É mencionada como uma doença silenciosa, porém sinais como: aborto, natimorto, reabsorção embrionária e repetição de cio são comumente descritas, sendo a transmissão sexual citada de forma recorrente. De acordo com a literatura, o sorogrupo Serjoe sorovar Hardjo é considerado adaptado a bovinos e, por se tratar de uma síndrome com particularidades distintas, necessita de um diagnóstico e tratamento específico (Di Azevedo et al., 2020).

Os equinos apresentam quatro síndromes clássicas: ocular, hepatorenal, pulmonar e reprodutiva, ocasionada por uma variedade de sorogrupos infectantes, membros dos sorogrupos Pomona, Grippytyphosa, Autumnalis, Sejroe, Canicola, Ballum e Icterohaemorrhagiae sendo esses os mais evidentes. Contudo, quando se refere a enfermidade crônica e de caráter reprodutivo, o sorogrupo adaptado é o mais prevalente, sendo o sorogrupo Australis, sorovar Bratislava considerado adaptado aos equinos. Estudos apontam que apesar do material para diagnóstico normalmente se referir à urina, quando se trata de leptospirose genital, o trato reprodutivo seja mais fidedigno, sobretudo, muco cervicovaginal e fragmentos uterinos (Di Azevedo & Lilenbaum, 2022). Existe uma escassez de estudos referentes à leptospirose em asininos, a hipótese sugerida é que esses equídeos são considerados resistentes à infecção, contudo já foi relatada sororreatividade, sobretudo, para os sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Australis (Morais et al., 2019).

Em caninos, o sorogrupo Canicola é considerado adaptado e descrito por ser de caráter crônico, enquanto o sorogrupo incidental Icterohaemorrhagiae é frequentemente associado a infecções agudas (Santanna et al., 2021). Os cães são altamente susceptíveis à infecção, podem apresentar a doença aguda com alterações hepáticas e renais. Em casos silenciosos, os cães têm valor epidemiológico importante, por ser capaz de liberar bactérias na urina e contribuir para manutenção do agente no ambiente, seu papel tem sido amplamente estudado visto que se trata de um problema grave de saúde pública (Di Azevedo et al., 2023).

Nesse sentido é importante as estratégias para o diagnóstico da leptospirose que envolve diversas técnicas, sejam elas diretas ou indiretas. A OMSA recomenda a utilização do teste indireto de soroaglutinação microscópica (MAT) devido à sua elevada especificidade e capacidade de identificação do sorogrupo circulante, contudo, devido a sua baixa sensibilidade em fases iniciais da infecção, é necessário o emprego de outras técnicas (Loureiro & Lilenbaum, 2020). A PCR tem se tornado a técnica de escolha, sobretudo, quando se trata da leptospirose genital (Di Azevedo et al., 2023).

Existe, ainda, o isolamento bacteriano, considerado o diagnóstico definitivo, mas devido ao crescimento lento dessas bactérias e à possibilidade de contaminação das culturas, esse método exibe baixa sensibilidade diagnóstica (Loureiro et al., 2014; Loureiro & Lilenbaum, 2020). Vale salientar que essas técnicas apresentam limitações, sobretudo, quando se refere a infecções crônicas, visto que os resultados sorológicos e moleculares comumente apresentam-se discrepantes. Assim, o uso de ferramentas moleculares complementares vem sendo cada vez mais incentivado (Di Azevedo & Lilenbaum, 2021; Di Azevedo et al., 2023).

O isolamento de *Leptospira* spp. é considerado o diagnóstico padrão-ouro e exerce um papel imprescindível nas investigações epidemiológicas, este é realizado a partir de amostras clínicas ou ambientais em meios de cultura específicos. Contudo, deve-se considerar as limitações dessa técnica, visto que se trata de uma bactéria com crescimento fastidioso, além da comumente contaminação das culturas, fatores que levam a baixa sensibilidade desse método (Loureiro et al., 2013).

O MAT é uma técnica que se baseia na resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por *Leptospira* spp., permitindo a análise da reação antígeno-anticorpo *in vitro*. Ela é realizada por meio da combinação de amostras clínicas de soro dos animais estudados associado a antígenos previamente preparados (Adler & Metzuma, 2010). Esse processo viabiliza a detecção de anticorpos específicos, conduzindo a formação de aglomerados visíveis e diminuição da *Leptospira* spp. livre no campo, permitindo assim a identificação e caracterização da resposta imune contra essas bactérias. No entanto, é importante destacar que devido a janela imunológica e baixa sensibilidade para IgG, resulta em um método pouco usual para enfermidades de carácter crônico, normalmente empregados a nível de rebanho como método de triagem. Ainda, o MAT tem capacidade de identificar a nível de sorogrupo, devido ao elevado grau de reações cruzadas entre sorovares de cada sorogrupo (Loureiro et al., 2013).

A PCR é a ferramenta diagnóstica cada vez mais utilizada quando se refere a leptospirose em animais de produção, visto que esse método apresenta alta sensibilidade e especificidade (Loureiro et al., 2013). Para identificação das espécies patogênicas para o gênero *Leptospira*, o gene comum de escolha para PCR é o *LipL-32*, uma lipoproteína de membrana externa específica. Esse gene é frequentemente escolhido como alvo para PCR no diagnóstico de leptospirose por possuir elevada especificidade por ser altamente conservado, é amplificado com eficiência pela técnica, permitindo a detecção sensível em amostras clínicas. Mesmo em estágios iniciais da infecção, é um gene presente em todas as cepas patogênicas, além de amplamente validado pela literatura (Di Azevedo & Lilienbaum, 2021).

A caracterização genética desempenha um papel crucial na epidemiologia de doenças, fornecendo *insights* importantes sobre a transmissão, evolução e propagação de agentes patogênicos. Para a realização da caracterização genética em amostras biológicas positivas para espécies patogênicas de *Leptospira* spp., realiza-se uma nested-PCR almejando o gene *SecY*, visto que este possui propriedades quanto à sua variabilidade genética que permitem a construção de árvores filogenéticas para *Leptospira* spp., além de ser amplificável com

eficiência, possibilitando o sequenciamento genético (Di Azevedo & Lilenbaum, 2021). Contudo, o gene *SecY* é utilizado em uma segunda etapa, exclusivamente, para fins taxonômicos, visto que esse gene também é detectado em outras bactérias, como *Staphylococcus* spp. ou coliformes. Nesse contexto, o gene *SecY* é considerado um excelente marcador genético, comumente empregado para identificação confiável de espécie de *Leptospira* spp. e, em alguns casos, detecção a nível de sorovar (Di Azevedo & Lilenbaum, 2021).

A leptospirose é doença infecciosa patogênica para animais e humanos. É uma importante zoonose considerada negligenciada no âmbito da saúde pública, além de subestimada quando se trata dos impactos reprodutivos dessa enfermidade. Nesse contexto, a compreensão sobre a patogênese do agente infeccioso, bem como os métodos de diagnóstico e a epidemiologia da enfermidade tornam-se imprescindíveis para o tratamento e prevenção da doença (Loureiro & Lilenbaum, 2019). Assim, o LaBV foca, sobretudo, em diagnóstico de *Leptospira* spp. e pesquisas referentes à complexidade dessa enfermidade.

As pesquisas experimentais desempenham um papel crucial no avanço do desenvolvimento científico, sobretudo, no contexto da bacteriologia veterinária. Esses estudos permitem uma análise mais detalhada a respeito da patogênese das doenças e dão suporte para elaboração de métodos de diagnóstico. O LaBV desempenha também atividade a nível experimental com *Leptospira* spp., e a busca por biomodelos eficazes, de baixo custo e fáceis de manipular vêm sendo cada vez mais procurados. Nesse contexto, durante o período do ESO foi possível desenvolver um artigo científico sobre a utilização de *Galleria mellonella* em pesquisas experimentais com *Leptospira* spp., dando ênfase na sua aplicabilidade no âmbito do cultivo e manutenção dessas bactérias.

2 CAPÍTULO II

2.3 Artigo científico

Utilização de *Galleria mellonella* como modelo biológico em estudo experimental com *Leptospira* spp.

Resumo

As larvas de *Galleria mellonella* têm se tornado um biomodelo promissor em estudos experimentais por fornecer diversas vantagens financeiras, éticas, bem como apresentar similaridades fisiológicas com os animais vertebrados. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade do biomodelo em pesquisas experimentais com *Leptospira* spp. em três experimentos. O estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) e as larvas foram obtidas do Centro de Investigação de Microrganismos – CIM, localizado no Instituto Biomédico da UFF. No primeiro experimento foi utilizada uma estirpe de *Leptospira interrogans* (sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Icterohaemorrhagiae), cultura de referência contaminada empregada no Teste de Soroaglutinação Microscópica, e no segundo foram utilizadas amostras clínicas de bovinos com baixa concentração de *Leptospira* spp. Todos os experimentos seguiram o padrão de inoculação em 20 larvas, as quais foram divididas em quatro grupos (G1-G4) com cinco larvas cada. As larvas foram armazenadas por 30 minutos,

45 minutos, 1 hora, 1 hora e meia a 37 °C em estufa bacteriológica. O estudo demonstrou que esse biomodelo serviu para descontaminação de culturas de referência de *Leptospira* spp.

Palavras chaves: Biomodelo; invertebrado; leptospirose; sistema imunológico.

Introdução

A investigação científica em modelos vivos é primordial para adquirir informações sobre a patogenicidade dos microrganismos, bem como as interações patógeno-hospedeiro (Barbosa et al., 2023). Para tal, modelos vertebrados são amplamente utilizados para o estudo de patógenos por apresentar similaridade metabólica, temperatura corporal e resposta imune, capazes de mimetizar o ambiente do hospedeiro (Pereira et al., 2020). Contudo, trabalhar com esse biomodelo exige desafios a serem enfrentados, visto que é necessária aprovação ética, estrutura de laboratório adequado, além do tempo de adaptação dos animais e os custos de criação. Assim, restrições quanto ao número de animais estudados devido às dificuldades relatadas, poderia propiciar em resultados não fidedignos (Ménard et al., 2021).

Consequentemente, pesquisadores vêm procurando realizar experiências em biomodelos alternativos que apresentem baixos custos e facilidade de manipulação, como os animais invertebrados (Tao et al., 2021). Estudos experimentais em invertebrados estão ganhando destaque por algumas semelhanças quanto ao sistema imunológico inato e por não haver restrições éticas, já que não possuem nociceptores. *Galleria mellonella* é um biomodelo alternativo utilizado em estudos recentes, sobretudo, referente a infecções microbianas e testes de medicamentos antimicrobianos (Ménard et al., 2021).

Galleria mellonella é um inseto da ordem *Lepidoptera* e da família *Pyralidae*, também conhecido como mariposa do favo de mel ou mariposa de cera, é descrita por apresentar quatro estágios de vida: ovos, larvas, pupas e adultos, o ciclo completo possui duração de aproximadamente 8 semanas quando em ambiente com temperatura de 29-39°C e alta umidade (Tao et al., 2021). Seu sistema imunológico compartilha inúmeras semelhanças com sistema imune inato dos animais vertebrados (Curtis et al., 2022). A resposta celular apresenta células fagocíticas denominadas hemócitos, similares aos fagócitos em humanos. Estes são encontrados em maior parte livres na hemolinfa, estrutura presente ao redor do corpo gorduroso e do trato digestivo das larvas (Pereira et al., 2020).

As larvas de *G. mellonella* já foram utilizadas em estudos experimentais com *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, entre outras bactérias e fungos, sendo estas consideradas um excelente modelo para avaliação da virulência desses microrganismos (Tsai et al., 2016; Wagley et al., 2017; Ménard et al., 2021; Curtis et al., 2022). Em contrapartida, ainda há uma escassez de estudos com *Leptospira* spp., sobretudo, no que se refere à capacidade no seu emprego para avaliação e reativação da virulência de

cepas, descontaminação de culturas de referência, assim como em testes vacinais (Prakoso et al., 2022).

No âmbito dos estudos experimentais com leptospirose, os hamsters são considerados os biomodelos ideais para o entendimento da patogênese dessa enfermidade (Barbosa et al., 2023). Porém, vale salientar que, para implementação dessa atividade, requer estrutura laboratorial com elevados custos, aprovação ética, bem como tempo de adaptação e habilidade para manipulação desses animais, fatores que acarretam pesquisas experimentais limitadas (Prakoso et al., 2022). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização de *G. mellonella* em culturas de amostras clínicas e amostras de referência de *Leptospira* spp., visando incentivar sua implementação em estudos experimentais com leptospirose.

Material e métodos

1. Aquisição e manutenção das larvas

As larvas de *Galleria mellonella* foram adquiridas no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM), localizado no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense. O inseto era alimentado com dieta artificial à base de farinha de trigo integral, aveia, granola grossa, glicerina e mel a cada dois dias, conforme estabelecido no protocolo do laboratório. Para realização do experimento, eram utilizadas larvas adultas (L6), sem pontos escuros e apresentando boa motilidade de acordo com Pakroso et al. (2022).

2. Preparo do inóculo

Para o 1º experimento, foi utilizada uma cepa de referência de *L. interrogans* (sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Icterohaemorrhagiae), com elevada contaminação (1:3). Enquanto para o 2º experimento, foram aplicadas culturas clínicas com baixa concentração de *Leptospira* spp. obtidas do útero de bovinos. As bactérias estavam sendo cultivadas em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris suplementado com Difco *Leptospira* Enrichment EMJH (Becton Dick-inson, Sparks, MD, EUA) para a inoculação (Loureiro et al., 2015).

3. Inoculação e incubação das larvas

Os procedimentos para a inoculação foram realizados conforme descrito por Clavijo-Giraldo et al. (2016). Para o estudo, foram utilizadas 2 análises experimentais cada uma com 20 larvas, sendo estas subdivididas em quatro grupos (G1-G4), de acordo com o tempo de incubação das larvas. Antes do procedimento, a superfície corporal das larvas foi desinfetada

com etanol a 70%, posteriormente, foi inoculado um volume de 10 µL do inóculo na via intra hemocélica usando uma seringa de Hamilton e uma agulha calibre 30. As larvas foram acondicionadas em placas de Petri e incubadas em estufa a 37°C. Os grupos foram armazenados em estufa por 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora e meia.

4. Cultivo da hemolinfa em meio EMHJ

Após a incubação das larvas e desinfecção da superfície corpórea com etanol a 70%, foi coletado 20 µL de hemolinfa com auxílio de alicate e pipeta. A amostra coletada foi semeada em tubos contendo 5 mL de meio de cultura para *Leptospira* spp. O cultivo foi realizado em meio EMJH sem coquetel antimicrobiano (Loureiro et al., 2015).

5. Detecção de *Leptospira* spp. em larvas

As culturas provenientes da hemolinfa foram submetidas a avaliações em microscopia de campo escuro em intervalos entre 7 e 15 dias após a inoculação (Adler & Moctezuma, 2010).

Resultados

No 1º experimento, foi possível observar ausência de contaminação e presença de *Leptospira* spp. viáveis em cultura de referência após 14 dias de cultivo em meio EMJH sem Staff. Enquanto no 2º experimento, apesar de ter sido observada melanização em todas as larvas, nenhuma das culturas analisadas foi observado crescimento de *Leptospira* spp.

Discussão

O presente estudo demonstrou alguns avanços quanto à implementação de *Galleria mellonella* como biomodelo em pesquisas experimentais com *Leptospira* spp. No primeiro experimento do presente trabalho, a passagem *in vivo* em larvas de *G. mellonella* mostrou-se importante para limpeza e manutenção de uma cultura de referência empregada em análises sorológicas, tornando-a uma alternativa para ser analisada com intuito de recuperar amostras de *Leptospira* spp. contaminadas. Esse achado é importante quando se leva em consideração o fato dessas bactérias possuírem um crescimento lento e cultivo fastidioso (Loureiro et al., 2013). Nesse contexto, têm se buscado métodos alternativos visando a recuperação de cultivos de *Leptospira* spp., sendo *G. mellonella* uma opção a ser considerada em posteriores estudos.

No terceiro experimento utilizado nesse estudo, o resultado não foi satisfatório, apesar das larvas apresentarem melanização em investigação macroscópica, não houve sucesso no isolamento de *Leptospira* spp. Tal resultado pode ser atribuído ao fato das amostras

empregadas para inoculação terem apresentado baixo crescimento de *Leptospira* spp. e elevada contaminação, visto que se tratava de material clínico.

Inúmeros estudos associam as análises físicas e observações das colorações das larvas com possíveis estresses infecciosos (Ménard et al., 2021). Isso porque produção de melanina em larvas de *G. mellonella* são resultantes de uma resposta do sistema imunológico contra infecção, a ativação da cascata de melanização ocorre em resposta ao reconhecimento de microrganismos e é responsável pela deposição de melanina e processo de encapsulamento do patógeno, coagulação e opsonização (Wagley et al., 2017; Prakoso et al., 2022).

G. mellonella já foi empregada em diversos estudos como modelo de invertebrado, sendo amplamente utilizada para estudar interações patógeno-hospedeiro, bem como fatores de virulência de fungos e bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Campylobacter jejuni* (Wagley et al., 2017; Zhao et al., 2019; Curits et al., 2022). Esse inseto compartilha de similaridades com sistemas biológicos mais complexos. Apesar de não possuir um sistema imunológico adaptativo, a resposta imune inata possui inúmeras semelhanças ao dos mamíferos (Wagley et al., 2017). Ainda, as larvas podem ser mantidas a 37°C, equivalente a temperatura corporal dos hospedeiros, importante quando se refere à ativação da virulência de algumas bactérias (Ménard et al., 2021).

A escolha de *G. mellonella* em estudos experimentais com *Leptospira* spp. permitiria a redução do número de mamíferos utilizados, além de proporcionar a implementação de estudos em larga escala conforme realizado por Martinez et al. (2017) avaliando a virulência de diversas cepas *L. monocytogenes*. Ainda, pesquisas evidenciaram que, em alguns patógenos, os efeitos histopatológicos observados em *G. mellonella* são comparáveis aos observados em mamíferos, incluindo casos envolvendo *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium abscessus* (Tsai et al., 2016).

Vale ressaltar que invertebrados não necessitam de aprovação ética por não estarem inclusos na legislação de bem-estar animal e nas diretrizes éticas, enquanto para utilização de hamsters, comumente empregado para estudo experimental com leptospirose, isso não é observado (Barbosa et al., 2019; Prakoso et al., 2022). Além disso, a criação de insetos é menos dispendiosa e possui maior facilidade de manipulação. Nesse contexto, vale ressaltar *G. mellonella* emerge como um biomodelo valioso em pesquisas experimentais, proporcionando diversas vantagens, por razões financeiras, técnicas e éticas. Sua implementação em estudos com leptospirose otimizaria a obtenção de resultados e permitiria

análises mais complexas, embora esse biomodelo possua limitações de uso (Tsai et al., 2016; Pereira et al., 2020).

Apesar das pesquisas utilizando *G. mellonella* serem promissoras, ainda está em desenvolvimento e muitas lacunas estão mal elucidadas (Prakoso et al., 2022). Há necessidade de mais investigações visando determinar a aplicabilidade desse biomodelo em diferentes contextos experimentais.

Conclusão

As larvas de *G. mellonella* vêm sendo amplamente empregadas como modelo biológico em pesquisas experimentais referentes à patogênese, virulência de patógenos, bem como testagem de antimicrobianos. Embora não se trate de um substituto idêntico a modelos mamíferos, sua implementação proporciona vantagens éticas, financeiras e científicas. Contudo, é importante ressaltar que, apesar dos resultados obtidos até o momento serem encorajadores, os invertebrados apresentam um organismo rudimentar, que impossibilitam seu uso ideal para realizar comparações mais complexas. Além disso, a escassez de estudos sobre sua aplicação em pesquisas relacionadas à leptospirose é notável. Nesse contexto, a realização de estudos adicionais é crucial para a compreensão aprofundada e a padronização dessa abordagem.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado obrigatório constitui uma etapa fundamental para o crescimento profissional do aluno, sendo um momento imprescindível para se envolver em situações práticas que demandam a aplicação efetiva dos conhecimentos adquiridos durante a jornada acadêmica. As orientações fornecidas durante o estágio desempenham um papel crucial nesse processo, servindo como guias influenciando no direcionamento para a área de interesse. A interação com profissionais experientes e a imersão em situações práticas, proporcionam uma compreensão mais abrangente do campo de atuação.

No período de ESO, foi possível aprofundar os conhecimentos a respeito da leptospirose e seus métodos diagnóstico. Além disso, ao integrar-se à rotina de um laboratório de bacteriologia veterinária, bem como nas pesquisas em andamento, propiciou significativamente para a qualificação e o aprimoramento do aluno, sobretudo, no que se refere à Medicina Veterinária Preventiva.

4. REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. V. 140, n. 3-4, p. 287- 296, 2010.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M.F.; BOER, K.R.; AHMED, N; HARTSKEERL, R.A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **Plos one**, 4(9): e7093, 2009.
- AYMÉE, L.; DI AZEVEDO, M.; BORGUES, A.; CARVAHO-COSTA, A.; LILENBAUM, W. *Leptospira* spp. cepas associadas à Leptospirose Genital Bovina (BGL). **Microbial Pathogenesis**, v. 173, p. 105841, 2022.
- AYMÉE, L.; DI ZEVEDO, M.; PEDROSA, J.; DE MELO, J.; CARVALHO-COSTA, F.; LILENBAUM, W. The role of *Leptospira santarosai* serovar Guaricura as agent of Bovine Genital Leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 268, p. 109413, 2022.
- AYMÉE, L.; ZAMBRANO, J.; ESCALONA, R.; PALHARES, K.; DI AZEVEDO, M.; LILENBAUM, W. *Leptospira* spp. strains associated with Bovine Genital Leptospirosis (BGL). **Microbial Pathogenesis**, 2022.
- BARBOSA, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Infeciosidade e virulência de cepas de leptospiras do sorogrupo Sejroe diferente de Hardjo em hamsters infectados experimentalmente. **Revista Brasileira de Microbiologia**, 2019.
- BARBOSA, C.; OLIVEIRA, A.; MENDES, J.; RISTOW, P; LILENBAUM, W. Padronização da infecção uterina crônica de hamsters por *Leptospira santarosai* sorovar Guaricura, do sorogrupo Sejroe. **Comunicações de pesquisa veterinária**, 2023.
- BIELANSKI, A.B.; SURUJBALLI, O. Association of *Leptospira borgpetersenii* sorovar hardjo type hardjobovis with bovine ova and embryos produced by in vitro fertilization. **Theriogenology**, 46:45-55, 1996.
- CLAVIJO-GIRALDO, D. M.; MATÍNEZ-ALVAREZ, J. A.; LOPES-BEZERRA, L. M.; PONCE- NOYOLA, P.; FRANCO, B.; ALMEIDA, R. S.; MORA-MONTES, H. M. Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, 122, 73–77, 2016.
- CORTIZO, P.; LOUREIRO, A.; MARTINS, G.; RODRIGUES, P; FARIA, B.; LILENBAUM, W.; DEMINICIS, B. Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 231–235, 2014.

CURTIS, A.; ULRIKE, F.; KAVANAGH, K.; Larvas da *Galleria mellonella* como modelo para investigação de fungos-hospedeiros Interações. Frente. **Biol Fúngico**, 2022.

DELGADO, G. B.; CUNHA, R.; VASCONCELLOS, F.; SILVA, E. A leptospirose bovina e sua importância na saúde única: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e58311326702, 2022.

DI AZEVEDO M.; LILENBAUM W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. **Lett Appl Microbiol**, 72(5):496-508, 2021.

DI AZEVEDO, M. & LILENBAUM, W. Leptospirose genital equina: evidência de uma importante síndrome reprodutiva crônica silenciosa. **Theriogenology** 192, 2022.

DI AZEVEDO, M. & LILENBAUM, W. Uma visão geral sobre o diagnóstico molecular da leptospirose animal, **Letters in Applied Microbiology**, Volume 72, Edição 5, páginas 496–508, 2021.

DI AZEVEDO, M. I. N. & Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. **Lett Appl Microbiol**, 72(5):496-508, 2021.

DI AZEVEDO, M. I. N.; PIRES, B.; BARBOSA, L.; CARVALHO-COSTA, F.; LILENBAUM, W. Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows. **Veterinary Record**, v. 188, n. 9, 2021.

DI AZEVEDO, M.; AYMÉE, L.; BORGES, A.; LILENBAUM, W. Epidemiologia Molecular de *Leptospira* spp. Patogênica Infectando cães na América Latina. **Animals** 13, 2422, 2023.

DIRECTOR, A.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LOUREIRO, A.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M.; LILENBAUM, W. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 1234–1236, 2014.

GRILLOVÁ, L.; ANGERMEIER, H.; LEVY, M.; GIARD, M.; LASTÈRE, S.; PICARDEU, M. Circulating genotypes of *Leptospira* in French Polynesia: A 9-year molecular epidemiology surveillance follow-up study. **PLoS Negl Trop Dis**. 14(9): e0008662, 2020.

HAMOND, C., MARTINS, G., LAWSON-FERREIRA, R., MEDEIROS, M. A. & LILENBAUM, W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. **Epidemiology and Infection** 15, 1-3, 2012.

HAMOND, C; PESTANA, C. P; SOUZA, C. M. R; CUNHA, L. E. R; BRANDÃO, F. Z; MEDEIROS, M. A; LILENBAUM, W. Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3-4, p. 264–269, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K.; MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol.** vol, 35(6):1547-1549, 2018.

LILENBAUM, W.; MORAIS, Z.; GONÇALES, A.; SOUZA, G.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S.; First isolation of leptospire from dairy goats in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2007.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, 837–842, 2008.

LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. **Theriogenology**, v. 141, p. 41–47, 2020.

LOUREIRO, A.; JAEGER, L.; DI AZEVEDO, M.; MIRAGLIA, F.; MORENO, L.; MORENO, A.; PESTANA, C.; COSTA, F.; MEDEIROS, M.; LILEMBAUM, W. Molecular epidemiology of *Leptospira noguchii* reveals important insights into a One Health context. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 1, p. 276–283, 2020.

LOUREIRO, A.; JAEGER, L.; DI AZEVEDO, M.; MIRAGLIA, F.; MORENO, L.; MORENO, A.; PESTANA, C.; COSTA, F.; MEDEIROS, M.; LILEMBAUM, W. Molecular epidemiology of *Leptospira noguchii* reveals important insights into a One Health context. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 1, p. 276–283, 2020.

LOUREIRO, A.; MARTINS, G.; THOMÉ, S.; LILEMBAUM, W. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 3, 2013.

LOUREIRO, A.; MARTINS, G.; THOMÉ, S.; LILEMBAUM, W. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, n.3, 2013.

LOUREIRO, A.P.; MARTINS, G.; PINTO, P.; NARDUCHE, L.; TEIXEIRA, R.C.; LILENBAUM, W. Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospire from bovine clinical samples. **Applied Microbiology**, Volume 61, Issue 6, Pages 603–606, 2015.

MATINS & LILEMBAUM. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. **BMC Veterinary Research**, 2013.

MÉ`NARD, G.; ROUILLON, A.; CATTOIR, E.; DONNIO, P. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021.

MORAIS, D.; JÚNIOR, D.; NUNES, B.; COSTA, D.; VIANA, M.; SILVA, J.; HIGIDO, S.; AZEVEDO, S.; ALVES, C. Leptospirose em asininos (*Equus asinus*) destinados ao abate **Patogênese Microbiana** , v. 173, p. 105841, 2022.

PEREIRA, M.; ROSSI, C.; SILVA, G.; ROSA, J.; BAZZOLLI, D. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application, **Pathogens and Disease**, Volume 78, Issue 8, 2020.

PEREIRA, P.; Di AZEVEDO, M.; BORGES, A.; LOUREIRO, A.; MARTINS, G.; CARVALHO-COSTA, F.; SOUZA-FABJAN, J.; LILENBAUM. Bovine genital leptospirosis: Evidence of ovarian infection by *Leptospira interrogans*. **Veterinary Microbiology**, v. 271, p. 109489, 2022.

PRAKOSO, D.; ZHU, X.; RAJEEV, S. Modelo de infecção por *Galleria mellonella* para avaliar cepas patogênicas e não patogênicas de *Leptospira*. **Veterinary Microbiology**, 263, 2022.

ROCHA, B.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Uma visão histórica da infecção experimental por leptospirose em ruminantes. **Imunologia Comparada, Microbiologia e Doenças Infeciosas**, 73, 2020.

SANTANNA, R.; DI AZEVEDO, M.; BORGES, A.; CARVALHO-COSTA, F.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Persistent High Leptospiral Shedding by Asymptomatic Dogs in Endemic Areas Triggers a Serious Public Health Concern. **Animals**, 2021.

SILVA, J.; VIANA, M.; CALADO, L.; LIMA, A.; ALVES, F.; PINHEIRO, R.; COSTA, D.; SILVA, G.; AZEVEDO, S.; ALVES, C. Cross-sectional survey for sheep leptospirosis in the northeast region of Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 197, 2021.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 64(3):247-255. 2009.

TAO, S.; DUMA, L.; ROSSEZ, Y. *Galleria mellonella* como um bom modelo para estudar a patogênese do *Acinetobacter baumannii*. **Patógenos**, 2021.

TSAI, C.; LOH, J.; PROFT, T. modelos de infecção por *Galleria mellonella* para o estudo de doenças bacterianas e para testes de medicamentos antimicrobianos, **Virulence**. 2016.

WAGLEY, S.; BORNE, R.; HARRISON, J.; BAKER-AUSTIN, C.; OTTAVIANI, D.; LEONI, F.; VUDDHAKUL, V.; TITBALL, R. *Galleria mellonella* como modelo de infecção para investigar a virulência de *Vibrio parahaemolyticus*. **Virulence**, 9:1, 197-207, 2018.