

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Desenvolvimento de um ELISA com a proteína recombinante LigBrep para o diagnóstico de leptospirose

Caroline Amurim da Silva Gonçalves

Pelotas, 2017

Caroline Amurim da Silva Gonçalves

Desenvolvimento de um ELISA com a proteína recombinante LigBrep para o diagnóstico de leptospirose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Alan John Alexander McBride

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G635d Gonçalves, Caroline Amurim da Silva

Desenvolvimento de um Elisa com a proteína recombinante LigBrep para o diagnóstico de leptospirose / Caroline Amurim da Silva Gonçalves ; Alan John Alexander McBride, orientador. — Pelotas, 2017.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Imunodiagnóstico. 2. Canino. 3. Humano. 4. Elisa indireto. I. McBride, Alan John Alexander, orient. II. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Profa. Dra. Samira Bührer (Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública)

Dra. Paula Finger (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Para os meus pais, com carinho e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Delmar e Cláudia, e ao meu irmão Vinícius, pelo amor, apoio, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos a mim.

Ao Diego, por todo o amor, paciência e incentivo. Obrigada por apoiar minhas decisões;

Ao meu orientador, Prof. Alan John Alexander McBride, pelos incentivos e aprendizagens desde a minha graduação;

A todos os meus colegas do LPDI, pelas inúmeras contribuições nas atividades do laboratório, além da amizade e pelo convívio agradável;

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de pós-graduação com alta qualidade e com professores comprometidos com os seus ofícios;

A todos os funcionários do Núcleo de Biotecnologia, pela amizade e pelo aprendizado;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Resumo

GONÇALVES, Caroline Amurim da Silva. **Desenvolvimento de um ELISA com a proteína recombinante LigBrep para o diagnóstico de leptospirose.** 2017. 68f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirose é uma zoonose causada pela infecção de espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Possui como portadores da bactéria, os animais selvagens e domésticos. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, por contraírem a leptospirose a partir de uma fonte de infecção animal, principalmente através dos caninos. São reportados, anualmente, mais de 1 milhão de casos severos de leptospirose no mundo, resultando em aproximadamente 59 mil mortes. O teste de diagnóstico considerado padrão para leptospirose é o Teste de microaglutinação (MAT). Porém, o MAT apresenta limitações, como a dificuldade na execução, pois necessita do cultivo de cepas vivas, além de ser um teste subjetivo e apresentar baixa sensibilidade na fase aguda da doença. Dessa forma, existe a necessidade no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, que sejam mais rápidos e eficazes. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um Teste Imunoenzimático (ELISA) baseado na detecção de anticorpos IgG e IgM nos soros humanos e caninos, utilizando como antígeno a proteína rLigBrep e a rLipL32. Na análise dos soros humanos individuais com o uso do anticorpo IgM os resultados de sensibilidade e especificidade foram de 87,0% e 100%, respectivamente. Com o anticorpo IgG o valor de sensibilidade do teste foi de 92,7% e a especificidade de 71,4%. Dentre os testes com soros caninos avaliando o anticorpo IgG, com a proteína rLigBrep os resultados foram de 99,2% e 95,5% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Avaliando os mesmos soros caninos com a proteína rLipL32, o valor de sensibilidade foi de 90% e especificidade do teste foi de 91%. O valor da análise Kappa dos testes caninos com as proteínas rLigBrep foi de 0,94 e com a rLipL32 foi de 0,790, demonstrando alta concordância com o teste de diagnóstico padrão. Com isso, o teste de ELISA com a proteína rLigBrep apresenta resultados mais promissores do que a proteína rLipL32, sendo uma proteína importante no auxílio para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos para leptospirose.

Palavras-chaves: Imunodiagnóstico. Canino. Humano. ELISA indireto.

Abstract

GONÇALVES, Caroline Amurim da Silva. **Development of an ELISA with recombinant LigBrep protein for the diagnosis of leptospirosis. Development of an ELISA with recombinant LigBrep protein for the diagnosis of leptospirosis.** 2017. 68f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a zoonosis caused by infection of pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. It possesses as carriers of the bacterium, wild and domestic animals. Humans are considered accidental hosts because they contract leptospirosis from a source of animal infection, mainly through the canines. More than 1 million severe cases of leptospirosis worldwide are reported annually, resulting in approximately 59,000 deaths. The standard diagnostic test for leptospirosis is the Micro Agglutination Test (MAT). However, the MAT has limitations such as difficulty in execution, since it requires the cultivation of live strains, it is a subjective test and has low sensitivity in the acute phase of the disease. Thus, there is a need to develop new diagnostic tests that are faster and more effective. The objective of this study was to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the detection of IgG and IgM antibodies in human and canine sera using rLigBrep and rLipL32 as the antigen for the diagnosis of human and canine leptospirosis. In the analysis of the individual human sera with IgM antibody the sensitivity and specificity were 87.0 and 100%, respectively. With the IgG antibody the sensitivity of the test was 92.7% and the specificity was 71.4%. In the tests with canine sera, IgG antibody and rLigBrep the results were 99.2 and 95.5% sensitivity and specificity, respectively. Evaluating the same canine sera with the rLipL32 protein, the sensitivity was 90% and specificity was 91%. The Kappa analysis of the canine tests with rLigBrep was 0.94 and with rLipL32 it was 0.790, demonstrating high agreement with the standard diagnostic test. Thus, the ELISA test with the rLigBrep protein presents more promising results than the rLipL32 protein, being an important protein in the aid for the development of new diagnostic tests for leptospirosis.

Key-words: Immunodiagnosis. Canine. Human. Indirect ELISA.

Lista de figuras

Figura 1. Resultados obtidos pelos testes de padronização. A: 50 ng de rLigBrep. B: 100 ng de rLigBrep. Diluição seriada de soros e diluição do anticorpo anti-IgG canino.	37
Figura 2. Avaliação dos soros caninos por ELISA indireto após a padronização com a proteína rLigBrep.....	38
Figura 3. Avaliação individual dos soros caninos pelo ELISA indireto com o cut-off estabelecido através da curva ROC com a proteína rLigBrep.	39
Figura 4. Resultados obtidos pelos testes de padronização. A: 50 ng de rLipL32. B: 100 ng de rLipL32. Diluição seriada de soros e diluição do anticorpo anti-IgG canino.	40
Figura 5. Avaliação dos soros caninos individuais após a padronização do ELISA indireto com a proteína rLipL32.....	41
Figura 6. Avaliação individual dos soros caninos com o cut-off estabelecido através da curva ROC com a proteína rLipL32.....	42
Figura 7. Padronização com a quantidade de 50 ng da proteína rLigBrep utilizando soros humanos diluídos e avaliando anticorpo anti-IgM humano.....	43
Figura 8. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano.....	44
Figura 9. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano com cut-off definido pela curva ROC.	44
Figura 10. Padronização com a quantidade de 50 ng da proteína rLigBrep utilizando soros humanos diluídos e avaliando anticorpo anti-IgG humano.	45
Figura 11. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano. Cut-off: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.	46
Figura 12. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano com valor de cut-off estabelecido pela curva ROC.	46
Figura 13. Resultados utilizando o anticorpo antibacterina (coelho) em diluição seriada de 1:50 a 1:1600 e diluição do anticorpo antibacterina (rato) de 1:50 a 1:3200. A: amostra positiva (10^5 leptospiras/mL). B: amostra negativa (PBS).....	47
Figura 14. Combinação entre anticorpo de captura antibacterina (coelho) diluído em 1:6000 a 1:7986 e de diferentes anticorpos de detecção diluídos em 1:5000, usando a amostra positiva (10^5 leptospiras/mL).	48

Figura 15. Combinação entre anticorpo antibacterina (rato) na diluição seriada de 1:50 a 1:1600 e do anticorpo 1D9 (anti-LipL32) diluídos em 1:50 a 1:3200, usando a amostra positiva (10^5 leptospiras/mL) 49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados dos MAT com soros caninos realizados pela FIOCRUZ-BA e LPDI	34
Tabela 2. Resultados do MAT realizado pelo LPDI.....	56

Lista de abreviaturas

E. coli - *Escherichia coli*

EIE – IgM – ELISA baseado em célula inteira de *Leptospira*

EMJH - Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH)

IC 95 – Intervalo de confiança 95%

Lig - Leptospiral immunoglobulin-like

MAT – Micro agglutination test (Teste de Microaglutinação)

OPD - O-phenylenediamine (O-fenilenodiamnina)

pAE – Vetor de expressão bacteriano

PBS-T – Phosphate buffered saline with Tween 20 (Tampão Fosfato-salino com Tween 20)

ROC – Receiver Operator Characteristic (Operador Receptor Característica)

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

Sumário

2.1. <i>Leptospira</i> spp.....	14
2.2. Etiologia e Epidemiologia	15
2.3. Controle	16
2.4. Relação entre cães e humanos.....	17
2.5. Patogênese	19
2.6. Manifestações Clínicas	21
2.7. Tratamento.....	22
2.8. Diagnóstico	23
2.8.1. Cultura da bactéria.....	23
2.8.2. Teste de microaglutinação (MAT)	24
2.8.3. Testes rápidos	24
2.8.4. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA).....	25
2.8.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
3.1. Hipótese.....	27
3.2. Objetivo Geral	27
3.3. Objetivos específicos:	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1. Materiais e Métodos	28
4.1.1. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes	28
4.1.2 Teste de microaglutinação (MAT)	29
4.1.3. Banco de soros humanos	29
4.1.4. Banco de soros caninos.....	30
4.1.5 Cultivo de <i>L. interrogans</i>	30
4.1.6. Protocolo padrão para realização dos ELISAs indireto	31
4.1.7. Protocolo padrão para realização dos ELISAs de captura.....	31
4.1.8. Análise estatística	32
4.1.8.1 Sensibilidade	32
4.1.8.2 Especificidade.....	32
4.1.8.3 Intervalo de confiança 95 (IC95)	32
4.1.8.4 Cut-off padrão	33
4.1.8.5 Curva ROC (<i>receiver operator characteristic curve</i>)	33
4.1.8.6 Análise de concordância - Kappa	33
4.1.8.7 Valor Preditivo Positivo (VPP)	33

4.1.8.8 Valor Preditivo Negativo (VPN)	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Resultados do teste MAT	35
5.2. Ensaios de padronização do ELISA com soros caninos utilizando rLigBrep ..	36
5.3. Avaliação individual de soros caninos utilizando a proteína rLigBrep	37
5.4. Avaliação individual de soros caninos através da curva ROC com a proteína rLigBrep	38
5.5. Ensaios de padronização do ELISA indireto com soros caninos utilizando rLipL32	39
5.6. Avaliação individual de soros caninos utilizando a proteína rLipL32	40
5.7. Avaliação individual de soros caninos através do ROC com a proteína rLipL32	41
5.8. Resultados da padronização do ELISA indireto com a proteína rLigBrep com soros humanos e anticorpo anti-IgM humano	42
5.9. Avaliação individual de soros humanos utilizando a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano	43
5.10. Avaliação individual de soros humanos através do ROC com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano	44
5.11. Resultado da padronização do ELISA indireto com a proteína rLigBrep com soros humanos e anticorpo anti-IgG humano	45
5.12. Avaliação individual de soros humanos utilizando a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano	45
5.13. Avaliação individual de soros humanos através do ROC com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano	46
5.14. Resultados do ELISA de captura	47
5.15. Análise de Concordância – Kappa	49
7. DISCUSSÃO GERAL	50
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	54
9. ANEXOS	55
10. REFERÊNCIAS	60

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Leptospira* spp.

Os agentes causadores da leptospirose são bactérias que pertencem à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*. Compreendem 22 espécies, sendo 10 espécies patogênicas: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi*, *L. alstonii* e *L. mayottensis*, cinco espécies intermediárias: *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae* e sete espécies saprófitas: *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii* e *L. yanagawae*, com mais de 260 sorovares patogênicos e mais de 60 sorovares saprófitas (Bourhy et al., 2014, Adler and de la Pena Moctezuma, 2010, Levett, 2001).

As leptospiras patogênicas têm a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, já as espécies intermediárias foram isoladas de humanos e animais infectados que podem ser a causa de uma variedade de manifestações clínicas diferentes do habitual e as *leptospiras* saprófitas são bactérias presentes no ambiente incapazes de infectar animais e humanos (Adler, 2015).

As *leptospiras* são bactérias Gram-negativas, composta por uma membrana externa e interna e uma parede celular de peptidoglicano associado a membrana interna (Dellagostin et al., 2011). Os polissacarídeos (LPS) estão presentes na membrana externa e são as variações dos carboidratos que compõem os LPS que determinam os diversos tipos de sorovares existentes (Cerqueira and Picardeau, 2009). Outras proteínas de membrana junto com os LPS, constituem os principais fatores de virulência da bactéria (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010).

Leptospiras são bactérias aeróbicas obrigatórias com temperatura ótima de crescimento variando entre 28-30 °C. Possuem de 6-20 µm de comprimento, 0,1 µm de diâmetro, e dois flagelos localizados em cada extremidade, encontrados imersos no espaço periplasmático, diferente da maioria das bactérias. Alterações morfológicas, como o característico formato de gancho é devido as rotações que os flagelos induzem, o que permite a mobilidade das *leptospiras* em ambientes aquosos (Levett, 2001, Bharti et al., 2003).

As bactérias crescem em meio enriquecido com sais de amônio, vitaminas B1 e B12 e ácidos graxos de cadeia longa. Esses ácidos graxos são a única fonte de carbono (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). O principal meio para crescimento de *Leptospira* spp, é o Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH), composto por ácido oleico, polisorbato 80 e albumina sérica bovina, podendo ser suplementado com soro de coelho e piruvato. Para inibir o crescimento de contaminantes, podem ser adicionados 5-fluorouracilo, gentamicina, ácido nalidíxico e rifampicina (Faine et al., 1999).

2.2. Etiologia e Epidemiologia

Leptospirose é uma zoonose de distribuição global, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, uma bactéria Gram-negativa sendo um sério problema de saúde pública no mundo (Bharti et al., 2003, Desvars et al., 2011, Fornazari et al., 2012, Jorge et al., 2015). É uma doença endêmica em países tropicais, devido as condições geoclimáticas e sociais, favorecendo a transmissão e contribuindo com o aumento da incidência (Guerra, 2013). Além disso, algumas profissões, incluindo veterinários, agricultores, açougueiros, pescadores, trabalhadores de matadouros e de manutenção de esgoto, tem maior risco de infecção pela bactéria (Alavi and Khoshkho, 2014).

A maioria dos animais, incluindo selvagens, domésticos e os humanos, podem ser afetados pela leptospirose (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Como um animal reservatório típico, os roedores carregam *L. interrogans* em seus rins que são excretadas pela urina, contaminando o ambiente (Xue et al., 2010). Humanos e animais, como os cães, suínos e bovinos, podem ser infectados por *leptospirosas* através do contato direto ou indireto com água, urina e solo contaminados ou através do contato com animais infectados (Brownlow et al., 2014). As bactérias penetram no hospedeiro por meio de abrasões na pele ou pelas membranas mucosas, disseminando rapidamente através do sangue até invadir órgãos e tecidos (King et al., 2014).

Foi estimando, no ano de 1999, que o número de casos de leptospirose no mundo era de mais de 500 mil ao ano, resultando em 50 mil casos fatais (OMS, 1999). Em 2014, o número aumentou para 873 mil casos por ano com 49 mil obtidos

causados por leptospirose (Picardeau et al., 2014). No ano de 2015, a estimativa de casos aumentou para 1.03 milhões e 58,9 mil mortes ao redor do mundo. A maior proporção de casos e mortes ocorre no sexo masculino na faixa etária de 20-49 anos de idade (Costa et al., 2015).

No Brasil, a leptospirose é endêmica durante o ano todo, atingindo todas as regiões, tornando-se epidêmica quando associada a índices pluviométricos elevados decorrentes de enchentes, especialmente em aglomerações urbanas de baixa renda, condições precárias de infraestrutura sanitária e presença de altas populações de roedores. No período entre os anos 2000-2010, a média anual de casos no Brasil foi de 3.438, totalizando 146.803 casos, sendo 37.824 confirmados e 4.029 óbitos, com taxa de incidência no país de 1,8/100 mil habitantes. Entre esses anos, os casos foram concentrados nos estados do Sudeste e Sul, representando 69,1% do total do país. Entre os anos 2010-2014 foram confirmados 20.810 casos de leptospirose, com média anual de 4.162 casos confirmados e 1.694 óbitos, representando uma taxa de incidência média de 2,1/100 mil habitantes. Os Estados com maior número de casos da doença foram observados novamente no Sudeste e Sul (Ministério da Saúde, 2016).

2.3. Controle

O controle a nível de saúde pública, deveria ser voltado para os principais reservatórios de *leptospiras* nas cidades (ratos e cães) e nas áreas rurais (roedores selvagens, gado e gambá). Sendo necessárias para isso, algumas medidas preventivas: remoção de lixo em áreas urbanas, afastar ratos de rios e riachos para prevenir a contaminação de águas e melhorar o saneamento básico (Ricaldi and Vinetz, 2006, McBride et al., 2005). Porém, os programas de erradicação da doença, geralmente são em locais de grande aglomeração de pessoas e em populações de baixa renda, fazendo com que aumente a probabilidade de transmissão da doença para humanos (Talpada et al., 2003).

A vacinação também é uma forma de prevenção da doença. Podem ser eficazes contra os sorovares mais prevalentes em uma determinada espécie em cada região (Subharat et al., 2011). Porém, o controle da leptospirose é diferente para cada espécie de hospedeiro e para cada sorogrupo de *Leptospira* (Mughini-Gras et al.,

2014). A vacina mais comumente utilizada para leptospirose é composta por bacterina, amplamente utilizada para uso veterinário e permitida em alguns países, para uso em humanos (Ricaldi and Vinetz, 2006).

Nessa vacina, não estão inclusos todos os sorovares importantes, permitindo que sorovares de outra espécie possam infectar animais supostamente protegidos, tornando os humanos suscetíveis a infecção através do contato direto ou indireto com a fonte contaminada (Ricaldi et al., 2012). As vacinas comerciais são mundialmente disponíveis para bovinos, suínos e caninos. A maioria das vacinas bovinas possuem em sua formulação, pelo menos o sorovar Hardjo. Já as vacinas caninas possuem geralmente os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. Na Europa, foi acrescentada na vacina os sorovares Grippotyphosa, Australis e Sejroe. As vacinas suínas em geral incluem um ou mais dos sorovares Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Canicola e Icterohaemorrhagiae, sabendo que o sorovar Bratislava é relatado como sendo abortivo nesses animais (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010, Ellis, 2010).

Para uso em humanos, esse tipo de vacina apenas é permitido nos seguintes países: Cuba, Japão, China e França. Seu uso é limitado devido a vários fatores: efeitos colaterais, sorovar-específico e a necessidade de reforços de imunizações para manter os títulos de anticorpos protetores. Além disso, quando uma população é vacinada, sorovares não incluídos na preparação vacinal, podem causar novos surtos (Dellagostin et al., 2011, Hartskeerl et al., 2011). Cães imunizados podem ser infectados com sorovares diferentes dos contidos nas vacinas, podendo transmitir leptospirose para os humanos (Prescott, 2008). Sendo assim, um programa de vacinação bem-sucedido, exige estudos epidemiológicos contínuos para avaliar a incidência de diferentes sorovares em uma determinada região (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010).

2.4. Relação entre cães e humanos

Os cães são continuamente expostos a diversos fatores de risco, pois possuem acesso livre a ambientes contaminados (Miraglia et al., 2012). Os sorovares mais prevalentes em caninos são Canicola e Icterohaemorrhagiae (Jorge et al., 2015). Estudos realizados em São Paulo e na Bahia, mostram que a maioria dos casos de leptospirose humana são causadas pelo sorogrupo Icterohaemorrhagiae, onde o

sorovar predominante é o Copenhageni (Blanco et al., 2016). Dessa forma, os caninos são considerados reservatórios de grande importância para a infecção em humanos em muitos países tropicais, incluindo o Brasil (Oliveira et al., 2010). Estudos realizados no Sul do País, demonstram que não há a prevalência de um sorovar, encontrando amostras positivas para diversos sorovares, como: Hardjobovis, Wolffi, Grippotyphosa, Canicola, Copenhageni, Australis, Bratislava e Pomona (Topazio et al., 2015).

Os caninos são hospedeiros de *L. interrogans* sorogrupo Canicola (Kamath et al., 2014). Em relação a sororeatividade a Icterohaemorrhagiae, está relacionado ao contato direto ou indireto de cães com roedores, o maior reservatório deste sorogrupo e o mais importante nas áreas urbanas (Munoz-Zanzi et al., 2014). O sorogrupo Australis pode ser associado com a doença severa em caninos e é o segundo mais comum em causar leptospirose em cães (Major et al., 2014, Schuller et al., 2015). A reação com o sorogrupo Ballum é a mais comum entre os caninos não vacinados, devido a exposição com ratos e camundongos que são hospedeiros desse sorogrupo. Esses sorogrupos têm grande importância na leptospirose humana em muitas partes do mundo (Thornley et al., 2002, Vieira et al., 2006, Storck et al., 2008). Dessa forma, os cães podem servir como indicadores da presença destes sorogrupos no ambiente (Schuller et al., 2015).

Esses animais são importantes para a patogênese da leptospirose podendo transmitir a doença para humanos através da disseminação desses sorovares através da urina infectada (Jorge et al., 2015, Lelu et al., 2015). Em cães, a forma mais comumente reconhecida da doença é a subaguda, porém a maioria das infecções em caninos são crônicas e subclínica e assim colocando em risco de infecção as pessoas pelo contato com cães doentes e por aqueles animais subclinicamente infectados (Cameron et al., 2008).

Seria de grande utilidade, se os veterinários fossem obrigados a relatar casos caninos de leptospirose às autoridades de saúde pública, pois isso poderia auxiliar sobre o risco de leptospirose para os humanos e consequentemente na prevenção da doença (Bleich and Nicklas, 2008).

2.5. Patogênese

As *leptospiros* possuem a capacidade de penetrar a pele através de pequenas abrasões ou cortes e pelas membranas mucosas, como as mucosas nasais e bucais. A fase inicial da doença começa depois da entrada das bactérias no hospedeiro, com a rápida multiplicação de *leptospiros* no sangue, fenômeno conhecido por leptospiremia (Barocchi et al., 2002). O alto nível de *leptospiros* no sangue e tecidos provocam lesões devido a ação de toxinas ou de componentes celulares tóxicos, começando a aparecer os sintomas da doença no hospedeiro (Ko et al., 2009, Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). As *leptospiros* possuem um mecanismo característico para evasão do sistema imune inato, durante a fase inicial da infecção. Isso acontece devido à resistência ao sistema complemento, através do recrutamento do Fator H para a superfície bacteriana, mediado por proteínas Len (*leptospiral endostatin like*) como a LenA e LenB que adquirem o Fator H do complemento ou através de C4BP (complemento de ligação C4b hospedeiro cadeia alfa da proteína) que liga-se a superfície de *leptospira*, promovendo a inibição do sistema complemento (Stevenson et al., 2007, Barbosa et al., 2010).

Após a infecção se instalar no hospedeiro, pode ocorrer a evolução para uma doença aguda, resultando no desenvolvimento da imunidade protetora, na eliminação do agente causador da doença ou o hospedeiro pode desenvolver o estado de portador crônico (Athanazio et al., 2008). Após a fase inicial, essas bactérias através de sua motilidade, migram para órgãos como rins, pulmões e fígado (Lambert et al., 2012). Nos rins, o lúmen dos túbulos renais é o local onde a concentração de anticorpos é baixa, tornando um local ideal para as *leptospiros* conseguir escapar do sistema imune (Faine et al., 1999). Os rins que apresentam colonização por *leptospiros* exibem nefrite túbulo-intersticial, necrose tubular e hemorragias (Nally et al., 2004). No fígado, as *leptospiros* causam dano hepatocelular, com perda tecidual e inflamação (Faine et al., 1999). Já o dano pulmonar ocorre devido a hemorragias intra-alveolares, resultando em insuficiência respiratória (Pereira et al., 2005, Gouveia et al., 2008).

2.5.1. Fatores de virulência

A membrana das *leptospiros* são compostas por lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e peptidoglicanos (Cullen et al., 2005). Os LPS presentes nas *leptospiros*, ativam nas células humanas os receptores TLR2 e em camundongos, ativam os receptores TLR2 e TLR4, indicando diferenças espécie-específica em relação a ativação dos receptores, demonstrando um papel importante na patogênese da doença (Yang et al., 2006). Os peptidoglicanos das *leptospiros* induzem a liberação do fator alfa necrose tumoral (TNF- α) de monócitos através de efeitos endotóxicos.

As lipoproteínas são componentes fundamentais das membranas de *leptospiros*, contendo mais de 145 genes que codificam para prováveis lipoproteínas e OMPs (Viratyosin et al., 2008, Yang et al., 2006). Entre elas se destacam: a leptospiral immunoglobulin-like (Lig) , Loa22, LipL32, OmpL1, LenA, LenD, OmpL36, OmpL37, OmpL47 e OmpL54 (Ko et al., 2009, Lo et al., 2009). Em relação as Ligs, as proteínas LigA, presente apenas nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, e LigB que são expressas em todas as espécies patogênicas de *Leptospira*, possuem a capacidade de se aderir a fibronectina, colágeno e laminina, servindo como adesinas no processo de colonização dos tecidos nos hospedeiros (Matsunaga et al., 2003, Choy et al., 2007). O polipeptídeo LigBrep, é uma região idêntica compartilhada entre as proteínas LigA e LigB, presentes na membrana externa da bactéria e consequentemente, são reconhecidas por soros de pacientes com a doença (Croda et al., 2007).

A lipoproteína Loa22 é um fator de virulência exposta na superfície bacteriana, é reconhecida por soros de pacientes com leptospirose, tem sua maior expressão na infecção aguda e está presente em *L. biflexa* (Gamberini et al., 2005, Ristow et al., 2007, Picardeau, 2008). A LipL32 está presente na superfície celular e representa 75% das proteínas da membrana externa (Haake, 2000, Cullen et al., 2002). É altamente conservada entre as *leptospiros* patogênicas e não está presente em *L. biflexa*, sendo expressa durante a infecção aguda letal (Haake et al., 2004, Nally et al., 2007).

2.6. Manifestações Clínicas

A infecção por *leptospiros* em animais são na maioria subclínicas. Porém, as formas clínicas da doença são observadas principalmente em dois grupos de animais: o primeiro são os animais jovens, que podem apresentar sinais agudos graves da doença, caracterizados por icterícia, hematúria, hemoglobinúria, meningite, dano renal e até a morte. O segundo grupo se refere as fêmeas prenhas ou lactantes, podendo apresentar agalactia e perdas econômicas (Melo et al., 2011).

Os sinais clínicos de leptospirose em cães não são específicos (Levett et al., 2005). As manifestações clínicas em animais domésticos podem ser febre, injúria, insuficiência renal e hepática, hemorragia pulmonar e falência reprodutiva (Blum Dominguez Sdel et al., 2013). É uma doença com grande importância por afetar a produtividade resultando em fraqueza, aborto e até a morte (Dey et al., 2007).

Em cavalos, a leptospirose é frequentemente associada a abortos e a uveíte recorrente equina, porém os sinais clínicos não são específicos, o que dificulta no diagnóstico (Levett et al., 2001, Palaniappan et al., 2007). A leptospirose bovina resulta em grandes perdas econômicas na indústria pecuária, principalmente por causar abortos, natimortos, infertilidade, redução na produção de leite e diminuição do ganho de peso diário (Monte et al., 2015, Villanueva et al., 2016). Em ovinos, a leptospirose pode causar perda de apetite, febre, irritabilidade, eriçamento de pelos, olhos vermelhos, diarreia, deficiência renal crônica, abortos, natimortos e em rebanhos leiteiros, pode haver alteração no fluxo e na qualidade do leite (Faine et al., 1999, Melo et al., 2011).

Nos humanos as manifestações podem variar de acordo com a virulência do sorovar infectante, número de células infectantes, a idade, a saúde e a competência imunológica do indivíduo (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). O período de incubação até o aparecimento dos primeiros sintomas são em média de 15 dias, podendo variar desde uma infecção leve até manifestações graves da doença (Levett, 2001, Bharti et al., 2003). A doença é dividida em duas fases: fase precoce e fase tardia. Os primeiros sintomas da fase precoce são as manifestações leves da leptospirose, caracterizadas por febre, dor de cabeça, calafrios e mialgias, principalmente na panturrilha, náuseas, diarreia, fotofobia, dor ocular e tosse (Ko et al., 1999, Daher et al., 2010). Esses sintomas duram em média de 3 a 7 dias e são

frequentemente confundidos com outras doenças como influenza, meningite asséptica, encefalite, dengue, hepatite ou gastroenterite, resultando em um diagnóstico errado (Dey et al., 2007).

A maior responsabilidade atribuída a leptospirose nas regiões endêmicas, são as manifestações graves que ocorrem na fase tardia da doença, ocasionando risco a saúde, por causar a síndrome hemorrágica pulmonar e insuficiência renal aguda devido a Doença de Weil (Lameire et al., 2006, Gouveia et al., 2008, Papa et al., 2009, Zaki and Shanbag, 2010). Os casos fatais decorrentes dessas manifestações, são maiores que 10% para a síndrome hemorrágica pulmonar e superior a 70% nos casos da Doença de Weil (McBride et al., 2005). A leptospirose grave é um problema de saúde pública, com taxa de letalidade de até 40% (Ricardi and Vinetz, 2006).

2.7. Tratamento

O tratamento da leptospirose é principalmente a administração de antibióticos no momento do diagnóstico (Pappas and Cascio, 2006). A terapia com antibióticos é feita com penicilina intravenosa quatro vezes por dia, para os casos com maior gravidade e com antibióticos orais, como amoxicilina, doxiciclina, ampicilina ou eritromicina para os casos menos graves. Para pacientes alérgicos a penicilina, a ceftriaxona pode ser usada como alternativa. Além disso, é contraindicado a doxiciclina para mulheres gestantes e crianças menores de 8 anos, por causar malformações ósseas e dentárias no feto e pelo risco de pigmentação dentária. Para esse grupo de risco, as alternativas são cefalosporina, macrolídeo ou penicilina. Porém, para todos os pacientes, o tempo total do tratamento é de 7 dias (Picardeau, 2013, Babic-Erceg et al., 2014).

A quimioprofilaxia é indicado para casos de pré e pós-exposição. Para a pré-exposição como nos eventos de esportes aquáticos e exercícios militares, deve ser administrado doxiciclina uma vez por semana. Em casos de pós-exposição, como em enchentes e trabalhadores em locais de grande risco, como a limpeza de fossas, é indicado o uso de doxiciclina de 12 em 12 horas pelo período de 5-7 dias (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010).

2.8. Diagnóstico

Um teste de diagnóstico ideal é aquele capaz de discriminar a leptospirose entre uma ampla gama de doenças febris e manifestações clínicas semelhantes, ser de fácil execução, alta sensibilidade e especificidade e ser viável financeiramente, ou seja, de baixo custo (Dey et al., 2007, Picardeau et al., 2014). Porém, a leptospirose possui uma particularidade, em alguns animais infectados os níveis de anticorpos podem ser detectados anos após a doença, o que dificulta a utilização de determinados testes sorológicos (Budihal and Perwez, 2014).

No entanto, os principais tipos de testes de diagnóstico para leptospirose usados atualmente, como a cultura da bactéria, testes moleculares como o PCR e testes moleculares como o Teste de Microaglutinação (MAT) e os Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA), possuem suas limitações e não suprem todos os critérios de um teste ideal (Goris et al., 2013b).

2.8.1. Cultura da bactéria

A cultura visa o isolamento de *leptospiros* presentes em amostras biológicas, como tecidos, sangue e urina. Essas amostras devem ser coletadas antes do início do tratamento com antibiótico e até o décimo dia da doença (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Esse teste é baseado no cultivo da amostra biológica em frascos com meio EMJH. Caso a amostra apresente alguma contaminação, são adicionados ao meio de cultivo, os antibióticos seletivos 5-fluorouracilo e 1% de soro de coelho (Adler, 2015).

As culturas são incubadas entre 28-30 °C sendo necessário um acompanhamento semanal por microscopia de campo escuro por até 16 semanas, para confirmação do diagnóstico (Goris et al., 2013a). Porém, o cultivo *in vitro* de *leptospiros* é difícil de ser realizado, de baixa sensibilidade e fastidioso (Lilenbaum et al., 2009). Apesar da alta especificidade, a técnica de cultivo celular não é recomendada para o diagnóstico precoce de leptospirose, mas sua utilização é indicada para o isolamento de *leptospiros* vivas em estudos envolvendo a patogenicidade das bactérias (Fornazari et al., 2012).

2.8.2. Teste de microaglutinação (MAT)

O teste sorológico de referência para o diagnóstico e estudos epidemiológicos de leptospirose animal e humana é o teste de microaglutinação (Levett et al., 2005, Suepaul et al., 2011). O objetivo desse teste é a detecção de anticorpos IgM e IgG em amostras biológicas, aumentando a sensibilidade e especificidade do MAT em amostras coletadas após 1 ou 2 semanas do aparecimento dos sintomas, devido à alta presença de anticorpos (WHO and ILS, 2003, Schuller et al., 2015).

Para realizar o MAT, é preciso um painel de抗ígenos, recomendado ser composto por um representante de cada sorogrupo da região para cada espécie animal e para aumentar a sensibilidade do teste, é indicado usar cepas locais (WHO, 2011, Adesiyun et al., 2011). Além disso, é preciso coletar pelo menos duas amostras no período de 8-10 dias após o início dos sintomas, e caso necessário, uma terceira amostra para confirmar o diagnóstico (WHO and ILS, 2003). O resultado desse teste é visto através da aglutinação entre anticorpos presentes na amostra e os抗ígenos presentes na bateria do teste (Langston and Heuter, 2003). São considerados positivos, aqueles soros que apresentaram um aumento de quatro vezes o título entre os soros da fase aguda e da convalescente (Budihal and Perwez, 2014).

Apesar desse teste ser considerado padrão, o MAT possui algumas limitações, como: é laborioso, requer um painel de culturas vivas de vários sorovares, apresenta reação cruzada entre sorovares do mesmo sorogrupo, é um teste demorado comparado a outros testes, possui baixa sensibilidade na fase inicial da doença, dificuldade em interpretar o resultado e dificuldade em diferenciar anticorpos IgM e IgG em animais que são vacinados, infectados ou oriundos de áreas endêmicas (Bajani et al., 2003, Ahmad et al., 2005, Subathra et al., 2009, Miller et al., 2011). Dessa forma, o MAT é uma boa ferramenta para a triagem em rebanhos ou em estudos epidemiológicos, mas não é adequado para o diagnóstico individual (Otaka et al., 2012).

2.8.3. Testes rápidos

Os testes rápidos para o diagnóstico de leptospirose são baseados na detecção de anticorpos IgM em amostras biológicas. Esses testes utilizam cepas de *Leptospira* em sua composição, sendo os sorovares mais usados: Patoc, Grippotyphosa,

Bratislava (Vanithamani et al., 2015, Kodjo et al., 2016). Esses testes apresentam valores de sensibilidade variando entre 75-100% e valores de especificidade entre 92-100% (Smits et al., 2001, Vanithamani et al., 2015, Dahal et al., 2016, Fontana et al., 2017). As limitações dos testes rápidos são de apresentarem melhores resultados de sensibilidade e especificidade na fase aguda, a partir do sétimo dia após o aparecimento da doença sendo indicados como um teste de triagem no diagnóstico para pacientes com sintomas clínicos da doença (Wagenaar et al., 2004, Nabity et al., 2012).

2.8.4. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

O teste de ELISA baseia-se na utilização de antígeno podendo ser de célula inteira ou determinadas proteínas, com a finalidade de detectar anticorpos IgM ou IgG em amostras biológicas (McBride et al., 2007a). Na primeira semana da doença, os anticorpos IgM são capazes de ser detectados, permitindo o diagnóstico. Com o avanço da doença, os anticorpos IgM diminuem gradativamente e os anticorpos IgG começam a ter níveis maiores, característico da fase convalescente da leptospirose (Budihal and Pervez, 2014).

Há uma grande variação de sensibilidade e de especificidade nos diferentes testes de ELISA estudados. Testes diagnósticos de leptospirose humana são avaliados em relação ao teste de referência MAT, porém as sensibilidades quando testados soros de fase aguda é menor do que quando testadas com soros de fase convalescente, com valores de sensibilidade variando de 38,5–52,7% para fase aguda e 67,2 – 93,8% para fase convalescente (Bajani et al., 2003). Estudos utilizando proteínas recombinantes para a detecção da doença, como a rLipL32, rLipL41 e rLigA, obtiveram valores de sensibilidade variando entre 62-65% e especificidade maior que 90% para todas as proteínas utilizadas, demonstrando ser importantes na detecção de anticorpos IgM e IgG (Chen et al., 2013).

O ELISA PanBio é o teste disponível para uso comercial para diagnóstico da leptospirose, mostrando ser mais sensível do que o MAT na detecção de anticorpos IgM (Budihal and Pervez, 2014). Outro teste de diagnóstico humano, o EIE-IgM obteve um aumento na sensibilidade da primeira para a segunda semana da doença, com valores de 62,1% para 97,1% respectivamente (McBride et al., 2007b). Para o diagnóstico canino, estudos utilizaram proteínas recombinantes como a rLoa22,

rLigACon4-8, rLipL21 e rLipL32. Os testes utilizando essas proteínas obtiveram valores de sensibilidade e especificidade de 89,7% e 81,4% para rLoa22, 97,5% e 84,3% para a rLigACon4-8, 99,5% e 84,3% para rLipL21 e 99,5% e 84,3% para a rLipL32, comparado com o MAT (Ye et al., 2014b).

2.8.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O teste de diagnóstico baseado em PCR é feito através da detecção do DNA de *Leptospira* spp. presentes em amostras biológicas como sangue, urina, amostras de tecidos (*ante e post mortem*) e líquido cefalorraquidiano (Morikawa et al., 2015). A detecção de DNA leptospiral pode ser feita em estágios iniciais da infecção, auxiliando no rápido tratamento do paciente infectado (Budihal and Perwez, 2014). Os ensaios moleculares desenvolvidos podem ser classificados em ensaios que tem como alvo os genes de manutenção, tais como, *secY*, *RRS*, *gyrB*, ou ainda em ensaios que detectem genes determinantes de virulência como *lipL32*, *ligB* ou *lfB1* (Ahmed et al., 2012).

Apesar da técnica ser considerada de alto custo e seu uso ser restrito a determinados laboratórios, a PCR é um teste preciso, rápido e confiável, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 99% quando comparado ao teste de cultivo microbiológico (Hernandez-Rodriguez et al., 2011). Além disso, é capaz de quantificar a carga leptospiral de pacientes infectados e o material biológico coletado pode ser feito após o início do uso de antibióticos (Bharti et al., 2003, Tubiana et al., 2013). Todas essas vantagens demostram sua importância na contribuição para o diagnóstico de leptospirose, associado a uma técnica de referência como o MAT, auxiliando no melhoramento da vigilância epidemiológica no controle de zoonoses (Sykes et al., 2011, Hernandez-Rodriguez et al., 2011).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

As proteínas recombinantes rLigBrep e rLipL32 utilizadas neste trabalho, são mais antigênicas que o antígeno bruto da *leptospira*, facilitando o reconhecimento pelos anticorpos específicos, consequentemente, aumentando a sensibilidade do ELISA indireto na fase aguda da doença.

3.2. Objetivo Geral

Desenvolver um teste de ELISA indireto e de captura para o diagnóstico de leptospirose.

3.3. Objetivos específicos:

- Clonagem e expressão das proteínas
- Determinar, através de ensaios de *checkerboard*, as melhores concentrações de antígeno (rLigBrep), diluições de soro humano e de anticorpo anti-IgM e anti-IgG humano para uso no formato de ELISA indireto
- Determinar, através de ensaios de *checkerboard*, as melhores concentrações de antígeno (rLigBrep e rLipL32), diluições de soro canino e de anticorpo anti-IgM e anti-IgG canino para uso no formato de ELISA indireto
- Avaliar soros humanos e caninos com o teste padronizado
- Comparar os resultados do ELISA indireto com o MAT
- Padronizar o ELISA de captura

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

A amplificação da região codificadora do gene selecionado foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e, posteriormente o gene de interesse foi克lonado no plasmídeo pAE utilizando enzimas de restrição. Os possíveis clones recombinantes foram selecionados pela técnica de triagem rápida “microprep” em placas contendo ágar LB (caldo LB contendo 2% de Agar e antibiótico) a 37º C por 16 h. As colônias suspeitas de serem recombinantes foram cultivadas em 5 ml de caldo LB (com antibiótico) para a extração e purificação dos DNAs plasmidiais através do kit GFX Micro Plasmid Prep (GE Healthcare).

Após a confirmação dos clones recombinantes, através de PCR e análise de restrição, o plasmídeo purificado foi utilizado para transformar, por choque térmico, a cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Star. Um clone recombinante foi utilizado para inocular 10 ml de LB, contendo antibiótico, e cultivado sob agitação de 200 rpm, por 12 – 20 h a 37 °C. Posteriormente, esta cultura foi utilizada para inocular 500 ml de LB (com antibiótico), e incubada à 37 °C sob agitação de 200 rpm até a fase exponencial de crescimento (DO600 entre 0,6 e 0,8), quando então a expressão da proteína foi induzida com 1 mM de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosideo), durante 3 h. Após este período, a cultura foi centrifugada a 6.000 × g por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi suspenso em tampão de solubilização, após a confirmação da expressão através de SDS PAGE e *Western blot*, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando colunas Ni2+ Sepharose HisTrap. Posteriormente, a proteína purificada foi dialisada contra tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2) *overnight* a 4 °C. A concentração da proteína purificada foi determinada utilizando BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA), com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

4.1.2 Teste de microaglutinação (MAT)

O MAT é o teste sorológico padrão para diagnóstico e classificação de leptospirose. Neste método, são misturadas diluições seriadas do soro (1:25, 1:50 e 1:100) e culturas de *leptospiros*, em microplacas. A mistura do soro e do antígeno reage por um período de 2 h, em estufa bacteriológica BOD a uma temperatura de 30 °C. O resultado é obtido ao se estimar a proporção de *leptospiros* aglutinadas com relação à de *leptospiros* livres depois do período de incubação, sendo estimada em cruzes, resultando em: +++ quando 100% das *leptospiros* estão aglutinadas; ++ quando 50% das *leptospiros* estão aglutinadas; + quando menos que 50% das *leptospiros* estão aglutinadas. Serão consideradas as aglutinações, ou seja, soros positivos, os iguais ou superiores a ++.

O MAT realizado com os soros humanos utilizou 14 cepas patogênicas de *Leptospira*, separadas em duas baterias, compostas por sorovares Canicola, Panama, Pomona, Copenhageni, Cynopteri, Autumnalis, Patoc, Wolfii, Bataviae, Celledoni, Guaricura, Bratislava, Mozdok cepa 3759 (isolado local) e Tarassovi.

Com os soros caninos, foi utilizado na FIOCRUZ-BA uma bateria com 11 cepas patogênicas de *leptospira*, sendo estas: Autumnalis, Ballum, Bataviae, Copenhageni, Canicola, Grippotyphosa, Hardjobovis, Hebdomadis, Javanica, Pomona e Panama. Alguns soros foram submetidos novamente ao MAT realizado pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas (LPDI), sendo avaliado 4 sorovares de *Leptospira* spp.: Copenhageni, Autumnalis, Hardjobovis e Canicola.

4.1.3. Banco de soros humanos

As amostras de soros avaliadas no ELISA, são oriundas de uma soroteca obtida pelo LPDI através de um projeto de vigilância realizado no bairro Py Crespo, na cidade de Pelotas/RS e amostras provenientes da parceria com a FIOCRUZ de Salvador. Foi escolhido o bairro Py Crespo por ser uma área endêmica, apresentando saneamento básico inadequado e constantes enchentes. Já as amostras da FIOCRUZ, foram obtidas de pacientes suspeitos de terem contraído leptospirose.

Essas amostras foram caracterizadas através do MAT, o qual é referência no diagnóstico da leptospirose.

Nos ensaios de ELISA avaliando os anticorpos IgM e IgG, foram utilizados dois painéis de soros humanos. O primeiro painel serviu para realizar a padronização (*checkerboard*) e foi composto por um *pool* com dez amostras positivas e outro com dez amostras negativas conforme resultados no MAT. O segundo painel foi utilizado para avaliação individual dos soros, sendo analisados 22 soros com o anticorpo IgM, sendo 8 positivos e 14 negativos. Para o anticorpo IgG, foram avaliados 124 soros, 41 deles sendo positivo e 83 negativos.

4.1.4. Banco de soros caninos

O banco de soros caninos é composto por soros positivos e negativos provenientes de projetos de vigilância ocorridas na cidade de Salvador/BA e na cidade de Pelotas/RS. Os soros de Salvador foram cedidos pela FIOCRUZ-BA em colaboração com o Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Salvador. Os soros de Pelotas, foram obtidos pela colaboração entre o LPDI e a Faculdade de Medicina Veterinária-UFPEL. Todas as amostras foram submetidas a técnica de MAT para caracterizá-las como positivas ou negativas para leptospirose.

Nos ensaios de ELISA, foram utilizados dois painéis com soros escolhidos randomicamente do banco de soros do LPDI. O painel 1 para a padronização foi usado dois *pools* de soros, ambos com dez amostras, mas um pool com soros positivos e outro com amostras negativas. O painel 2 foi usado para a análise individual dos soros composto por 283 soros, sendo 116 positivos e 167 negativos. Desse total, 258 soros foram obtidos da parceria com Salvador e 25 soros com origem de Pelotas.

4.1.5 Cultivo de *L. interrogans*

L. interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi cultivada em meio EllinghausenMcCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) a 28 °C. Posteriormente, foi realizado a contagem de *leptospires* em câmara de Petroff-Hausser e a manutenção de cultivos viáveis, com até quatro passagens *in vitro*, através de repiques semanais.

4.1.6. Protocolo padrão para realização dos ELISAs indireto

Placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato NUNC Polysorp (Thermo Scientific) foram sensibilizadas por 16 horas a 4 °C, com quatro diferentes quantidades de antígeno por poço (50ng, 100ng, 150ng e 200ng), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato com pH=9,6. Os soros foram testados em duplicatas utilizando a quantidade de 50 µL em cada cavidade. Logo após, a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. Os soros utilizados foram diluídos em 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 para o *checkerboard*. Após isso, foi adicionado 50 µL por poço do anticorpo (anti-IgM e anti-IgG humanos e anti-IgG canino) conjugado com peroxidase, diluídos em PBS-T em 1:100000, 1:8000, 1:6000, 1:4000, 1:2000, 1:1000 e 1:500. Posteriormente, as reações foram reveladas com o substrato o-fenilenodiamnina (OPD), adicionado de peróxido de hidrogênio, e a placa armazenada no escuro por 15 minutos. A absorbância foi avaliada a 450 nm usando um leitor de placas de ELISA. Entre as diferentes etapas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (0,05% de Tween 20).

4.1.7. Protocolo padrão para realização dos ELISAs de captura

Placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato NUNC Maxysorp (Thermo Scientific) foram sensibilizadas por 1 hora a 4 °C, com diferentes diluições de anticorpos de captura por poço (1:1500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:6600, 1:7260, 1:7986, 1:8000, 1:10000 e 1:12000), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato com pH=9,6. Após isso, foi adicionado 50 µL de solução bloqueadora (PBS-T + leite em pó 5%) em cada poço e a placa incubada à 4 °C por 16 horas.

A amostra positiva utilizada foi o cultivo de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em meio EMJH diluído em PBS 1X e as amostras negativas usadas foram somente PBS. Foi adicionado 50 µL da amostra positiva na diluição 10⁵ *leptospiros* por poço e a placa foi incubada por 1 h a 28 °C. Após isso, foram adicionadas diversas diluições de anticorpos de detecção (1:1500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:6600, 1:7260, 1:7986, 1:8000, 1:10000 e 1:12000) e a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. Depois, foram colocados em cada poço da placa 50 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de rato conjugados com peroxidase que posteriormente foi incubada a 37 °C por 1 h. Em seguida, as reações foram

reveladas com o substrato o-fenilenodiamnina (OPD), adicionado de peróxido de hidrogênio, e a placa armazenada no escuro por 15 minutos. A leitura das reações foi feita pela absorbância 450nm usando um leitor de placas de ELISA. Entre as diferentes etapas, as placas serão lavadas 3 vezes com PBS-T (0,05% de Tween 20).

4.1.8. Análise estatística

4.1.8.1 Sensibilidade

A sensibilidade de um teste de diagnóstico reflete o quanto o teste é eficaz em identificar corretamente, dentre todos os indivíduos avaliados, aqueles que realmente apresentam a doença de interesse. O cálculo é feito da seguinte maneira:

Sensibilidade = $A / (A + C) \times 100$, onde A é o número de soros positivos pelo ELISA e pelo MAT, e C é o número de soros positivos pelo MAT mas negativos pelo teste de ELISA avaliado.

4.1.8.2 Especificidade

A especificidade de um teste de diagnóstico se refere ao quanto ele é eficaz de identificar corretamente os indivíduos que não apresentam a doença de interesse. A fórmula para a especificidade é:

Especificidade = $D / (B + D) \times 100$, onde D é o número de soros negativos pelo ELISA e pelo MAT, e B é o número de soros negativos no MAT mas positivos pelo ELISA de avaliado.

4.1.8.3 Intervalo de confiança 95 (IC95)

O intervalo de confiança com nível de 95% (IC95) é o mais comum e significa que o resultado está dentro do intervalo em 95 dos 100 estudos realizados. O intervalo de confiança é usado para indicar a confiabilidade de um teste. Em termos de precisão, quanto mais estreito for o intervalo de confiança, maior será a precisão dos resultados. Entre os fatores que podem aumentar a precisão do intervalo de confiança, está o tamanho da amostra, ou seja, quanto maior a amostra, maior é a precisão.

4.1.8.4 *Cut-off* padrão

O valor de *cut-off* padrão em diversos estudos é obtido através da média dos resultados dos soros negativos acrescentados duas vezes o desvio padrão. A quantidade de vezes do desvio padrão pode variar dependendo do objetivo do estudo. Mas o *cut-off* padrão abrange 95% da população com uma distribuição normal.

4.1.8.5 Curva ROC (*receiver operator characteristic curve*)

O desempenho de um teste de diagnóstico é usualmente demonstrado pela curva ROC. A curva ROC é constituído por diferentes pares de sensibilidade e especificidade para cada valor de *cut-off* (ponto de corte). Para diferentes pontos de cortes, dentro da amplitude dos possíveis valores que o teste em avaliação produz, pode-se estimar valores de sensibilidade e especificidade. Dessa forma, a escolha do melhor *cut-off* na maioria das vezes é representada pelo ponto onde a sensibilidade e especificidade são ao simultaneamente maiores.

4.1.8.6 Análise de concordância - Kappa

O Coeficiente Kappa é definido como uma medida de associação usada para descrever e testar o grau de concordância, ou seja, a confiabilidade e a precisão entre dois testes de diagnóstico. Assim valores maiores que 0,75 representam excelente concordância, valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana e valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância.

4.1.8.7 Valor Preditivo Positivo (VPP)

O VPP é a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente doente.

$VPP = VP / (VP + FP)$, onde VP é verdadeiro positivo e FP é falso positivo.

4.1.8.8 Valor Preditivo Negativo (VPN)

O VPN é a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo ser realmente saudável.

VPN = VN / (VN + FN), onde VN é verdadeiro negativo e FN é falso negativo.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados do teste MAT

O banco de soros caninos foi submetido ao teste MAT pela FIOCRUZ-BA e pelo nosso grupo do Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas. Na Tabela 1 demonstra os resultados do MAT realizado na FIOCRUZ e pelo LPDI, mostrando os números de soros com maior título para cada sorovar. A FIOCRUZ utilizou os seguintes sorovares: L1-130, Swartz, Ballum, Hardjobovis, C169, Pomona, Hebdomadis, Panama, Duyster, Canicola, Autumnalis e Javanica. No teste feito pelo LPDI para confirmar os resultados obtidos pelo teste anteriormente feito pelo laboratório da FIOCRUZ, foram utilizados quatro sorovares: L1-130, Canicola, Hardjobovis e Autumnalis. (Tabela 2).

Em relação aos 25 soros cedidos pela Faculdade de Medicina Veterinária da UFPel, foram avaliados com os seguintes sorovares: L1-130, Grippotyphosa, Autumnalis, Australis, Ballum, Mozdok, Pomona, Canicola e Patoc. Os resultados do MAT se referem aos sorovares com maior título para cada soro (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos MAT com soros caninos realizados pela FIOCRUZ-BA e LPDI

Sorovares	Soros positivos (FIOCRUZ)	Soros positivos confirmados (LPDI)
L1-130	40	39
Swa	01	-
Bal	07	-
Har	31	31
C169	17	-
Pom	17	-
Heb	01	-
Pan	0	-
Duy	23	-
Can	30	28
Aut	25	25
Jav	07	-
Gri	-	-
Aus	-	-
Moz	-	-
Pat	-	-

5.2. Ensaios de padronização do ELISA com soros caninos utilizando rLigBrep

Os ensaios de padronização no formato ELISA têm como finalidade obter a concentração de antígeno, a diluição do soro e a diluição do anticorpo anti-IgG canino, a fim de diferenciar os soros positivos dos soros negativos. Esses testes foram realizados utilizando um pool de soros positivos e um pool de soros negativos, cada um composto por 10 soros que foram caracterizados conforme o resultado no MAT.

O ELISA foi padronizado utilizando a proteína rLigBrep, com diferentes diluições de soro e de anticorpo anti-IgG canino, Figura 1.

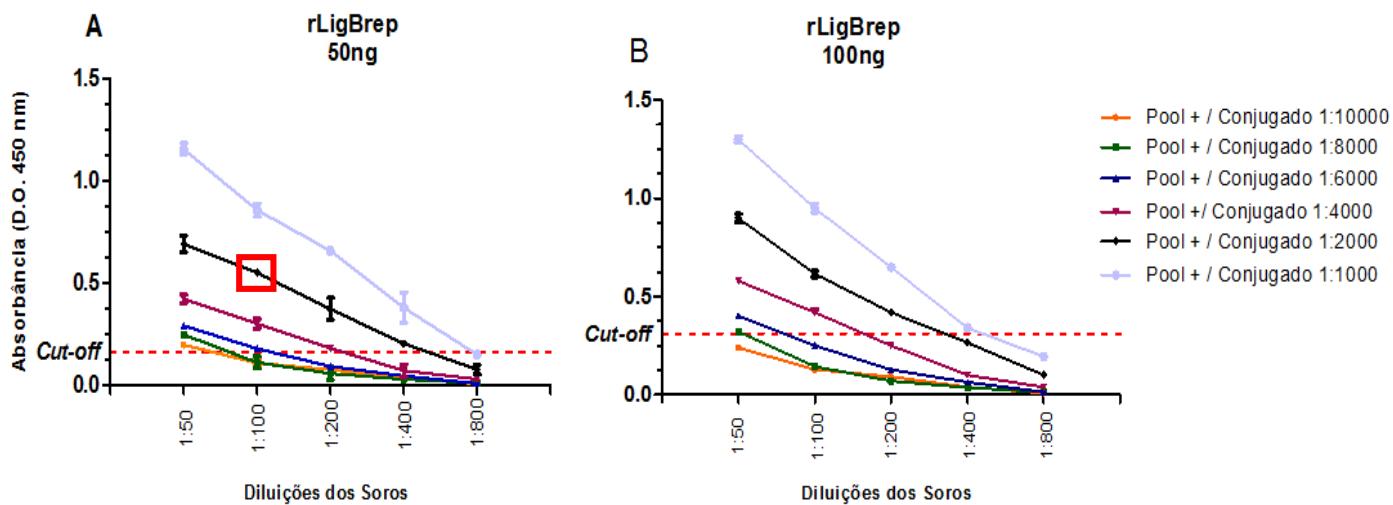


Figura 1. Resultados obtidos pelos testes de padronização. A: 50 ng de rLigBrep. B: 100 ng de rLigBrep. Diluição seriada de soros e diluição do anticorpo anti-IgG canino.

*Cut-off: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

Analizando os resultados apresentados na Figura 1, foram escolhidas através dos ensaios de padronização, as seguintes condições: 50 ng da proteína rLigBrep, os soros foram diluídos na proporção de 1:100 e a diluição escolhida do anticorpo anti-IgG canino foi de 1:2000. Nessas condições, o valor do pool positivo foi de 0,55 e do cut-off de 0,163, ou seja, os soros positivos foram 3 vezes maiores do que os negativos, conseguindo diferenciar esses soros com precisão.

5.3. Avaliação individual de soros caninos utilizando a proteína rLigBrep

Os testes de ELISA foram realizados conforme os resultados escolhidos pela padronização. Dessa forma, foram avaliados 283 soros caninos, obtidos através da parceria com a FIOCRUZ - BA e com o Hospital Veterinário da UFPel. Os soros foram caracterizados pelo MAT, resultando em 116 soros positivos e 167 soros negativos para leptospirose (Figura 2).

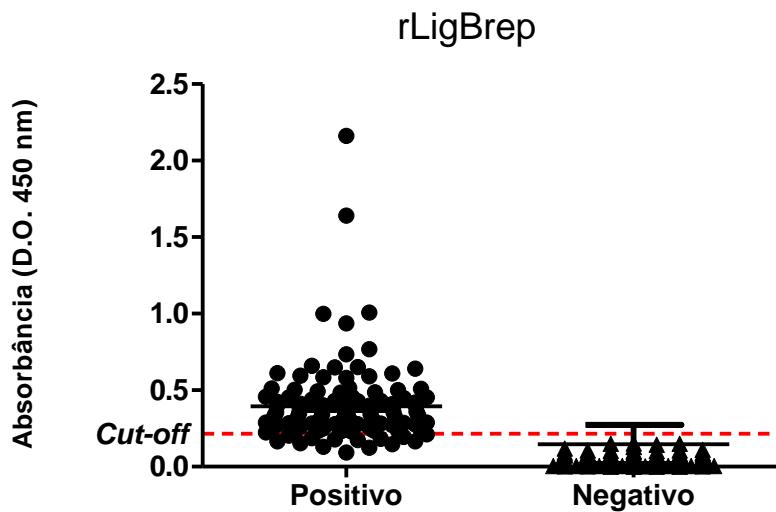


Figura 2. Avaliação dos soros caninos por ELISA indireto após a padronização com a proteína rLigBrep.

O *cut-off* para a avaliação inicial dos testes, foi estabelecido como sendo a média dos soros negativos mais duas vezes o desvio padrão, onde na figura 2 esse valor se refere a 0,215. Através desse ponto de corte, o teste de ELISA foi capaz de detectar 101 soros positivos do total de 116 soros caracterizados como positivos pelo MAT e 167 soros negativos do total de 167 soros com resultados negativos no teste de diagnóstico padrão.

Dessa forma, o teste de diagnóstico baseado em ELISA indireto desenvolvido nesse trabalho, tem valores de sensibilidade e especificidade de 87,0% (IC95: 80,6-93,2%) e 100% (IC95: 98,7-100%), respectivamente. Desse modo, o VPP desse teste é de 100% e o VPN é 91,7%.

5.4. Avaliação individual de soros caninos através da curva ROC com a proteína rLigBrep

O teste de ELISA utilizando a curva ROC para determinar o valor de *cut-off* possui valores de sensibilidade e especificidade melhores do que os apresentados anteriormente. O mesmo teste utilizando os 283 soros caninos, com o valor de *cut-off* estabelecido pela curva ROC como sendo 0,122, obteve valores de sensibilidade de 99,2% (IC95: 95,7-99,9%) e especificidade de 95,5% (IC95: 91,3-98,1%),

reconhecendo 115 soros como positivos e 116 soros negativos (Figura 3). Alterando o valor de *cut-off* para 0,152 o teste obtém valor de sensibilidade de 96,5% (IC95: 91,4-99,0%) e especificidade de 99,4% (IC 95: 96,7-99,9%). Os valores de VPP e VPN do teste com a curva ROC são de 93,4% e 99,3%, respectivamente.

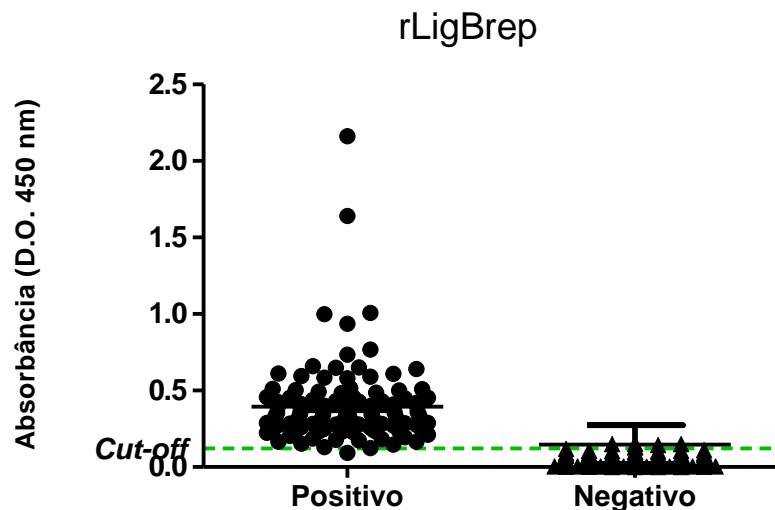


Figura 3. Avaliação individual dos soros caninos pelo ELISA indireto com o *cut-off* estabelecido através da curva ROC com a proteína rLigBrep.

5.5. Ensaios de padronização do ELISA indireto com soros caninos utilizando rLipL32

Os ensaios de padronização foram realizados utilizando os mesmos *pools* de soros positivos e negativos e as mesmas condições usadas para a rLigBrep.

A figura 4 mostra os resultados obtidos através dos testes de padronização utilizando a proteína rLipL32, com diferentes diluições de soro e de anticorpo anti-IgG canino.

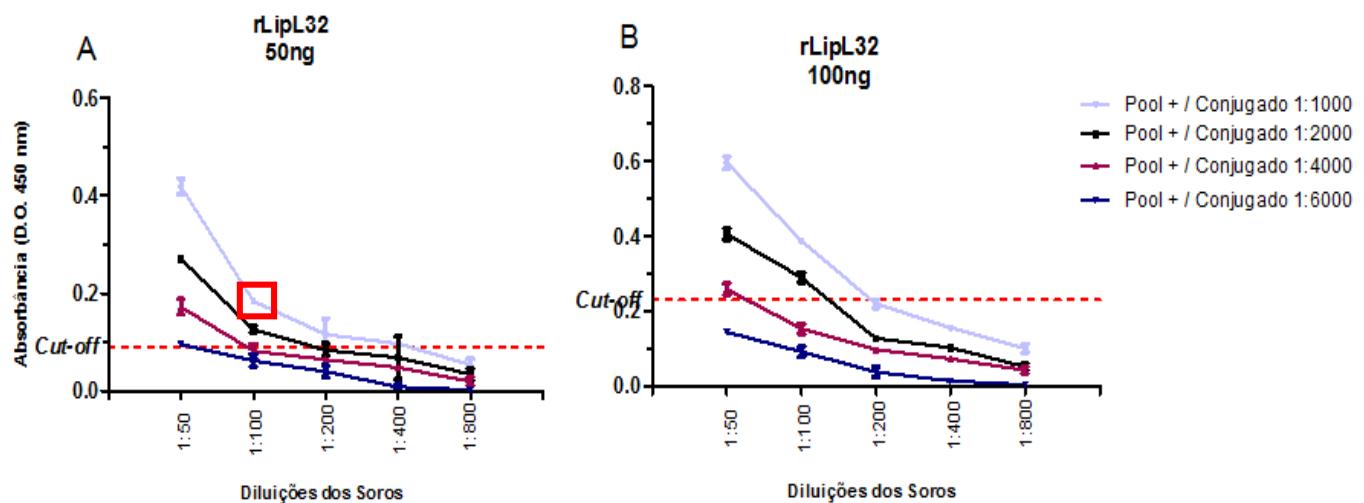


Figura 4. Resultados obtidos pelos testes de padronização. A: 50 ng de rLipL32. B: 100 ng de rLipL32. Diluição seriada de soros e diluição do anticorpo anti-IgG canino.

*Cut-off: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

Após os resultados obtidos com a padronização, foram determinadas as condições para serem utilizadas nas placas para avaliar os soros caninos individualmente. Dessa forma, as placas foram sensibilizadas utilizando 50 ng da proteína rLipL32, os soros foram utilizados na diluição de 1:100 e a diluição do anticorpo anti-IgG canino foi de 1:1000. Com essas diluições, os soros positivos obtiveram valor de 0,184 e os negativos (cut-off) com valor de 0,09, mostrando uma diminuição em 2 vezes em relação aos positivos, evidenciando o potencial em diferenciar soros positivos de negativos.

5.6. Avaliação individual de soros caninos utilizando a proteína rLipL32

Estabelecidas as condições na padronização, foram avaliados os mesmos soros caninos avaliados anteriormente com a proteína rLigBrep, sendo 116 soros positivos e 167 soros negativos para leptospirose, no total de 283 soros. (Figura 5).

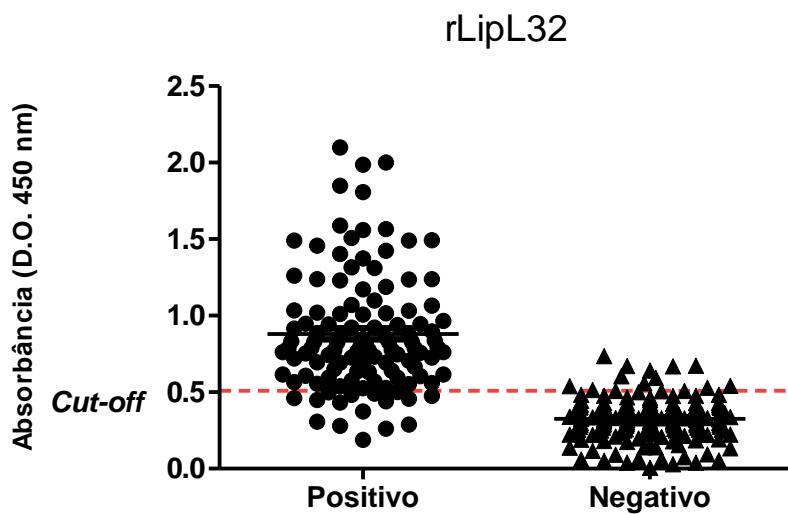


Figura 5. Avaliação dos soros caninos individuais após a padronização do ELISA indireto com a proteína rLipL32.

O *cut-off* nesse teste tem o valor de 0,510, estabelecido como sendo a média dos soros negativos mais duas vezes o desvio padrão. Através desse *cut-off*, o teste teve a capacidade de detectar como soros positivos, 100 soros do total de 116 e considerou negativos 156 soros do total de 167 caracterizados negativos no MAT.

Com esses resultados, o teste de diagnóstico utilizando a rLipL32, possui sensibilidade de 86,5% (IC95: 79,3-91,9%) e especificidade de 93,2% (IC95: 88,5-96,5%). Por esse motivo, nesse teste os valores de VPP e o VPN são 90,0%.

5.7. Avaliação individual de soros caninos através do ROC com a proteína rLipL32

Escolhendo o valor de *cut-off* através da curva ROC, como sendo 0,48, o teste de ELISA altera seus valores de sensibilidade para 89,7% (IC95: 83-94,4%) e de especificidade para 90,9% (IC95: 85,7-94,7%). Sendo capaz de reconhecer 104 soros positivos e 150 soros negativos (Figura 6). Se alterar o valor de *cut-off* para 0,480, o valor de sensibilidade aumenta para 90,5% (IC95: 84-94,9%) e a especificidade diminui para 89,8% (IC 95: 84-93,8%). Avaliando o teste através da curva ROC, os resultados de VPP e VPN são 85,9% e 92,5%, respectivamente.

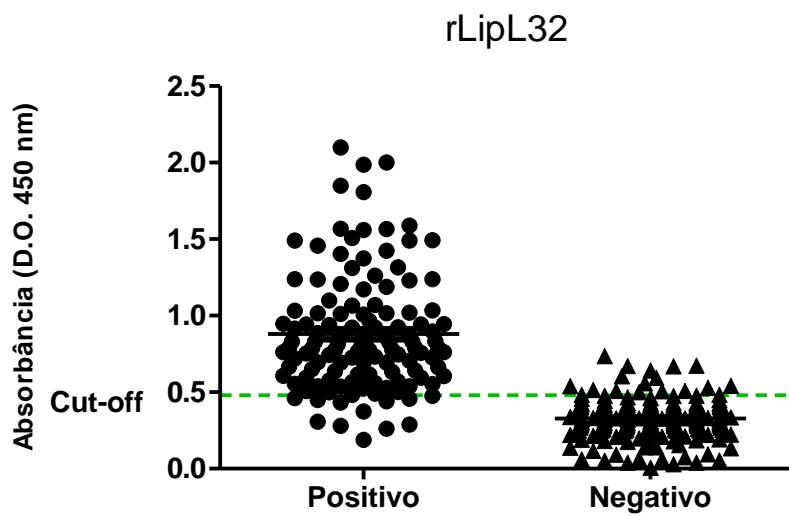


Figura 6. Avaliação individual dos soros caninos com o *cut-off* estabelecido através da curva ROC com a proteína rLipL32.

5.8. Resultados da padronização do ELISA indireto com a proteína rLigBrep com soros humanos e anticorpo anti-IgM humano

Na padronização, foram escolhidas as seguintes condições: 50 ng da proteína rLigBrep, diluição do soro de 1:100 e diluição do anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase de 1:1000, pois o valor dos soros positivos foram de 0,162 e dos negativos foram de 0,071, mostrando uma diferença de 2 vezes entre esses soros, permitindo diferencia-los (Figura 7).

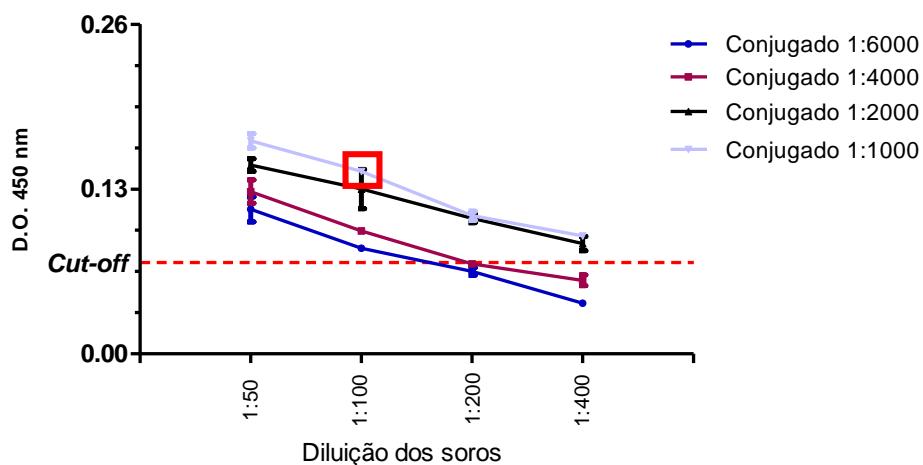


Figura 7. Padronização com a quantidade de 50 ng da proteína rLigBrep utilizando soros humanos diluídos e avaliando anticorpo anti-IgM humano.

*Cut-off: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

5.9. Avaliação individual de soros humanos utilizando a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano

Posterior a padronização, foram avaliados 22 soros individuais, sendo 8 positivos e 14 negativos. Com o *cut-off* de 0,175, o teste foi capaz de detectar os 8 soros como sendo positivos e 10 soros como sendo negativos, correspondendo a valores de 100% (IC95: 63,1-100%) de sensibilidade e 71,4% (IC95: 41,9-91,6%) de especificidade (Figura 8). Em função disso, o valor de VPP do teste é 66,7% e o VPN é de 100%.

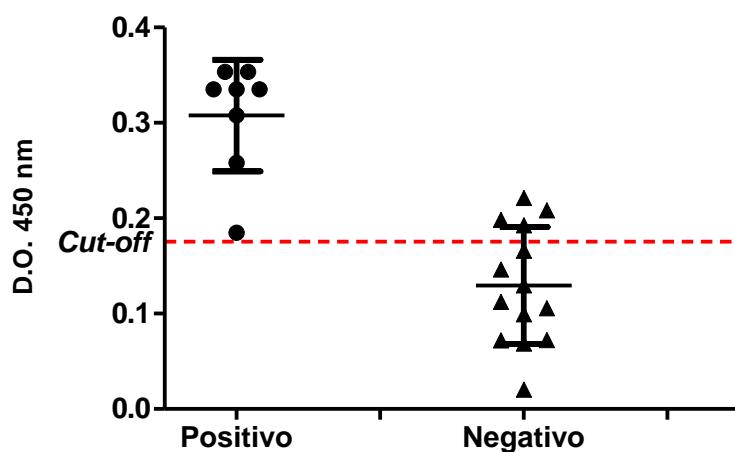


Figura 8. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano.

*Cut-off: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

5.10. Avaliação individual de soros humanos através do ROC com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano

Alterando o valor do *cut-off* pela curva ROC para 0,215, o teste passa a obter valores de sensibilidade e especificidade de 87,5% (IC95: 47,3-99,7%) e 100% (IC95: 76,8-100%), respectivamente. Dessa forma, o teste é capaz de detectar 7 soros como sendo positivos e os 14 soros negativos (Figura 9). Em razão disso, o teste obteve valor de VPP de 100% e de VPN de 93,3%.

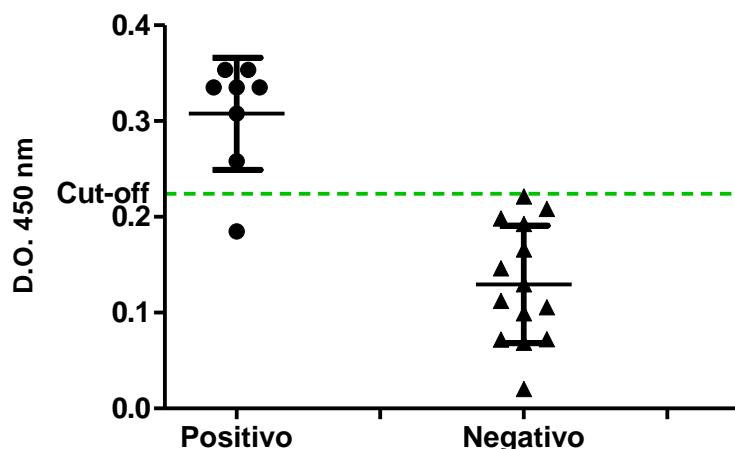


Figura 9. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgM humano com *cut-off* definido pela curva ROC.

5.11. Resultado da padronização do ELISA indireto com a proteína rLigBrep com soros humanos e anticorpo anti-IgG humano

Através dos testes para a padronização, foram estabelecidos a quantidade de 50 ng da proteína rLigBrep, diluição do soro de 1:100 e diluição do anticorpo secundário de 1:1000. Foram escolhidas essas condições pois permite diferenciar os soros positivos dos negativos, apresentando o valor de soros positivos de 0,625 e soros negativos de 0,312, mostrando uma diferença de 2 vezes entre os soros (Figura 10).

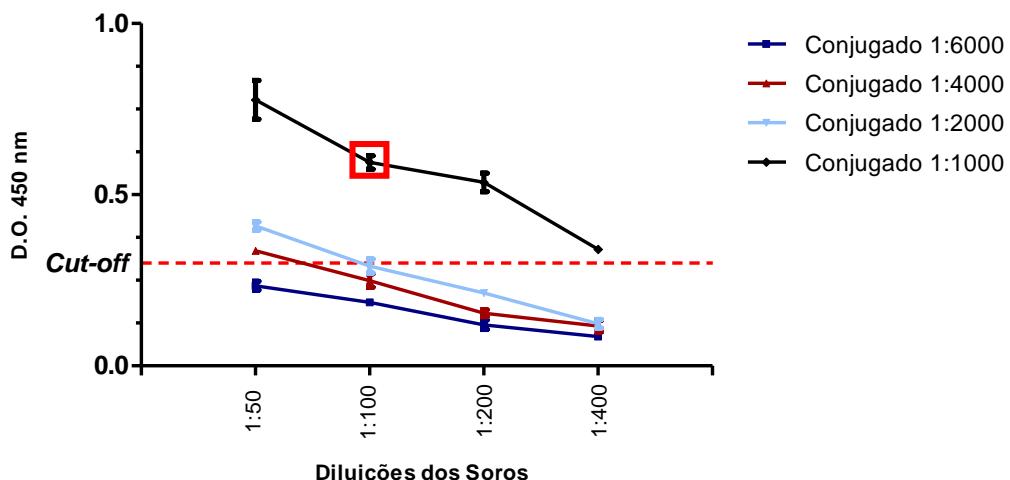


Figura 10. Padronização com a quantidade de 50 ng da proteína rLigBrep utilizando soros humanos diluídos e avaliando anticorpo anti-IgG humano.

*Cut-off: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

5.12. Avaliação individual de soros humanos utilizando a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano

Foram avaliados 124 soros individuais, sendo eles 41 positivos e 83 negativos no MAT. Com o *cut-off* sendo a média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão com valor de 0,0525, o teste resultou em valores de 92,7% (IC95: 80,1-98,5%) de sensibilidade detectando 38 soros positivos e 71,1% (IC95: 60,1-80,5%) de especificidade, capaz de identificar 59 soros negativos (Figura 11). Com isso, os valores de VPP é 61,2% e o VPN é de 95,2%.

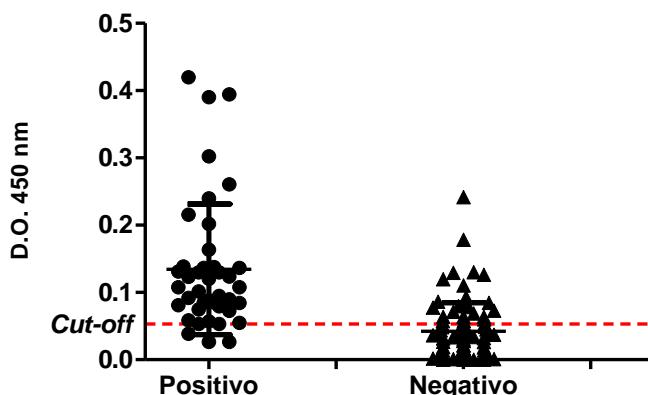


Figura 11. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano. *Cut-off*: média dos negativos mais duas vezes o desvio padrão.

5.13. Avaliação individual de soros humanos através do ROC com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano

Escolhendo o valor do *cut-off* pela curva ROC como sendo 0,078, o teste apresenta valores de sensibilidade de 75,1% (IC95: 59,7-87,7%) e especificidade de 86,7% (IC95: 77,5-93,2%). Identificando 31 soros positivos e 72 soros negativos (Figura 12). Desse modo, esse teste de ELISA obteve valores de VPP de 73,8% e o VPN é de 87,8%.

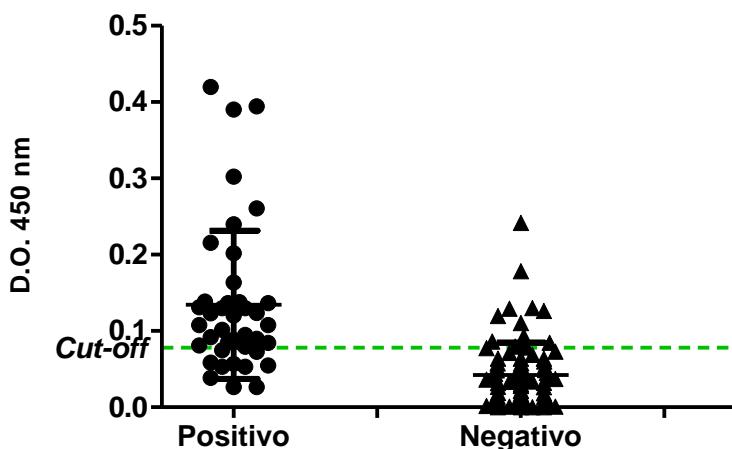


Figura 12. Avaliação dos soros humanos individuais com a proteína rLigBrep e anticorpo anti-IgG humano com valor de *cut-off* estabelecido pela curva ROC.

5.14. Resultados do ELISA de captura

Foram realizados ensaios de padronização no formato ELISA de captura, testando diversas combinações e diluições dos anticorpos de captura e anticorpos de detecção. Nesses ensaios foram utilizadas a concentração de 10^5 *leptospiros*/mL, o controle positivo foi um cultivo de 10^8 *leptospiros*/mL e controle negativo apenas PBS. Também foram feitos testes com e sem bloqueio com leite em pó 5%. Para obter uma amostra com a diluição de 10^5 *leptospiros*/mL foi realizado o cultivo dessas *leptospiros* até atingirem 10^8 , posteriormente foi feito a diluição em PBS até 10^5 .

Na figura 13, foram avaliadas diferentes combinações entre o anticorpo antibacterina produzido em coelho (anticorpo de captura) e diversas diluições do anticorpo antibacterina produzido em rato (anticorpo de detecção).

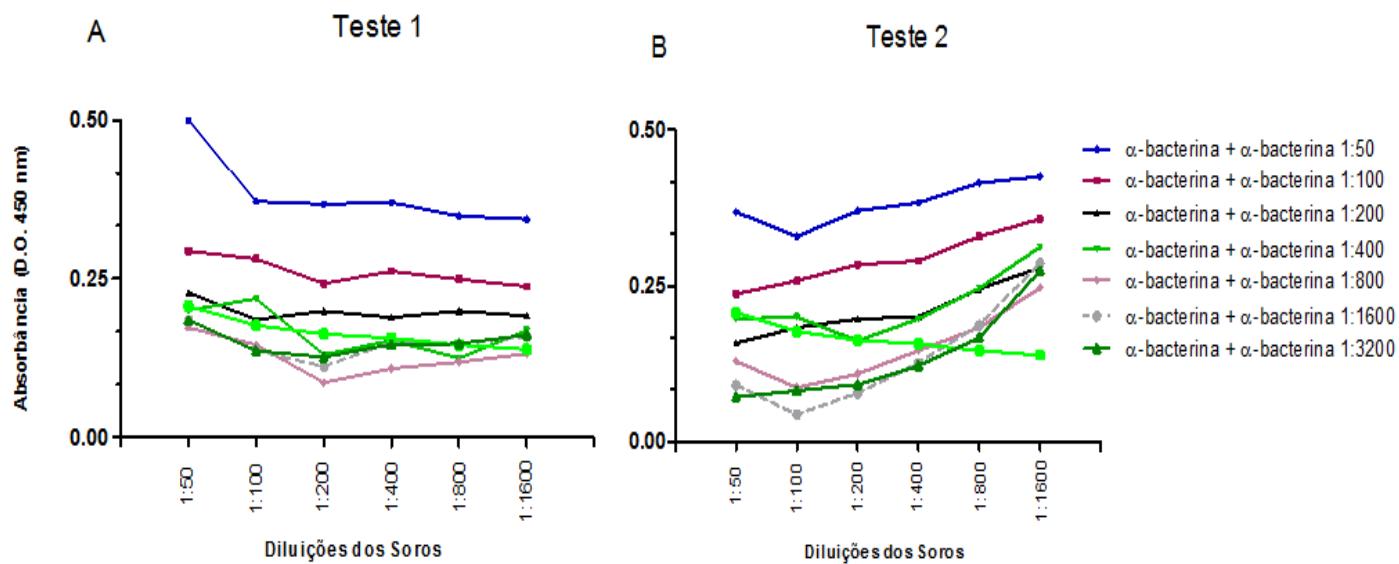


Figura 13. Resultados utilizando o anticorpo antibacterina (coelho) em diluição seriada de 1:50 a 1:1600 e diluição do anticorpo antibacterina (rato) de 1:50 a 1:3200. A: amostra positiva (10^5 *leptospiros*/mL). B: amostra negativa (PBS).

No teste posterior, o anticorpo de captura utilizado foi o antibacterina produzido em coelho combinado com os anticorpos disponíveis no laboratório, entre eles: anti-FlaA, anti-FlaB, anti-LigBrep policlonal (produzidos em rato), 1D9 (anti-LipL32), mAb3 (anti-LipL32) e anti-LigBrep monoclonal (produzidos em camundongo). Na figura 14, foram utilizadas as diluições de 1:6000 até 1:7986 do anticorpo de captura e 1:5000

dos anticorpos de detecção. Os anticorpos anti-rato e anti-camundongo conjugados com peroxidase, foram diluídos em 1:10000 e 1:8000, respectivamente.

Teste 3

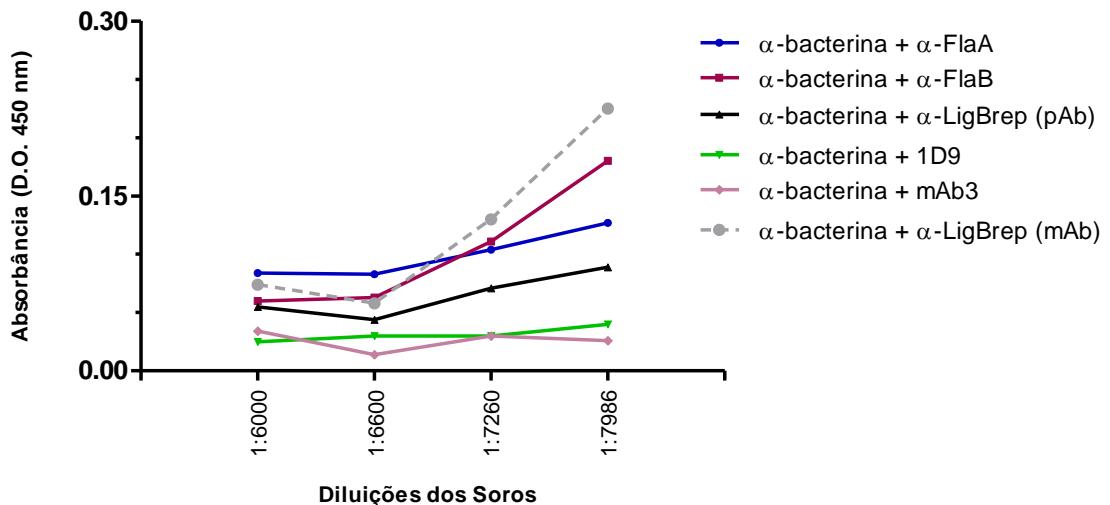


Figura 14. Combinação entre anticorpo de captura antibacterina (coelho) diluído em 1:6000 a 1:7986 e de diferentes anticorpos de detecção diluídos em 1:5000, usando a amostra positiva (10^5 leptospiras/mL).

Também foram testados a combinação entre o anticorpo antibacterina produzido em rato diluídos em 1:50 a 1:1600 e o anticorpo 1D9 (anti-LipL32) nas diluições de 1:50 até 1:3200 (Figura 15). O anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase foi usado na diluição 1:8000, para revelar as reações.

Teste 4

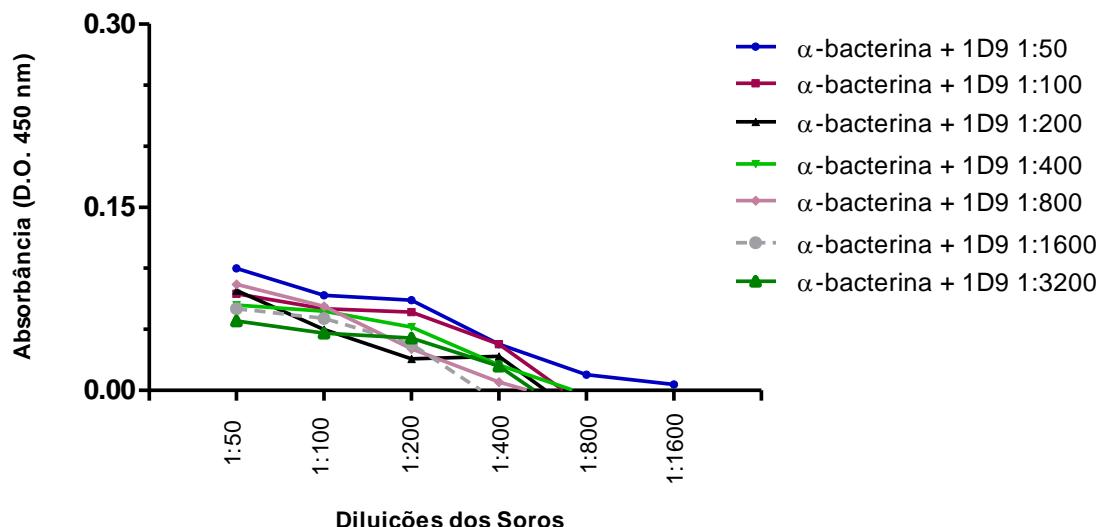


Figura 15. Combinação entre anticorpo antibacterina (rato) na diluição seriada de 1:50 a 1:1600 e do anticorpo 1D9 (anti-LipL32) diluídos em 1:50 a 1:3200, usando a amostra positiva (10^5 leptospiros/mL).

5.15. Análise de Concordância – Kappa

Essa análise foi feita para os testes de ELISA utilizando as duas proteínas (LigBrep e LipL32) com os soros caninos. Com a LigBrep, o teste obteve os seguintes resultados: 107 soros verdadeiros positivos, 19 soros falsos negativos, 175 soros verdadeiros negativos e 2 soros falsos positivos. Dessa forma, o valor de Kappa é 0,942, representando alta concordância entre o ELISA com a rLigBrep e o teste padrão de diagnóstico MAT.

A análise Kappa para a rLipL32 obteve valor 0,790, ou seja, o teste resultou em 110 soros positivos verdadeiros, 16 soros falsos negativos, 165 soros negativos verdadeiros e 12 soros falsos positivos. Esse valor de Kappa demonstra a elevada concordância entre o teste de ELISA e o MAT.

7. DISCUSSÃO GERAL

O teste de diagnóstico referência para leptospirose é o MAT, porém esse teste não é específico para IgM, detectando os anticorpos IgM e IgG, resultando em baixa sensibilidade na fase aguda, não sendo considerado o teste ideal para confirmação diagnóstico de forma rápida (Valverde Mde et al., 2013, Rajapakse et al., 2015). Um teste de diagnóstico ideal é capaz de discriminar entre leptospirose e uma ampla gama de doenças febris com apresentações clínicas semelhantes (DEY et al., 2015). Dessa forma, novos testes de diagnósticos devem ser baseados em antígenos altamente conservados entre espécies patogênicas de *Leptospira*, para contribuir com a detecção de casos de leptospirose (Guerreiro et al., 2001). Para auxiliar, as proteínas recombinantes imunogênicas são uma alternativa para substituir os antígenos brutos no desenvolvimento de testes sorológicos de diagnóstico (Cullen et al., 2004).

Proteínas recombinantes expostas na superfície da *Leptospira spp.*, como LipL32, LigA, LigB e LipL21 vem sendo utilizadas no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, mostrando seu potencial imunogênico e diagnóstico. Dentre os estudos realizados, os valores de sensibilidade variam de 69-92% e a especificidade varia entre 98-100% (Haake et al., 2000, Srimanote et al., 2008, Seenichamy et al., 2014, Kitashoji et al., 2015). Porém, ainda existem muitos grupos de pesquisa utilizando a bacterina como antígeno em ensaios de ELISA indireto, apresentando resultados de sensibilidade de 83-88% e especificidade entre 72-98,5% (Schlichting et al., 2015, Iwasaki et al., 2016, Vanasco et al., 2016).

Atualmente não existe um teste de diagnóstico para leptospirose disponível para comercialização no Brasil. O teste DPP Leptospirose Humana produzido pela Bio-Manguinhos não obteve seu registro aprovado pelo Ministério da Saúde, mesmo apresentando resultados de 100% de sensibilidade e 93% de especificidade, fazendo com que o país tenha que importar os testes, gerando altos custos para os laboratórios que tenham interesse nesse produto (Nabity et al., 2012). Além disso, esses testes importados obtêm baixa sensibilidade e especificidade dependendo do local onde é utilizado, pois é composto pela *L. biflexa*, uma cepa não patogênica.

Na maioria dos grupos de pesquisas que trabalham com o desenvolvimento de testes de diagnóstico para leptospirose canina, utilizam o antígeno recombinante LipL32 em seus testes. Um dos trabalhos utilizou 305 soros caninos e 100 ng da

proteína, apresentando valores de sensibilidade de 92,6% e especificidade de 84,3% (Ye et al., 2014a). Outros dois estudos utilizaram 50 ng de LipL32, um deles com o total de 137 soros com valores de sensibilidade de 96,4% e especificidade de 97,3% (Dey et al., 2004). O outro trabalho, utilizou um total de 227 soros e a especificidade foi avaliada conforme o anticorpo anti-IgM e anti-IgG canino, apresentando valores de 96,4% e 95,5%, respectivamente (Andre-Fontaine et al., 2015).

Desse modo, no presente trabalho as proteínas recombinantes (rLigBrep e rLipL32) foram utilizadas como抗ígenos durante o desenvolvimento de testes sorológicos baseados em ELISA. Foram escolhidas essas proteínas por estarem presentes somente em espécies patogênicas da bactéria, auxiliando no diagnóstico correto da doença (Croda et al., 2007). Nesses testes foram avaliados a detecção dos anticorpos anti-IgG canino, pelo fato desses anticorpos apresentarem altos níveis na fase convalescente e também porque a maioria dos diagnósticos são feitos nessa fase da doença (Waggoner et al., 2014).

Essa diferença de sorovares prevalentes em cada região do país, pode ser vista nos resultados do MAT realizados na FIOCRUZ e na Faculdade de Medicina Veterinária da UFPel, onde em Salvador o sorovar mais prevalente foi Copenhageni (40 soros), seguido pelo Hardjobovis (31 soros), e em Pelotas os mais frequentes foram Canicola (8 soros), Mozdok (3 soros) e Copenhageni (2 soros). Esses dados enfatizam que na Região Sul do Brasil, em especial no Rio Grande do Sul, não há a prevalência de apenas um sorovar infectante em caninos. Isso se deve a alta proximidade entre as regiões rurais e urbanas, resultando no contato de cães com animais reservatórios de outros sorovares, ocasionando reações cruzadas no MAT. Isso resulta na dificuldade de diagnosticar corretamente o animal infectado, por necessitar de uma bateria com diversos sorovares e na limitação do uso da vacinação, pois seria fundamental que sua formulação dispusesse de vários sorovares para proteger esses animais.

Alguns soros do banco de soros caninos do LPDI foram submetidos novamente ao MAT, pois em testes de diagnóstico feitos anteriormente, como ELISA e Dot blot, alguns desses soros obtiveram resultados diferentes do MAT feito pela FIOCRUZ. Dessa forma, 129 soros caninos foram testados no MAT pelo LPDI com quatro sorovares para o diagnóstico correto, sendo eles: Copenhageni, Canicola, Hardjobovis e Autumnalis. Após essa análise, 40 soros que antes eram considerados negativos

pela FIOCRUZ passaram a ser classificados como positivos, com títulos iguais ou superiores a 1:50.

Em relação aos resultados apresentados, o teste de ELISA com a proteína rLigBrep apresenta resultados mais promissores do que a proteína rLipL32. Através da curva ROC, o teste com a proteína rLigBrep apresentou valores de 99% e 95% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Com a rLipL32, os melhores resultados foram obtidos também pelo ROC, demonstrando sensibilidade e especificidade de 90%. A rLigBrep possui valores de sensibilidade e especificidade maiores quando em comparação com outros trabalhos utilizando proteínas recombinantes, que apresentam valores variando entre 93-96% de sensibilidade e 84-97% de especificidade. Porém, ambas as proteínas estão dentro dos critérios para um teste ser considerado ideal, onde na fase convalescente, o teste deve ter no mínimo 90% de sensibilidade e especificidade (McBride et al., 2005, McBride et al., 2007a).

No que diz respeito aos resultados da análise de concordância Kappa, a rLigBrep obteve valor de 0,942 e a rLipL32 com valor de 0,790. Ambas as proteínas apresentaram valores considerados de excelente concordância com o teste padrão de diagnóstico, que no caso da leptospirose é o MAT. Como o MAT não é um teste com precisão diagnóstica quando não possui soros pareados, ou seja, um soro coletado na fase aguda e outro na fase convalescente, testes com valores de Kappa superiores a 0,75, já são considerados promissores.

O teste de ELISA-IgM com soros humanos utilizando a proteína LigBrep apresentado nesse trabalho, mostrou valores de 100% de sensibilidade e 72% de especificidade utilizando o *cut-off* padrão. Alterando esse valor de *cut-off* pelo gráfico ROC, o teste mudou os valores de sensibilidade e especificidade para 88% e 100% respectivamente. O teste ELISA-IgG utilizando soros humanos com a proteína LigBrep, obteve resultados de sensibilidade de 92% e de especificidade de 71% com o *cut-off* padrão. Após alterar esse valor pelo ROC, o teste aumentou a especificidade para 87% mas diminuiu a sensibilidade para 76%.

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho e dos artigos apresentados anteriormente que utilizam proteínas recombinantes na elaboração do teste de ELISA, podemos observar que o ELISA avaliando o anticorpo anti-IgM

humano obteve resultados semelhantes aos trabalhos citados, principalmente após a alteração do valor de *cut-off* pela curva ROC.

Nos testes realizados com o ELISA de captura, não ocorreu resultados esperados em nenhuma das diluições e combinações de anticorpos testados. Devido a isso, as atividades com esse formato de ELISA foram encerradas pelo grupo até obter explicações do motivo de estar ocorrendo reações inespecíficas em todos os testes nas maiores diluições de anticorpos.

A dissertação possui em anexo B o pedido de registro de patente para uso de rLigBrep como imunobiológico para prevenção, controle e diagnóstico da leptospirose. A patente intitulada como Polipeptídeo LigBNID de *Leptospira spp.* para uso como imunobiológico, está sendo avaliada pelo INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Resultados promissores com os soros caninos avaliados com a proteína rLigBrep, apresentando valores de sensibilidade de 99% e especificidade de 95%;
- Não obtivemos a padronização com o ELISA de captura, devido a reações inespecíficas;
- Parceria com a Universidade Federal de Goiás, para a colaboração no desenvolvimento de um teste rápido para caninos utilizando a LigBrep;
- Elaboração de um artigo científico para apresentar os resultados obtidos nesse trabalho.

9. ANEXOS

Anexo A. Tabela com resultados do MAT realizado pelo LPDI.

Tabela 2. Resultados do MAT realizado pelo LPDI.

Soros	L1-130	Canicola	Hardjobovis	Autumnalis
0174	-	-	-	-
273.1	X	X	X	-
0299	-	-	-	-
0354	-	X	X	-
0612	X	-	X	-
0751	X	X	X	X
0874	-	-	-	-
0919	-	-	-	-
1035	X	-	-	X
1094.1	-	-	-	-
1220	-	-	-	-
1564	X	-	X	-
1698	X	-	-	-
1894	X	-	-	-
2057	-	-	-	-
2222	X	-	X	X
2277	-	-	-	-
2388	X	-	-	-
2414	-	-	X	-
2419	-	-	-	-
2468	-	X	X	-
2468	-	-	-	-
2576	-	-	-	-
2599	-	-	X	-
2812	-	-	-	-
2820	-	-	-	-
2850	-	X	-	X
2875	X	-	X	-
2881	-	-	-	-
2894	-	-	-	-
2907	-	-	-	-
2909	-	-	-	-
2913	-	-	-	X
2943	X	-	-	-
2952.1	-	-	X	-
2953	-	-	-	-
2953	-	-	-	-
2954	-	-	-	-
2952.2	-	-	-	-
2963	-	-	X	-
2969	-	X	X	-

3031	-	-	-	-
3033	-	X	-	-
3034	X	-	-	-
3035.2	-	-	-	-
3062	X	-	-	-
3081	X	-	X	-
3161	-	X	X	X
3256	-	-	X	-
3298	-	-	-	-
3316	-	-	X	-
3317	-	-	X	-
3316.1	-	-	X	-
3337	X	-	X	-
3338	-	-	X	-
3378	X	-	-	-
3426	-	-	X	-
3436	-	-	-	-
3465	X	-	X	X
3471	X	-	-	-
3487	X	X	X	X
3496	-	-	-	-
3528	X	-	-	-
3575	-	-	-	-
3579	-	-	-	-
3599	X	X	X	X
3638.1	-	-	-	-
3641	-	-	X	
3642	-	-	X	X
3669	-	X	-	X
3670	X	X	X	-
3693	X	-	-	-
3703	-	-	-	-
3703	-	-	-	-
3837	X	-	X	-
3873	X	-	X	-
3887.1	-	X	-	-
3898	-	-	-	-
3915	-	-	-	-
3917	-	X	-	X
3923	-	X	-	-
3948	X	X	X	-
3953	-	-	-	-
3965	X	-	X	-
3979	-	-	-	-
3989	-	X	X	-
3991	-	-	X	-

3996	X	-	X	X
4013	-	X	-	-
4014	-	-	-	-
4017	-	-	-	-
4018	-	X	-	X
4029	X	-	-	-
4051	X	-	-	-
4080	X	X	X	X
4084	-	-	-	-
4096	X	-	X	-
4103	X	-	X	-
4105	-	-	-	-
4111	X	-	X	-
4145	-	-	-	-
4148	-	-	X	-
4188	X	-	-	-
4199	-	-	-	-
4210	-	-	-	-
4213	-	-	-	-
4236	-	-	X	-
4310	-	-	-	-
4334.1	-	-	-	-
4334.2	X	-	-	-
4358.2	X	X	X	-
4411	-	-	-	-
4481.1	-	-	-	-
4663	-	-	X	-
4830	-	-	X	-
5103	X	-	X	-
5181	-	-	-	-
5221	-	-	-	-
5317	-	X	X	-
5321.1	X	X	X	-
5533	-	-	X	-
5641	-	-	X	X
5730	-	-	X	-

Anexo B

Pedido de Patente:

Polipeptídeo LigBNID de *Leptospira* spp. para uso como imunobiológico.

Inventores:

Neida Lucia Conrad

Alan John Alexander McBride

Flávia Cruz McBride

Odir Dellagostin

Marcelle Silveira

Caroline Amurim Gonçalves

Luciana Zanini

Resumo da invenção

“Polipeptídeo LigBNID de *Leptospira* spp. para uso como imunobiológico”, refere-se ao isolamento de uma molécula de DNA, originalmente derivada do gene ligB de *L. interrogans*, que codifica para o polipeptídeo LigBNID, apresentando massa molecular de aproximadamente 54 kDa, que poderá ser usado para a prevenção da leptospirose como vacina ou componente vacinal, ou como componente no diagnóstico da leptospirose. O polipeptídeo recombinante é fortemente reconhecido pelo soro de pacientes com leptospirose, ou seja, é um marcador sorológico da infecção. A vacina baseada na proteína rLigBNID induziu imunidade protetora (80-100%) e esterilizante contra leptospirose letal em hamsters. De acordo com a presente invenção o polipeptídeo LigBNID, bem como a sequência que a codifica, poderão ser usados no diagnóstico e prevenção de leptospirose em humanos e animais.

10. REFERÊNCIAS

- ADESIYUN, A., CAMPBELL, M., RAHAMAN, S., BISSESSAR, S., STEWART-JOHNSON, A., DOOKERAN, S. & GITTEENS-ST HILAIRE, M. 2011. Frequency of detection of immunoglobulins of *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., and *Brucella abortus* in livestock/farm and abattoir workers in Trinidad. *J Agromedicine*, 16, 200-9.
- ADLER, B. 2015. *Leptospira and Leptospirosis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ADLER, B. & DE LA PENA MOCTEZUMA, A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, 287-96.
- AHMAD, S. N., SHAH, S. & AHMAD, F. M. 2005. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med*, 51, 195-200.
- AHMED, S. A., SANDAI, D. A., MUSA, S., HOE, C. H., RIADZI, M., LAU, K. L. & TANG, T. H. 2012. Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *Malays J Med Sci*, 19, 9-16.
- ALAVI, S. M. & KHOSHKHO, M. M. 2014. Seroprevalence study of leptospirosis among rice farmers in khuzestan province, South west iran, 2012. *Jundishapur J Microbiol*, 7, e11536.
- ANDRE-FONTAINE, G., AVIAT, F., MARIE, J. L. & CHATRENET, B. 2015. Undiagnosed leptospirosis cases in naive and vaccinated dogs: properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154-178). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 39, 1-8.
- ATHANAZIO, D. A., SANTOS, C. S., SANTOS, A. C., MCBRIDE, F. W. & REIS, M. G. 2008. Experimental infection in tumor necrosis factor alpha receptor, interferon gamma and interleukin 4 deficient mice by pathogenic *Leptospira* interrogans. *Acta Trop*, 105, 95-8.
- BABIC-ERCEG, A., KARLOVIC-MARTINKOVIC, D., SANTINI, M., PERSIC, Z. & VILIBIC-CAVLEK, T. 2014. Early diagnosis of leptospirosis. *Infect Dis Rep*, 6, 5156.
- BAJANI, M. D., ASHFORD, D. A., BRAGG, S. L., WOODS, C. W., AYE, T., SPIEGEL, R. A., PLIKAYTIS, B. D., PERKINS, B. A., PHELAN, M., LEVETT, P. N. & WEYANT, R. S. 2003. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 41, 803-9.
- BARBOSA, A. S., MONARIS, D., SILVA, L. B., MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A., CIANCIARULLO, A. M., ISAAC, L. & ABREU, P. A. 2010. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun*, 78, 3207-16.
- BAROCCHI, M. A., KO, A. I., REIS, M. G., MCDONALD, K. L. & RILEY, L. W. 2002. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira* interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun*, 70, 6926-32.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICALDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3, 757-71.
- BLANCO, R. M., DOS SANTOS, L. F., GALLOWAY, R. L. & ROMERO, E. C. 2016. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 44, 34-6.
- BLEICH, A. & NICKLAS, W. 2008. [Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as laboratory or pet animals]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 121, 241-55.

- BLUM DOMINGUEZ SDEL, C., CHI DZIB, M. Y., MALDONADO VELAZQUEZ, M. G., NUNEZ OREZA, L. A., GOMEZ SOLANO, M. I., CABALLERO POOT, R. I. & TAMAY SEGOVIA, P. 2013. Detection of reactive canines to *Leptospira* in Campeche City, Mexico. *Rev Argent Microbiol*, 45, 34-8.
- BOURHY, P., COLLET, L., BRISSE, S. & PICARDEAU, M. 2014. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 4061-7.
- BROWNLOW, T., KAVANAGH, O. V., LOGAN, E. F., HARTSKEERL, R. A., SAVAGE, R., PALMER, M. F., KRAHL, M., MACKIE, D. P. & ELLIS, W. A. 2014. 'Leptorapide' - a one-step assay for rapid diagnosis of human leptospirosis. *Epidemiol Infect*, 142, 1182-7.
- BUDIHAL, S. V. & PERWEZ, K. 2014. Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. *J Clin Diagn Res*, 8, 199-202.
- CAMERON, C. E., ZUERNER, R. L., RAVERTY, S., COLEGROVE, K. M., NORMAN, S. A., LAMBOURN, D. M., JEFFRIES, S. J. & GULLAND, F. M. 2008. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol*, 46, 1728-33.
- CERQUEIRA, G. M. & PICARDEAU, M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol*, 9, 760-8.
- CHEN, H. W., ZHANG, Z., HALSEY, E. S., GUEVARA, C., CANAL, E., HALL, E., MAVES, R., TILLEY, D. H., KOCHEL, T. J. & CHING, W. M. 2013. Detection of *Leptospira*-specific antibodies using a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*, 89, 1088-94.
- CHOY, H. A., KELLEY, M. M., CHEN, T. L., MOLLER, A. K., MATSUNAGA, J. & HAAKE, D. A. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira* interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*, 75, 2441-50.
- COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON, P., MARTINEZ-SILVEIRA, M. S., STEIN, C., ABELA-RIDDER, B. & KO, A. I. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003898.
- CRODA, J., RAMOS, J. G., MATSUNAGA, J., QUEIROZ, A., HOMMA, A., RILEY, L. W., HAAKE, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2007. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 45, 1528-34.
- CULLEN, P. A., CORDWELL, S. J., BULACH, D. M., HAAKE, D. A. & ADLER, B. 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira* interrogans serovar Lai. *Infect Immun*, 70, 2311-8.
- CULLEN, P. A., HAAKE, D. A. & ADLER, B. 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev*, 28, 291-318.
- CULLEN, P. A., XU, X., MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., KO, A. I., HAAKE, D. A. & ADLER, B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun*, 73, 4853-63.
- DAHAL, K. P., SHARMA, S., SHERCHAND, J. B., UPADHYAY, B. P. & BHATTA, D. R. 2016. Detection of Anti-*Leptospira* IgM Antibody in Serum Samples of Suspected Patients Visiting National Public Health Laboratory, Teku, Kathmandu. *Int J Microbiol*, 2016, 7286918.
- DAHER, E. F., LIMA, R. S., SILVA JUNIOR, G. B., SILVA, E. C., KARBAGE, N. N., KATAOKA, R. S., CARVALHO JUNIOR, P. C., MAGALHAES, M. M., MOTA, R.

- M. & LIBORIO, A. B. 2010. Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. *Braz J Infect Dis*, 14, 3-10.
- DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANN, A. A., HARTWIG, D. D., FELIX, S. R., DA SILVA, E. F. & MCBRIDE, A. J. 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin*, 7, 1215-24.
- DESVARS, A., CARDINALE, E. & MICHault, A. 2011. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiol Infect*, 139, 167-88.
- DEY, S., MADHAN MOHAN, C., RAMADASS, P. & NACHIMUTHU, K. 2007. Recombinant antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of leptospirosis. *Vet Res Commun*, 31, 9-15.
- DEY, S., MOHAN, C. M., KUMAR, T. M., RAMADASS, P., NAINAR, A. M. & NACHIMUTHU, K. 2004. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol*, 103, 99-106.
- ELLIS, W. A. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec*, 167, 602-5.
- FAINE, S. B., ADLER, B., BOLIN, C. & PEROLAT, P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*, Melbourne, MediSci.
- FONTANA, C., CRUSSARD, S., SIMON-DUFAY, N., PIALOT, D., BOMCHIL, N. & REYES, J. 2017. Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic Leptospira strains. *J Microbiol Methods*, 132, 34-40.
- FORNAZARI, F., DA SILVA, R. C., RICHINI-PEREIRA, V. B., BESERRA, H. E., LUVIZOTTO, M. C. & LANGONI, H. 2012. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect Leptospira spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods*, 90, 321-6.
- GAMBERINI, M., GOMEZ, R. M., ATZINGEN, M. V., MARTINS, E. A., VASCONCELLOS, S. A., ROMERO, E. C., LEITE, L. C., HO, P. L. & NASCIMENTO, A. L. 2005. Whole-genome analysis of Leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*, 244, 305-13.
- GORIS, M. G., BOER, K. R., DUARTE, T. A., KLIFFEN, S. J. & HARTSKEERL, R. A. 2013a. Human leptospirosis trends, the Netherlands, 1925-2008. *Emerg Infect Dis*, 19, 371-8.
- GORIS, M. G., LEEFLANG, M. M., LODEN, M., WAGENAAR, J. F., KLATSER, P. R., HARTSKEERL, R. A. & BOER, K. R. 2013b. Prospective evaluation of three rapid diagnostic tests for diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2290.
- GOUVEIA, E. L., METCALFE, J., DE CARVALHO, A. L., AIRES, T. S., VILLASBOAS-BISNETO, J. C., QUEIRROZ, A., SANTOS, A. C., SALGADO, K., REIS, M. G. & KO, A. I. 2008. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14, 505-508.
- GUERRA, M. A. 2013. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals*, 41, 295-7.
- GUERREIRO, H., CRODA, J., FLANNERY, B., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., GALVAO, R. M., LEVETT, P. N., KO, A. I. & HAAKE, D. A. 2001. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun*, 69, 4958-4968.
- HAAKE, D. A. 2000. Leptospiral outer membrane protein, LipL46. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents*, 1239, No Pagination.

- HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., BARNETT, J. K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P. N. & BOLIN, C. A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*, 68, 2276-85.
- HAAKE, D. A., SUCHARD, M. A., KELLEY, M. M., DUNDOO, M., ALT, D. P. & ZUERNER, R. L. 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol*, 186, 2818-28.
- HARTSKEERL, R. A., COLLARES-PEREIRA, M. & ELLIS, W. A. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*, 17, 494-501.
- HERNANDEZ-RODRIGUEZ, P., DIAZ, C. A., DALMAU, E. A. & QUINTERO, G. M. 2011. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods*, 84, 1-7.
- IWASAKI, H., CHAGAN-YASUTAN, H., LEANO, P. S., KOIZUMI, N., NAKAJIMA, C., TAURUSTIATI, D., HANAN, F., LACUESTA, T. L., ASHINO, Y., SUZUKI, Y., GLORIANI, N. G., TELAN, E. F. & HATTORI, T. 2016. Combined antibody and DNA detection for early diagnosis of leptospirosis after a disaster. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 84, 287-91.
- JORGE, S., MONTE, L. G., DE OLIVEIRA, N. R., COLLARES, T. F., ROLOFF, B. C., GOMES, C. K., HARTWIG, D. D., DELLAGOSTIN, O. A. & HARTLEBEN, C. P. 2015. Phenotypic and Molecular Characterization of *Leptospira interrogans* Isolated from *Canis familiaris* in Southern Brazil. *Curr Microbiol*.
- KAMATH, R., SWAIN, S., PATTANSHETTY, S. & NAIR, N. S. 2014. Studying risk factors associated with human leptospirosis. *J Glob Infect Dis*, 6, 3-9.
- KING, A. M., PRETRE, G., BARTPHO, T., SERMSWAN, R. W., TOMA, C., SUZUKI, T., ESHGHI, A., PICARDEAU, M., ADLER, B. & MURRAY, G. L. 2014. High-temperature protein G is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 82, 1123-31.
- KITASHOJI, E., KOIZUMI, N., LACUESTA, T. L., USUDA, D., RIBO, M. R., TRIA, E. S., GO, W. S., KOJIRO, M., PARRY, C. M., DIMAANO, E. M., VILLARAMA, J. B., OHNISHI, M., SUZUKI, M. & ARIYOSHI, K. 2015. Diagnostic Accuracy of Recombinant Immunoglobulin-like Protein A-Based IgM ELISA for the Early Diagnosis of Leptospirosis in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003879.
- KO, A. I., GALVAO REIS, M., RIBEIRO DOURADO, C. M., JOHNSON, W. D., JR. & RILEY, L. W. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*, 354, 820-5.
- KO, A. I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 736-47.
- KODJO, A., CALLEJA, C., LOENSER, M., LIN, D. & LIZER, J. 2016. A Rapid In-Clinic Test Detects Acute Leptospirosis in Dogs with High Sensitivity and Specificity. *Biomed Res Int*, 2016, 3760191.
- LAMBERT, A., TAKAHASHI, N., CHARON, N. W. & PICARDEAU, M. 2012. Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. *Appl Environ Microbiol*, 78, 8467-9.
- LAMEIRE, N., VAN BIESEN, W. & VANHOLDER, R. 2006. The changing epidemiology of acute renal failure. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2, 364-77.
- LANGSTON, C. E. & HEUTER, K. J. 2003. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33, 791-807.

- LELU, M., MUÑOZ-ZANZI, C., HIGGINS, B. & GALLOWAY, R. 2015. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Ríos Region, Chile. *BMC Vet Res*, 11, 31.
- LEVETT, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14, 296-326.
- LEVETT, P. N., BRANCH, S. L., WHITTINGTON, C. U., EDWARDS, C. N. & PAXTON, H. 2001. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 349-51.
- LEVETT, P. N., MOREY, R. E., GALLOWAY, R. L., TURNER, D. E., STEIGERWALT, A. G. & MAYER, L. W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*, 54, 45-9.
- LILENBAUM, W., VARGES, R., RISTOW, P., CORTEZ, A., SOUZA, S. O., RICHTZENHAIN, L. J. & VASCONCELLOS, S. A. 2009. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci*.
- LO, M., CORDWELL, S. J., BULACH, D. M. & ADLER, B. 2009. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e560.
- MAJOR, A., SCHWEIGHAUSER, A. & FRANCEY, T. 2014. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health*, 11, 7242-60.
- MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M. A., CRODA, J., YOUNG, T. A., SANCHEZ, Y., SIQUEIRA, I., BOLIN, C. A., REIS, M. G., RILEY, L. W., HAAKE, D. A. & KO, A. I. 2003. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*, 49, 929-45.
- MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2005. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 18, 376-86.
- MCBRIDE, A. J., PEREIRA, F. A., DA SILVA, E. D., DE MATOS, R. B., DA SILVA, E. D., FERREIRA, A. G., REIS, M. G. & KO, A. I. 2007a. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop*, 102, 206-11.
- MCBRIDE, A. J., SANTOS, B. L., QUEIROZ, A., SANTOS, A. C., HARTSKEERL, R. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2007b. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 1245-8.
- MELO, C. B., REIS, R. B., KO, A. I., BARRETO, C. M., LIMA, A. P. & SILVA, A. M. 2011. [Geographical distribution of leptospirosis in Aracaju, State of Sergipe from 2001 to 2007]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44, 475-80.
- MILLER, M. D., ANNIS, K. M., LAPPIN, M. R. & LUNN, K. F. 2011. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *J Vet Intern Med*, 25, 426-32.
- MIRAGLIA, F., DE MORAIS, Z. M., DELLAGOSTIN, O. A., SEIXAS, F. K., FREITAS, J. C., ZACARIAS, F. G., DELBEM, A. C., FERREIRA, T. S., SOUZA, G. O., HARTSKEERL, R. A., VASCONCELLOS, S. A. & MORENO, A. M. 2012. Molecular and serological characterization of *Leptospira* interrogans serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 45, 117-21.
- MONTE, L. G., RIDIERI, K. F., JORGE, S., OLIVEIRA, N. R., HARTWIG, D. D., AMARAL, M. G., HARTLEBEN, C. P. & DELLAGOSTIN, O. A. 2015.

- Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine foetus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 40, 41-5.
- MORIKAWA, V. M., BIER, D., PELLIZZARO, M., ULLMANN, L. S., PAPLOSKI, I. A., KIKUTI, M., LANGONI, H., BIONDO, A. W. & MOLENTO, M. B. 2015. Seroprevalence and seroincidence of *Leptospira* infection in dogs during a one-year period in an endemic urban area in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 48, 50-5.
- MUGHINI-GRAS, L., BONFANTI, L., NATALE, A., COMIN, A., FERRONATO, A., LA GRECA, E., PATREGNANI, T., LUCCHESE, L. & MARANGON, S. 2014. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiol Infect*, 142, 1172-81.
- MUNOZ-ZANZI, C., MASON, M., ENCINA, C., GONZALEZ, M. & BERG, S. 2014. Household characteristics associated with rodent presence and *Leptospira* infection in rural and urban communities from Southern Chile. *Am J Trop Med Hyg*, 90, 497-506.
- NABILITY, S. A., RIBEIRO, G. S., AQUINO, C. L., TAKAHASHI, D., DAMIAO, A. O., GONCALVES, A. H., MIRANDA-FILHO, D. B., GREENWALD, R., ESFANDIARI, J., LYASHCHENKO, K. P., REIS, M. G., MEDEIROS, M. A. & KO, A. I. 2012. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1878.
- NALLY, J. E., CHANTRANUWAT, C., WU, X. Y., FISHBEIN, M. C., PEREIRA, M. M., DA SILVA, J. J., BLANCO, D. R. & LOVETT, M. A. 2004. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol*, 164, 1115-27.
- NALLY, J. E., WHITELEGGE, J. P., BASSILIAN, S., BLANCO, D. R. & LOVETT, M. A. 2007. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun*, 75, 766-73.
- OLIVEIRA, T. R., LONGHI, M. T., GONCALES, A. P., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. & NASCIMENTO, A. L. 2010. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes Infect*, 12, 207-17.
- OTAKA, D. Y., MARTINS, G., HAMOND, C., PENNA, B., MEDEIROS, M. A. & LILENBAUM, W. 2012. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Vet Rec*, 170, 338.
- PALANIAPPAN, R. U., RAMANUJAM, S. & CHANG, Y. F. 2007. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*, 20, 284-92.
- PAPA, A., THEOHARIDOU, D. & ANTONIADIS, A. 2009. Pulmonary involvement and leptospirosis, Greece. *Emerg Infect Dis*, 15, 834-5.
- PAPPAS, G. & CASCIO, A. 2006. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. *Int J Antimicrob Agents*, 28, 491-6.
- PEREIRA, M. M., DA SILVA, J. J., PINTO, M. A., DA SILVA, M. F., MACHADO, M. P., LENZI, H. L. & MARCHEVSKY, R. S. 2005. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 13-20.
- PICARDEAU, M. 2008. Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Appl Environ Microbiol*, 74, 319-22.
- PICARDEAU, M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*, 43, 1-9.

- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULLOUDIS, A. N., DURSKI, K. & HARTSKEERL, R. A. 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78, 1-8.
- PRESCOTT, J. 2008. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *Cmaj*, 178, 397-8.
- RAJAPAKSE, S., WEERATUNGA, P., NILOOFA, M. J., FERNANDO, N., RODRIGO, C., MADURANGA, S., FERNANDO, N. L., DE SILVA, H. J., KARUNANAYAKE, L. & HANDUNNETTI, S. 2015. Clinical and laboratory associations of severity in a Sri Lankan cohort of patients with serologically confirmed leptospirosis: a prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 109, 710-6.
- RICALDI, J. N., FOUTS, D. E., SELENGUT, J. D., HARKINS, D. M., PATRA, K. P., MORENO, A., LEHMANN, J. S., PURUSHE, J., SANKA, R., TORRES, M., WEBSTER, N. J., VINETZ, J. M. & MATTHIAS, M. A. 2012. Whole genome analysis of *Leptospira* licerasiae provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1853.
- RICALDI, J. N. & VINETZ, J. M. 2006. Leptospirosis in the tropics and in travelers. *Curr Infect Dis Rep*, 8, 51-8.
- RISTOW, P., BOURHY, P., DA CRUZ MCBRIDE, F. W., FIGUEIRA, C. P., HUERRE, M., AVE, P., GIRONS, I. S., KO, A. I. & PICARDEAU, M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*, 3, e97.
- SCHLICHTING, D., NOCKLER, K., BAHN, P., LUGE, E., GREINER, M., MULLER-GRAF, C. & MAYER-SCHOLL, A. 2015. Estimation of the sensitivity and specificity of a *Leptospira* spp. in-house ELISA through Bayesian modelling. *Int J Med Microbiol*, 305, 756-61.
- SCHULLER, S., FRANCEY, T., HARTMANN, K., HUGONNARD, M., KOHN, B., NALLY, J. E. & SYKES, J. 2015. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract*, 56, 159-79.
- SEENICHAMY, A., BAHAMAN, A. R., MUTALIB, A. R. & KHAIRANI-BEJO, S. 2014. Production and characterization of a polyclonal antibody of anti-rLipL21-IgG against *Leptospira* for early detection of acute leptospirosis. *Biomed Res Int*, 2014, 592858.
- SMITS, H. L., EAPEN, C. K., SUGATHAN, S., KURIAKOSE, M., GASEM, M. H., YERSIN, C., SASAKI, D., PUJANTO, B., VESTERING, M., ABDOEL, T. H. & GUSSENHOVEN, G. C. 2001. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 166-9.
- SRIMANOTE, P., WONGDEETHAI, N., JIEANAMPUNKUL, P., SAMONKIERT, S., LEEPIYASAKULCHAI, C., KALAMBAHETI, T. & PRACHAYASITTIKUL, V. 2008. Recombinant liga for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. *J Microbiol Methods*, 72, 73-81.
- STEVENSON, B., CHOY, H. A., PINNE, M., ROTONDI, M. L., MILLER, M. C., DEMOLL, E., KRAICZY, P., COOLEY, A. E., CREAMER, T. P., SUCHARD, M. A., BRISSETTE, C. A., VERMA, A. & HAAKE, D. A. 2007. Leptospira interrogans Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *PLoS ONE*, 2, e1188.
- STORCK, C. H., POSTIC, D., LAMAURY, I. & PEREZ, J. M. 2008. Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003--2004, a two El Nino Southern Oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect*, 136, 1407-15.

- SUBATHRA, M., SENTHILKUMAR, T. M., RAMADASS, P. & DHINAKAR RAJ, G. 2009. Development of rapid flow-through-based dot-immunoassay for serodiagnosis of leptospirosis in dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.
- SUBHARAT, S., WILSON, P. R., HEUER, C. & COLLINS-EMERSON, J. M. 2011. Vaccination for leptospirosis improved the weaning percentage of 2-year-old farmed red deer hinds in New Zealand. *N Z Vet J*, 59, 191-6.
- SUEPAUL, S. M., CARRINGTON, C. V., CAMPBELL, M., BORDE, G. & ADESIYUN, A. A. 2011. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Trop Anim Health Prod*, 43, 367-75.
- SYKES, J. E., HARTMANN, K., LUNN, K. F., MOORE, G. E., STODDARD, R. A. & GOLDSTEIN, R. E. 2011. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med*, 25, 1-13.
- TALPADA, M. D., GARVEY, N., SPROWLS, R., EUGSTER, A. K. & VINETZ, J. M. 2003. Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 3, 141-7.
- THORNLEY, C. N., BAKER, M. G., WEINSTEIN, P. & MAAS, E. W. 2002. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiology and Infection*, 128, 29-36.
- TOPAZIO, J., TONIN, A. A., MACHADO, G., NOLL, J. C., RIBEIRO, A., MOURA, A. B., CARMO, G. M., GROSSKOPF, H. M., MARTINS, J. L., BADKE, M. R., STEFANI, L. M., LOPES, L. S. & DA SILVA, A. S. 2015. Antibodies to Leptospira interrogans in goats and risk factors of the disease in Santa Catarina (West side), Brazil. *Res Vet Sci*, 99, 53-7.
- TUBIANA, S., MIKULSKI, M., BECAM, J., LACASSIN, F., LEFEVRE, P., GOURINAT, A. C., GOARANT, C. & D'ORTENZIO, E. 2013. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e1991.
- VALVERDE MDE, L., GORIS, M. G., GONZALEZ, V., ANCHIA, M. E., DIAZ, P., AHMED, A. & HARTSKEERL, R. A. 2013. New serovars of Leptospira isolated from patients in Costa Rica: implications for public health. *J Med Microbiol*, 62, 1263-71.
- VANASCO, N. B., JACOB, P., LANDOLT, N., CHIANI, Y., SCHMELING, M. F., CUDOS, C., TARABLA, H. & LOTTERSBERGER, J. 2016. Diagnostic accuracy of an IgM enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with 2 polymerase chain reactions for early diagnosis of human leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 84, 292-7.
- VANITHAMANI, S., SHANMUGHAPRIYA, S., NARAYANAN, R., RAJA, V., KANAGAVEL, M., SIVASANKARI, K. & NATARAJASEENIVASAN, K. 2015. Lipopolysaccharide Specific Immunochromatography Based Lateral Flow Assay for Serogroup Specific Diagnosis of Leptospirosis in India. *PLoS One*, 10, e0137130.
- VIEIRA, M. L., GAMA-SIMOES, M. J. & COLLARES-PEREIRA, M. 2006. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis*.
- VILLANUEVA, M. A., MINGALA, C. N., BALBIN, M. M., NAKAJIMA, C., ISODA, N., SUZUKI, Y. & KOIZUMI, N. 2016. Molecular epidemiology of pathogenic Leptospira spp. among large ruminants in the Philippines. *J Vet Med Sci*.
- VIRATYOSIN, W., INGSRISWANG, S., PACHARAWONGSAKDA, E. & PALITTAPOONGARNPIM, P. 2008. Genome-wide subcellular localization of

- putative outer membrane and extracellular proteins in *Leptospira interrogans* serovar Lai genome using bioinformatics approaches. *BMC Genomics*, 9, 181.
- WAGENAAR, J. F., FALKE, T. H., NAM, N. V., BINH, T. Q., SMITS, H. L., COBELENS, F. G. & DE VRIES, P. J. 2004. Rapid serological assays for leptospirosis are of limited value in southern Vietnam. *Ann Trop Med Parasitol*, 98, 843-50.
- WAGGONER, J. J., BALASSIANO, I., ABEYNAYAKE, J., SAHOO, M. K., MOHAMED-HADLEY, A., LIU, Y., VITAL-BRAZIL, J. M. & PINSKY, B. A. 2014. Sensitive real-time PCR detection of pathogenic *Leptospira* spp. and a comparison of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of leptospirosis. *PLoS One*, 9, e112356.
- WHO 2011. Leptospirosis: an emerging public health problem. *Wkly Epidemiol Rec*, 86, 45-50.
- WHO & ILS 2003. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.*, Malta, World Health Organization.
- XUE, F., DONG, H., WU, J., WU, Z., HU, W., SUN, A., TROXELL, B., YANG, X. F. & YAN, J. 2010. Transcriptional responses of *Leptospira interrogans* to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e857.
- YANG, C. W., HUNG, C. C., WU, M. S., TIAN, Y. C., CHANG, C. T., PAN, M. J. & VANDEWALLE, A. 2006. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int*, 69, 815-22.
- YE, C., YAN, W., MCDONOUGH, P. L., MCDONOUGH, S. P., MOHAMED, H., DIVERS, T. J., CHANG, Y. F. & YANG, Z. 2014a. Serodiagnosis of equine leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay using four recombinant protein markers. *Clin Vaccine Immunol*, 21, 478-83.
- YE, C., YAN, W., XIANG, H., HE, H., YANG, M., IJAZ, M., USEH, N., HSIEH, C. L., MCDONOUGH, P. L., MCDONOUGH, S. P., MOHAMED, H., YANG, Z. & CHANG, Y. F. 2014b. Recombinant antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays in dogs. *PLoS One*, 9, e111367.
- ZAKI, S. A. & SHANBAG, P. 2010. Clinical manifestations of dengue and leptospirosis in children in Mumbai: an observational study. *Infection*, 38, 285-91.