

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Identificação de novos antígenos para diagnóstico
sorológico de leptospirose canina**

Gabriana Nathália Rosa Timm

Pelotas, 2020

Gabriana Nathália Rosa Timm

**Identificação de novos antígenos para diagnóstico sorológico de leptospirose
canina**

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 aplicada à saúde).

Orientador: Alan John Alexander McBride

Coorientadora: Carolina Rodrigues Félix

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T584a Timm, Gabriela Nathália Rosa

Avaliação de novos antígenos para diagnóstico sorológico de leptospirose canina / Gabriela Nathália Rosa Timm ; Alan John Alexander McBride, orientador ; Carolina Rodrigues Félix, coorientadora. — Pelotas, 2020.

82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Leptospirose. 2. Proteína recombinante. 3. Diagnóstico. 4. Elisa. 5. Sorologia. I. McBride, Alan John Alexander, orient. II. Félix, Carolina Rodrigues, coorient. III. Título.

CDD : 614.56

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcelo de Lima (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária)

Dra. Carolina Rodrigues Félix (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Para meus pais, irmão e noivo, com carinho e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

À minha família, principalmente a meus pais, que me deram a força, o amor e o apoio necessários para que estes últimos anos se tonassem possíveis. Muito obrigada. Sem vocês eu não sou nada.

Ao meu namorado, agora noivo, pela paciência e por também sempre estar ao meu lado me apoiando, amando e aturando minhas inseguranças e medos.

Ao meu orientador, Alan, e aos meus colegas e amigos do LPDI, por tudo o que me ensinaram, pela paciência, parceria e pelas risadas que faziam meus dias serem mais leves.

Às minhas amigas Liana e Amanda pela parceria no dia a dia, pelos abraços, conselhos, força e empurrões. Vocês foram essenciais nessa jornada.

À CAPES e à Royal Society pelo apoio financeiro fornecido.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você
realmente para e encara o medo de frente.”

Eleanor Roosevelt

Resumo

TIMM, Gabriela Nathália Rosa. **Identificação de novos antígenos para diagnóstico sorológico de leptospirose canina.** 2020. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose negligenciada com distribuição mundial. É causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Este patógeno adentra no hospedeiro através de mucosas ou abrasões na pele, e sua transmissão pode ocorrer através do contato direto com animais infectados ou indireto com a água ou solos contaminados. A única vacina disponível comercialmente consiste em bactérias inativadas, possui diversas limitações e é de uso majoritariamente veterinário. Cães são potenciais disseminadores do patógeno em ambientes urbanos, oferecendo risco aos seres humanos. A leptospirose canina pode se manifestar com febre, calafrios, uveíte, lesões renais e hepáticas, dentre outros sinais. O diagnóstico laboratorial apresenta dificuldades, pois os métodos disponíveis atualmente não são rápidos e fáceis de serem aplicados em uma situação endêmica. Estes métodos são fastidiosos, de alto custo e, muitas vezes, de baixa sensibilidade. Com isso, o real peso da leptospirose no mundo é preocupantemente subestimado. Em vista dos argumentos apresentados, é de extrema importância o desenvolvimento de um teste diagnóstico sensível e específico, de fácil e rápida execução e capaz de detectar a doença em sua fase inicial. Proteínas de membrana externa são amplamente estudadas nos ramos de vacinologia e diagnóstico. Neste trabalho, oito novas proteínas recombinantes identificadas por bioinformática foram produzidas e avaliadas como potenciais alvos no desenvolvimento de um teste de ELISA indireto utilizando soros caninos. A proteína OmpL125, no ELISA-IgM, apresentou 90,9% de sensibilidade e 78,2% de especificidade; e, no ELISA-IgG, apresentou 81,8% de sensibilidade e 73,9% de especificidade, sendo os melhores resultados entre as proteínas testadas. Estes valores não são satisfatórios para um novo método diagnóstico comercial. Tendo em vista os aspectos observados, esses testes sorológicos não se mostram promissores e reproduzíveis para diagnóstico de leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose, proteína recombinante, diagnóstico, ELISA, sorologia.

Abstract

TIMM, Gabriela Nathália Rosa. **Identification of new antigens for serological diagnosis of canine leptospirosis**. 2020. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a neglected zoonosis with a worldwide distribution. It is caused by pathogenic bacteria belonging to the genus *Leptospira*. This pathogen enters the host through the mucous membranes or skin abrasions and can be transmitted by direct contact with infected animals or indirect contact with contaminated water and soil. The only commercially available vaccines are based on inactivated bacteria, they have several limitations and are mainly for veterinary use. Dogs are potential disseminators of the pathogen in urban environments, representing a risk to human beings. Canine leptospirosis can manifest as fever, chills, uveitis, kidney and liver damage, among other signs. Laboratory diagnosis is limited; the available methods take time and are not easily applied in an endemic setting. In addition, diagnosis tends to be laborious, expensive and often has poor sensitivity. Thus, the true global burden of leptospirosis is worryingly underestimated. Therefore, it is extremely important to develop a diagnostic assay that is sensitive, specific, easy and quick to perform and that is able to detect the disease in its early phase. Outer membrane proteins are widely studied in the fields of vaccinology and diagnosis. In this work, eight novel recombinant proteins identified by bioinformatics were produced and evaluated as potential targets for the development of an indirect ELISA using canine sera. Amongst them, OmpL125 protein, in an ELISA-IgM, presented 90,9% sensitivity and 78,2% specificity; and in an ELISA-IgG presented 81,8% sensitivity and 73,9% specificity, with these being the best results among the analyzed proteins. These results are not suitable for a new commercial diagnostic method. These serological tests are neither satisfactory nor reproducible for the diagnosis of canine leptospirosis.

Keywords: Leptospirosis, recombinant protein, diagnosis, ELISA, serology.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema tridimensional das proteínas.....	17
Figura 2. (A) Caracterização por SDS-PAGE das proteínas recombinantes produzidas. (B) <i>Western blot</i> das mesmas amostras.....	23
Figura 3. Capacidade de reconhecimento dos soros positivos no WB.....	24
Figura 4. Capacidade de reconhecimento dos soros negativos no WB	24
Figura 5. Melhores valores de absorbância obtidos na segunda série de <i>checkerboards</i> das proteínas CSIP08, CSIP10, Quimera e OmpL115.	25
Figura 6. Melhores valores de absorbância obtidos na segunda série de <i>checkerboards</i> das proteínas OmpL125, OmpL68, OmpL72 e OmpL94.	26
Figura 7. Valores de absorbância obtidos após a adaptação do protocolo para a proteína OmpL125.	27
Figura 8. Valores de absorbância alcançados com os soros individuais e proteína OmpL125.....	27
Figura 9. Distribuição espacial comparando os valores positivos e negativos obtidos com os soros caninos.....	28
Figura 10. Comparação entre os dados obtidos de sensibilidade e especificidade com a curva ROC.....	28
Figura 11. Comparação entre as médias dos valores de absorbância dos soros positivos e negativos através do teste T de Welch.....	29
Figura 12. Capacidade de reconhecimentos dos soros por <i>Western blot</i>	35
Figura 13. <i>Checkerboards</i> da proteína CSIP08 (ELISA-IgG).	36
Figura 14. <i>Checkerboards</i> da proteína CSIP08 (ELISA-IgM).	37
Figura 15. <i>Checkerboards</i> da proteína CSIP10 (ELISA-IgG)	38
Figura 16. <i>Checkerboards</i> da proteína CSIP10 (ELISA-IgM)	39

Figura 17. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL115 (ELISA-IgG).....	40
Figura 18. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL115 (ELISA-IgM).....	41
Figura 19. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL125 (ELISA-IgG).....	42
Figura 20. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL125 (ELISA-IgM).....	43
Figura 21. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL68 (ELISA-IgG).....	44
Figura 22. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL68 (ELISA-IgM).....	45
Figura 23. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL72 (ELISA-IgG).....	46
Figura 24. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL72 (ELISA-IgM).....	47
Figura 25. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL94 (ELISA-IgG).....	48
Figura 26. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL94 (ELISA-IgM).....	49
Figura 27. <i>Checkerboards</i> da proteína OmpL94 (ELISA-IgG) utilizando soros de hamsters.....	50
Figura 28. <i>Checkerboards</i> da químera (ELISA-IgG).....	51
Figura 29. <i>Checkerboards</i> da químera (ELISA-IgM).....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de aminoácidos das porções expostas escolhidos para constituírem a quimera.	17
Tabela 2. Representação do esquema das placas da primeira série de <i>checkerboards</i>	20
Tabela 3. Organização das placas na segunda série de <i>checkerboards</i>	21
Tabela 4. Concentração das proteínas recombinantes.	23

Lista de Abreviaturas

BA – Bahia

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

BCA – *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinconínico)

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DO – Densidade ótica

DPP – *Dual path platform* (Plataforma de via dupla)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

FCPA – *Flagellar-coiling protein A* (Proteína de enrolamento flagelar A)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HRP – *Horseradish peroxidase*

IGG – Imunoglobulina G

IGM – Imunoglobulina M

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

LAMP – *Loop-mediated isothermal amplification* (Amplificação isotérmica mediada por alça)

LB – Luria-Bertani

LFA – *Lateral flow assay* (Cromatografia de fluxo lateral)

LIG – *Leptospiral immunoglobulin-like* (Proteínas de *Leptospira* semelhantes a imunoglobulinas)

LPDI – Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas

LPS – Lipopolissacarídeos

MAT – *Microscopic agglutination test* (Teste de aglutinação microscópica)

OPD – *O-phenylenediamine* (O-fenilenodiamina)

PAMP – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a patógenos)

PBS – *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

PBS-T – Tampão fosfato-salino acrescido de 0,05% de Tween 20

PCR – *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PFGE – *Pulsed-field gel electrophoresis* (Eletroforese de gel em campo pulsado)

PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (Fluoreto de fenilmetilsulfonil)

PRR – *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento de padrões)

ROC – *Receiver operating characteristic* (Característica de Operação do Receptor)

RPM – Rotações por minuto

SDS – *Sodium dodecyl sulphate* (Dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE – *SDS polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS)

TA – Temperatura ambiente

TLR – *Toll-like receptors* (Receptores do tipo Toll)

VE – Vacinologia estrutural (VE)

VR – Vacinologia reversa

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Leptospirose	3
2.2	Agente etiológico.....	4
2.2.1	A membrana externa de <i>Leptospira</i> spp.....	5
2.3	Prevenção e controle	6
2.4	Patogênese e fatores de virulência.....	7
2.5	Resposta do hospedeiro	8
2.6	Sinais e sintomas	9
2.7	Diagnóstico	9
2.7.1	Cultura da bactéria	9
2.7.2	Teste de aglutinação microscópica (MAT).....	10
2.7.3	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – ELISA)	11
2.7.4	Testes rápidos	12
2.7.5	<i>Western Blot</i>	12
2.7.6	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	12
2.7.7	Amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP).....	13
2.8	Tratamento.....	13
2.9	Relação entre cães e humanos	14
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	15
3.1	Hipótese.....	15
3.2	Objetivo Geral	15
3.3	Objetivos Específicos.....	15
4	CAPÍTULOS	16

4.1	Materiais e Métodos.....	16
4.1.1	Seleção de alvos proteicos por bioinformática	16
4.1.2	Produção das proteínas recombinantes	16
4.1.3	Banco de soros caninos	19
4.1.4	Protocolo para ELISA indireto	19
4.1.5	Análise estatística.....	22
4.1.5.1	Sensibilidade, especificidade e curva ROC (Característica de operação do receptor)	22
4.1.5.2	Coeficiente de concordância Kappa.....	22
4.1.5.3	Teste T de Welch	22
4.2	Resultados	23
4.2.1	Produção das proteínas recombinantes	23
4.2.2	Segunda série de ELISA/ <i>checkerboards</i> de soros caninos	24
4.2.3	Análise individual dos soros caninos	27
4.2.4	Análise estatística.....	27
4.2.4.1	Sensibilidade, especificidade e curva ROC.....	27
4.2.4.2	Coeficiente de concordância Kappa.....	28
4.2.4.3	Teste T de Welch	29
5	DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	30
6	CONCLUSÃO GERAL	33
7	ANEXOS.....	34
	ANEXO A – Primeira série de <i>checkerboards</i> com <i>pools</i> de soros caninos	34
	A1 Primeira série de ELISA/ <i>checkerboards</i> de soros caninos.....	35
	ANEXO B – Artigo publicado	53
9	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma doença negligenciada e a zoonose mais difundida mundialmente. É uma doença sistêmica caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e problemas reprodutivos afetando, também, a produção animal (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). É causada por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. São microrganismos finos, helicoidais e móveis. São didermes, que possuem um envelope celular similar ao de bactérias Gram negativas, no qual a membrana interna e a camada de peptidoglicano são associadas e sobrepostas por uma membrana externa que contém proteínas expostas na superfície e lipopolissacarídeos (LPS) (Haake and Matsunaga, 2010, Ko et al., 2009).

A infecção em humanos ocorre através de contato direto com a urina de animais infectados ou indireto, por água ou solo contaminados (Mwachui et al., 2015, Picardeau, 2017). *Leptospiras* patogênicas colonizam os túbulos renais de hospedeiros reservatórios e são excretadas na urina para o ambiente externo, onde podem sobreviver em água por vários meses (Andre-Fontaine et al., 2015, Trueba et al., 2004). A profilaxia é difícil devido a múltiplos fatores, incluindo o alto número de hospedeiros assintomáticos que transmitem a bactéria, saneamento básico precário, enchentes, favelas e a falta de uma vacina efetiva (Grassmann et al., 2017b).

O diagnóstico é necessário tanto para confirmação da doença, como para estabelecimento da situação da zoonose em rebanhos e obtenção de dados epidemiológicos (Adler, 2015a). No entanto, o diagnóstico clínico da leptospirose é difícil, devido à sua similaridade com outras doenças hemorrágicas (Haake and Levett, 2015). Por causa da falta de um diagnóstico eficiente, o número de casos de leptospirose deve ser muito maior que o documentado. Levando em conta a potencial severidade da doença e a dificuldade de distingui-la de outras enfermidades, é necessário ser desenvolvido e adotado um diagnóstico laboratorial mais preciso e rápido, especialmente para evitar o uso desnecessário de antibióticos (Levett, 2003) e evitar a disseminação da bactéria.

Os diagnósticos laboratoriais são divididos em dois grupos: o primeiro consiste em testes para a demonstração de leptospiras, como visualização direta dos organismos por microscopia de campo escuro, cultivo, métodos de detecção de ácido

desoxirribonucleico (DNA) e coloração. O segundo contém os testes de detecção de anticorpos. A escolha do teste a ser feito depende do propósito e dos recursos disponíveis (Adler, 2015a). Os métodos de detecção de anticorpos são os mais utilizados e consistem em análises sorológicas. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o teste sorológico padrão e possui a vantagem de permitir a diferenciação de sorogrupos (Pinto et al., 2017). Porém, para essa análise são necessárias duas amostras do mesmo indivíduo, coletadas em períodos diferentes, além da necessidade de execução por um profissional capacitado, pois a sua interpretação pode ser subjetiva; e sua sensibilidade depende do estágio da infecção no indivíduo (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010, Adler, 2015a). O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) baseia-se na utilização de um antígeno, podendo ser de célula inteira ou determinadas moléculas, com a finalidade de detectar imunoglobulinas M ou G (IgM ou IgG) em amostras biológicas (McBride et al., 2007). Entretanto, ambos os testes possuem limitações e não suprem todos os critérios de um teste ideal (Goris et al., 2013).

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, apresentar resultado rápido e ser viável financeiramente (Dey et al., 2007, Picardeau et al., 2014, Niloofa et al., 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leptospirose

A leptospirose é a zoonose com maior morbidade e mortalidade distribuída mundialmente (Kumar et al., 2019). Estima-se que anualmente ocorram mais de um milhão de casos e aproximadamente 60.000 mortes em âmbito global (Costa et al., 2015). Está presente principalmente em países tropicais subdesenvolvidos e regiões rurais (Bharti et al., 2003). A doença, considerada bifásica, inicia com uma fase aguda que, na maioria dos casos, se resolve sem intervenção médica. É, potencialmente, seguida por colonização crônica dos rins pelas bactérias, dependendo da virulência da cepa infectante, da severidade da fase aguda, e da resposta imune do hospedeiro (Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Esta zoonose pode afetar a maioria dos mamíferos (Bharti et al., 2003). Alguns roedores, como os ratos, são considerados resistentes. Estes são, então, chamados de reservatórios e são os principais disseminadores de leptospiros e seus transmissores diretos, ou indiretos, devido ao fato de que as carregam cronicamente nos rins e as excretam no ambiente (Ratet et al., 2014). Humanos são considerados hospedeiros acidentais e não possuem papel importante na transmissão da doença (Bharti et al., 2003, Ghazaei, 2018). *Leptospira* spp. penetram o hospedeiro através de mucosas ou abrasões na pele. A infecção ocorre através da forma indireta, por contato com solo ou água contaminados, ou direta, por contato com urina de animais infectados (Thibeaux et al., 2018).

Inicialmente, a ocorrência da leptospirose estava relacionada a atividades ocupacionais como em trabalhadores de minas, frigoríficos e rede de esgoto, agricultores e veterinários. Em países em desenvolvimento, está relacionada à pobreza e ao saneamento básico precário, o que aumenta a população de roedores, constantes enchentes, e dificuldade de acesso a serviços de saúde pública. Em países desenvolvidos, está associada principalmente a atividades como esportes aquáticos e turismo (Bharti et al., 2003, Ghazaei, 2018, Grassmann et al., 2017b). As taxas de incidência da doença são subestimadas, devido à falta de conhecimento da população e a dificuldade de acesso e inexistência de testes diagnósticos rápidos e eficientes (Bharti et al., 2003). Por causa da falta de diagnóstico e formas de prevenção eficazes, se torna ainda mais difícil o controle e o seu correto tratamento (Kumar et al., 2019).

2.2 Agente etiológico

Espécies patogênicas do gênero *Leptospira* foram descritas há mais de 100 anos como o agente causador da leptospirose (Inada et al., 1916). Pertencem ao filo Spirochaetes e são bactérias espiraladas, longas, finas e móveis (Picardeau, 2017). Possuem aproximadamente 0,1 µm de diâmetro, e um comprimento que varia de 6 – 20 µm (Canale-Parola, 1978). São bactérias didermes, com um envelope semelhante ao de bactérias Gram negativas (Picardeau, 2017). Sua estrutura é composta por duas membranas, uma interna e uma externa, e uma camada de peptidoglicano (Picardeau, 2017). Na membrana externa está presente o LPS, o antígeno imunodominante de leptospiros (Felix et al., 2019), e abundantes proteínas expostas na superfície (OMPs) (Picardeau, 2017, Haake and Matsunaga, 2010). Espiroquetas são altamente móveis, devido à presença de dois flagelos (Goldstein and Charon, 1988). Estes são localizados no espaço periplasmático, ancorados na membrana interna e se estendem em direção ao centro da célula (Bharti et al., 2003). A proteína mais abundante nos flagelos de *Leptospira* spp. é a *Flagellar-coiling protein A* (FcpA), que confere a ela seu formato espiralado e está conservada entre diferentes espécies da bactéria (Wunder et al., 2016).

O gênero *Leptospira* é dividido em mais de 60 espécies, que são subdivididas em mais de 350 sorovares (Picardeau, 2017, Karpagam and Ganesh, 2020), sendo estas patogênicas, intermediárias ou saprófitas. As intermediárias possuem um ancestral em comum com as patogênicas e possuem patogenicidade moderada em animais e humanos, e as saprófitas são de vida livre, isoladas do ambiente, e não causam doença (Vincent et al., 2019). O material genético das leptospiros consiste de dois cromossomos circulares (Bharti et al., 2003). Genomas de diferentes sorovares, incluindo diferentes espécies, já foram sequenciados e contribuem para melhor entendimento da evolução e da diversidade do gênero *Leptospira*, além de serem úteis para pesquisas com vacinologia reversa e estrutural (Picardeau, 2017, Grassmann et al., 2017b).

Leptospiros são observadas por microscopia de campo escuro (Adler, 2015a). São cultivadas, principalmente, em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), com temperatura de crescimento ótima entre 28 – 30 °C (Bharti et al., 2003, Ellinghausen and McCullough, 1965).

2.2.1 A membrana externa de *Leptospira* spp.

A membrana externa é a principal estrutura de leptospiros que interage com o ambiente externo. As lipoproteínas são importantes componentes desta, e estão intimamente associadas à sua bicamada lipídica, porém, muitas ainda continuam sem a sua função conhecida (Haake and Zuckert, 2015). Dentre as proteínas de superfície de leptospiros mais estudadas, estão as *leptospiral immunoglobulin-like* (Lig), como a LigA, LigB (que está presente em todas as espécies patogênicas de *Leptospira*) e LigC, as quais podem estar envolvidas na adesão da bactéria a componentes extracelulares, atuam na inibição do sistema complemento, e estão presentes somente em espécies patogênicas (Picardeau, 2017, Grassmann et al., 2017b, Matsunaga et al., 2003). A LipL32 é outro foco importante relacionado a pesquisas em leptospirose. É a proteína imunodominante, possuindo 38.000 cópias por célula (Malmstrom et al., 2009). Existe uma discordância em relação à sua exata posição na membrana celular, porém, a maioria dos relatos indicam sua localização como na subsuperfície (face interna da membrana externa) (Pinne and Haake, 2013). Esta lipoproteína é um enigma na biologia de leptospiros (Murray, 2013) pois, mesmo com sua abundante quantidade na célula, sua presença não é essencial para a virulência (Murray et al., 2009), sua exata função ainda não é conhecida, e seu nocaute não causa perda de viabilidade para a bactéria (Grassmann et al., 2017b).

Proteínas transmembrana são de grande interesse em pesquisas de vacinologia e diagnóstico pois possuem porções expostas na superfície, as quais são importantes alvos para a geração de uma resposta imune protetora (Haake and Zuckert, 2015). Muitas dessas proteínas são barril- β , que são como cilindros e agem como receptores e poros para transporte de moléculas (Haake and Zuckert, 2015, Pinne and Haake, 2009). HbpA, FadL, GspD, FecA, OmpL1, BamA, TolC e OmpA são alguns exemplos de proteínas transmembrana (Haake and Zuckert, 2015, Haake and Matsunaga, 2010).

Diferente de outras espiroquetas, a membrana externa de leptospiros é rica em LPS (Cullen et al., 2005). Sua estrutura é semelhante à de bactérias Gram negativas, mas com diversas características únicas, que possibilitam diferentes composições (Haake and Zuckert, 2015). Esta grande variação da estrutura e composição do LPS, principalmente do lipídeo A, e as diferentes reatividades

imunológicas que estes geram resultam nos mais de 350 sorovares de *Leptospira* spp. conhecidos atualmente (Haake and Zuckert, 2015, Picardeau, 2017, Karpagam and Ganesh, 2020).

2.3 Prevenção e controle

Estima-se que a leptospirose cause uma infecção severa em mais de um milhão de pessoas ao redor do mundo anualmente (Costa et al., 2015), o que poderia ser combatido por uma imunização efetiva (Grassmann et al., 2017b). Entretanto, apesar dessa teórica possibilidade, desde o descobrimento da bacterina há mais de 100 anos nenhum avanço significativo em relação à vacinologia contra leptospirose foi feito (Grassmann et al., 2017b, Adler, 2015b). Vacinas de bacterina ainda são as únicas disponíveis comercialmente para uso veterinário, em geral, ou uso em humanos em situações especiais em alguns países (Adler, 2015a). Sua proteção está limitada aos sorovares presentes em sua formulação, e não gera imunidade de memória, resultando em proteção apenas a curto prazo (Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Sua produção é de alto custo e complicada repetibilidade (Bashiru and Bahaman, 2018). A grande diversidade genética dentro do gênero *Leptospira* é um impedimento para o desenvolvimento de uma vacina capaz de gerar proteção cruzada entre diferentes espécies ou sorovares (Grassmann et al., 2017b).

Formas atenuadas de *Leptospira* spp. mostraram induzir proteção cruzada entre diferentes sorovares (Murray et al., 2010). Entretanto, o uso de leptospirosas vivas, mesmo atenuadas, são consideradas menos seguras, não sendo a abordagem ideal para prevenção da doença (Vernel-Pauillac and Werts, 2018, Felix et al., 2019). Para contornar os problemas da bacterina, os estudos atuais têm se focado em vacinas recombinantes (principalmente empregando proteínas de superfície), as quais se mostram mais promissoras e seguras do que a de cepas inativadas ou atenuadas (Bashiru and Bahaman, 2018, Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Entre as mais estudadas, estão as proteínas *leptospiral immunoglobulin-like* (Lig), como LigA e LigB, que apresentam alta taxa de proteção e resultados reproduzíveis (Adler, 2015b). Recentemente, foi descrita uma formulação vacinal utilizando uma região conservada da LigB, chamada de LigBrep, que gerou entre 80 – 90% de proteção no modelo animal usado, e conferiu imunidade esterilizante (Conrad et al., 2017).

A vacinologia reversa (VR) é uma análise que, por ferramentas de bioinformática, pode prever a localização de todas as proteínas codificadas no genoma e, assim, descobrir novos potenciais alvos vacinais (Rappuoli, 2000). A vacinologia estrutural (VE) é uma combinação de biologia estrutural, imunologia e bioinformática que visa identificar alvos vacinais através das informações das estruturas dos antígenos (Grassmann et al., 2017a). Os alvos buscados são geralmente proteínas expostas na superfície da célula, como barris- β e lipoproteínas, as quais são reconhecidas pela resposta imune do hospedeiro e atuam na patogênese, o que, em teoria, pode aumentar a eficácia da vacina (Grassmann et al., 2017a).

Atualmente ainda não existe uma vacina que confira uma proteção cruzada e impeça a colonização renal e consequente disseminação da bactéria (Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Com isso, a profilaxia da leptospirose depende de mudanças na infraestrutura das cidades como, principalmente, a melhoria do saneamento básico. Como os países mais afetados são subdesenvolvidos, existe uma maior dificuldade de contornar e resolver esse problema (Bharti et al., 2003).

2.4 Patogênese e fatores de virulência

A gravidade da doença depende tanto do patógeno quanto do hospedeiro. Os patógenos expressam e utilizam diferentes fatores de virulência para, com sucesso, infectar o indivíduo e causar a patogênese (Picardeau, 2017). A invasão, disseminação e colonização pelo microrganismo são mediadas pela expressão diferencial de diversos fatores de virulência (Vk et al., 2018).

As bactérias penetram o hospedeiro através de abrasões na pele ou por membranas mucosas após contato com água, solo ou urina contaminados (Picardeau, 2017). Proteínas de superfície e LPS são os principais fatores de virulência que interagem com tecidos do hospedeiro (Rossini et al., 2019). O conhecimento sobre a patogênese da leptospirose ainda é limitado (Bharti et al., 2003). Entretanto, imagina-se que a aderência aos tecidos do hospedeiro seja um fator importante para estabelecer o início da infecção (Rossini et al., 2019). As proteínas responsáveis por isso são chamadas de adesinas e podem se aderir a diferentes células ou seus componentes como a matriz extracelular, plasminogênio, fibrinogênio, dentre outros. Depois de ser feita a adesão, é desencadeada uma atividade proteolítica para que a

bactéria possa ultrapassar as barreiras físicas iniciais do indivíduo (Rossini et al., 2019). Estudos já demonstraram que as leptospiros produzem moléculas tóxicas que afetam a integridade da membrana celular do hospedeiro (Karpagam and Ganesh, 2020). Após penetrarem o indivíduo, as leptospiros se disseminam rapidamente pela corrente sanguínea (Picardeau, 2017) e, com isso, alcançam os órgãos de interesse, principalmente os rins. Elas se aderem aos túbulos renais, o qual é um ambiente imunoprivilegiado e ótimo para se multiplicarem e se propagarem, já que serão eliminadas com a urina para o ambiente (Haake and Matsunaga, 2010).

Com isso, a motilidade é um importante fator de virulência, pois possui papel essencial na infecção e disseminação pelo organismo do hospedeiro (Bharti et al., 2003). A estrutura flagelar de leptospiros é complexa e é dividida em três subestruturas: um corpo basal, um gancho flexível e um filamento (Picardeau, 2017). As proteínas que constituem o flagelo são conservadas entre *Leptospira* spp. (Fouts et al., 2016). A FcpA é a proteína flagelar mais importante e abundante e está diretamente relacionada ao formato espiral da bactéria e à sua capacidade de locomoção e consequente infecção (Wunder et al., 2016).

Tanto na doença aguda como na crônica, as leptospiros são capazes de evadir o sistema imune (Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Leptospiros patogênicos podem induzir apoptose em macrófagos (Toma et al., 2011) e resistir a espécies reativas de oxigênio produzidas pelos fagócitos (Picardeau, 2017). Podem, também, recrutar reguladores do sistema complemento para prevenir sua formação e ativação (Fraga et al., 2011) e secretar proteases que degradam componentes desse sistema (Fraga et al., 2014). Espécies patogênicas de *Leptospira* são, então, capazes de manipular o sistema complemento interferindo, assim, na resposta imune inata do hospedeiro (Picardeau, 2017).

2.5 Resposta do hospedeiro

A defesa inicial do hospedeiro é feita por barreiras como a pele, muco e saliva (Asoh et al., 2014). Experimentos mostraram que a fagocitose de leptospiros só é efetiva quando a bactéria for opsonizada por um anticorpo IgG específico. Estas imunoglobulinas podem, também, causar a aglutinação dos patógenos e ativar a via clássica do sistema complemento (Fraga et al., 2011). O sistema imune do hospedeiro é ativado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem

padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como LPS, lipoproteínas, peptidoglicano e proteínas flagelares (Zuerner, 2015). Durante a infecção, o LPS possui papel importante para ativar a resposta imune inata, sendo reconhecido por *Toll-like receptors* tipo 2 e 4 (TLR2 e 4), resultando em uma resposta pró-inflamatória dependente de citocinas e quimiocinas (Bashiru and Bahaman, 2018, Fraga et al., 2011). O sistema imune humano é incapaz de detectar o LPS de leptospiros por meio do TLR4, o qual é um importante componente para o reconhecimento do LPS de bactérias Gram negativas. Ao invés disso, o LPS dessas bactérias requer CD4 e TLR2 para gerar a sinalização celular necessária na resposta imunológica (Werts et al., 2001). Esta incapacidade do TLR4 humano em reconhecer o LPS de leptospiros pode ser um dos motivos de os seres humanos serem hospedeiros acidentais, nos quais a doença pode ser grave e até letal (Haake and Zuckert, 2015).

2.6 Sinais e sintomas

O período de incubação para a leptospirose é tipicamente de sete a 14 dias, porém, os sintomas podem se desenvolver a partir do segundo dia ou, até mesmo, a partir de um mês de exposição (Waggoner and Pinsky, 2016). Em humanos, a infecção pode se manifestar de diversas formas, que variam na gravidade. Os sintomas podem se assemelhar à gripe, apresentando febre e dor de cabeça, bem como calafrios, enjoo, dor muscular intensa, icterícia, meningite, falência renal, hemorragia pulmonar e até causar a morte do indivíduo caso não seja tratada a tempo (Werts et al., 2001, Ghazaei, 2018). Em cães, a leptospirose pode, também, se manifestar de forma não específica, dependendo da gravidade, com sinais de vasculite, lesões nos rins e fígado, hemorragia pulmonar, febre, calafrios, icterícia, problemas reprodutivos, diarreia sanguinolenta, vômitos, letargia, uveíte e miosite (Reagan and Sykes, 2019, Murphy, 2018).

Tipicamente a doença se apresenta de forma aguda com febre, o que a torna, nesse aspecto, indistinguível de outras doenças febris que também são comuns em ambientes tropicais como dengue, malária, febre amarela, influenza e Zika (Waggoner and Pinsky, 2016). Devido a esta semelhança clínica com outras enfermidades, o real fardo da leptospirose é subestimado mundialmente (Kumar et al., 2019).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Cultura da bactéria

O cultivo de *Leptospira* spp. requer um meio de cultura próprio, o EMJH. Seu isolamento pode ser feito através de fluidos ou de tecidos, como sangue, urina e rins, inoculando-os no devido meio para cada caso (Adler, 2015a). A contaminação de culturas provenientes de isolamento é bastante frequente. Para controlá-la, adiciona-se um coquetel de antibióticos ao meio, como 5-fluorouracil, sulfato de neomicina, rifampicina e vancomicina (Ellis and Michno, 1976). As culturas são mantidas a 28 – 30 °C e avaliadas periodicamente por várias semanas para sua manutenção, através de sua visualização por microscopia de campo escuro (Adler, 2015a).

Este método possui uma série de desvantagens como baixa sensibilidade, longo tempo de cultura, manutenção fastidiosa, alto custo, e a necessidade de um profissional altamente capacitado para mantê-la viável e em ótimas condições (Smythe et al., 2009, Wuthiekanun et al., 2007).

2.7.2 Teste de aglutinação microscópica (MAT)

O MAT é o método sorológico mais utilizado para diagnóstico da leptospirose e, principalmente, para diferenciação de sorogrupos em dados epidemiológicos (Levett, 2003, Bharti et al., 2003). Para sua realização são necessárias duas amostras de soro do mesmo paciente em diferentes estágios da doença. Essas amostras são incubadas com uma bateria de culturas de diferentes sorogrupos de *Leptospira* spp., os quais possuem importância naquela determinada região (Vernel-Pauillac and Werts, 2018). A análise dos resultados é feita por visualização em microscopia de campo escuro, onde um profissional irá avaliar o grau de aglutinação que ocorreu no teste, e qual o título de anticorpos. Por ser um teste de demorada execução, não possibilita um diagnóstico precoce da doença e, com isso, atrasa o início do tratamento, diminuindo as chances de um prognóstico favorável (Murphy, 2018).

Neste teste, é comum ocorrer reações cruzadas, não sendo ideal para a diferenciação de sorovares (Smythe et al., 2009, Levett, 2003), e a interpretação dos resultados, por ser muito subjetiva, varia bastante entre diferentes laboratórios (Bharti et al., 2003). Além disso, o MAT também pode resultar em falso-negativos na fase inicial da doença (Niloofa et al., 2015). Resultados positivos podem refletir uma vacinação prévia (Murphy, 2018). Para estes casos, é necessário ser aplicado um teste mais sensível, como a PCR (Vernel-Pauillac and Werts, 2018, Wilson et al., 2015).

2.7.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA)

O ELISA é um teste sorológico que se baseia nas ligações antígeno-anticorpo, capaz de quantificar as moléculas presentes na amostra através de uma reação enzimática colorimétrica. O ELISA indireto é uma de suas variações e permite detectar e medir a concentração de anticorpos IgG ou IgM contidos no soro do paciente (Aydin, 2015) e, com isso, pode ser aplicado para o diagnóstico da leptospirose aguda (Niloofa et al., 2015). Anticorpos IgM podem ser detectados a partir do quarto ou quinto dia após o início dos sintomas, antes do aparecimento de IgG, e permanecer circulantes por pelo menos cinco meses nos indivíduos (Silva et al., 1995). ELISA-IgM pode ser superior ao MAT para detectar a doença na sua fase inicial (Niloofa et al., 2015).

Alguns estudos já mostraram que o ELISA-IgM possui alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de leptospirose humana (Desakorn et al., 2012, Ooteman et al., 2006). Foram relatados, também, diversos protocolos de ELISA com diferentes antígenos para diagnóstico de leptospirose canina, como: proteínas totais extraídas da membrana externa (91.5% de sensibilidade e 58.1% de especificidade) (Sathiyamoorthy et al., 2017); *L. fainei*, uma espécie intermediária, que detectou a leptospirose aguda (95.6% de sensibilidade e 93% de especificidade) (Penna et al., 2017); e proteínas recombinantes como LipL32 (97% de sensibilidade e especificidade) (Dey et al., 2004) e OmpL1 (100% de sensibilidade e 94.2% de especificidade) (Subathra et al., 2013). Porém, mesmo com o grande número de protocolos diferentes desenvolvidos, estes, muitas vezes, não são reproduzíveis (Desakorn et al., 2012).

O ELISA-IgM foi recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o teste a ser utilizado para diagnóstico de leptospirose em lugares com limitação de recursos, mesmo com sua acurácia sendo variável (Desakorn et al., 2012). Testes de ELISA se tornam viáveis como análises confirmatórias, especialmente em áreas endêmicas e que possuem laboratórios com disponibilidade limitada de outros testes, como o MAT ou PCR (Rosa et al., 2017, Niloofa et al., 2015). ELISAs podem ser executados com o mínimo de treinamento e equipamentos limitados e gerar resultados em duas a quatro horas (Rosa et al., 2017). Possui aplicação fácil e rápida,

pode detectar anticorpos IgM e IgG, e é mais sensível que o MAT (Mousavi et al., 2017).

2.7.4 Testes rápidos

Testes de cromatografia de fluxo lateral (LFA) são facilmente executados, sem a necessidade de um profissional altamente treinado e equipamentos laboratoriais, e apresenta rápido resultado (Lizer et al., 2017). Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos testes rápidos para a detecção de anticorpos IgM e/ou IgG contra leptospiros tanto para amostras humanas quanto caninas (Lizer et al., 2017, Lilenbaum et al., 2002, Abdoel et al., 2011, Subathra et al., 2011, Gloor et al., 2017), como um LFA-IgM (WITNESS Lepto, Zoetis), que foi capaz de detectar a doença na sua fase inicial em cães (Kodjo et al., 2016); e uma plataforma de via dupla (*Dual path platform* – DPP – Chembio Diagnostic Systems) que utilizou Ligs como antígenos e que apresentou 93% de sensibilidade e 80% de especificidade utilizando sangue humano (Nabity et al., 2018).

Embora estes testes ainda não tenham substituído o uso do MAT, eles são rápidos, convenientes e fáceis de serem executados. Com isso, oferecem a vantagem de gerar resultados antes da disponibilidade de uso de MAT e qPCR (Panwala et al., 2015) e podem detectar a doença quando o resultado do MAT for negativo (Troia et al., 2018).

2.7.5 Western Blot

A técnica de *Western blot* detecta a presença e a ligação de anticorpos aos seus antígenos e pode ser usada em combinação com outros testes, a fim de confirmar o caso da doença (Toma et al., 2018). Como antígeno, podem ser usadas proteínas, como LipL32 e HbpA, ou lisados da própria bactéria (Chaurasia et al., 2018).

2.7.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O diagnóstico por PCR pode ser realizado utilizando diversas amostras (sangue, urina, tecidos, humor aquoso, líquido cefalorraquidiano) preferencialmente antes do início do uso de antibióticos, e a vacinação prévia não interfere no resultado (Murphy, 2018, Mousavi et al., 2017, Waggoner and Pinsky, 2016). Métodos de PCR são eficazes para detectar a doença no seu estágio inicial, antes do desenvolvimento

de uma resposta humoral contra a infecção, diferenciar entre espécies e amplificar o alvo quando há pouca quantidade de DNA disponível (Miotto et al., 2018, Mousavi et al., 2017, Reagan and Sykes, 2019).

Diferentes protocolos de PCR já foram desenvolvidos para detecção do DNA de leptospiros. Dentre os alvos mais comumente utilizados para amplificação estão os genes codificantes para o rRNA 16S, LipL21, LipL32 e LipL41 (Mousavi et al., 2017). Uma variação bastante aplicada deste método é o PCR em tempo real quantitativo (qPCR), o qual é sensível, capaz de diferenciar entre espécies patogênicas e não patogênicas e hábil para medir a carga bacteriana da amostra, as quais podem ser clínicas ou ambientais. Para isso, alguns dos genes-alvo são: *secY*, LipL32 ou *Ligs* (Bharti et al., 2003, Mousavi et al., 2017).

Embora a PCR seja um método útil para diagnóstico de leptospirose aguda, requer profissionais capacitados, não difere entre organismos vivos e mortos e raramente está disponível em áreas remotas e países subdesenvolvidos (Lizer et al., 2017, Mousavi et al., 2017). Além disso, substâncias inibitórias presentes nos fluidos biológicos e uma baixa carga bacteriana podem impedir a amplificação, gerando falso-negativos (Lantz et al., 2000).

2.7.7 Amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP)

A amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) consiste em um método de rápida amplificação do DNA. Sua principal vantagem é a possibilidade de amplificar o DNA em condições isotérmicas com alta especificidade, eficiência e velocidade, sendo necessária pouca infraestrutura laboratorial (Waggoner and Pinsky, 2016). Um estudo descreveu um protocolo de LAMP que amplifica genes do ribossomo 16S de leptospiros, o qual apresentou 100% de sensibilidade e especificidade analítica (Sonthayanon et al., 2011). Ensaio direcionados aos genes *lipL32* e *lipL41* também se mostraram promissores (Chen et al., 2015, Nurul Najian et al., 2016). Entretanto, a experiência clínica utilizando os métodos de LAMP desenvolvidos ainda é limitada (Waggoner and Pinsky, 2016).

2.8 Tratamento

A leptospirose é eficientemente combatida por antibióticos, desde que sejam usados na fase inicial da doença (Ratet et al., 2014). Os tratamentos mais comumente

utilizados são penicilina, na fase aguda, e estreptomicina, quando já houver colonização renal (Martins and Lilenbaum, 2017). Em cães, recomenda-se o uso de doxiciclina e penicilina (quando há sinais gastrintestinais) (Murphy, 2018). Em alguns casos, se aplica o uso profilático de antibióticos para a prevenção da doença em soldados, atletas e viajantes (Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Como abordagem adicional, faz-se o uso de fluidos intravenosos e tratamento dos sintomas (Murphy, 2018).

2.9 Relação entre cães e humanos

Cães são potenciais indicadores de áreas endêmicas para leptospirose e, embora pouco frequente, a transmissão desta zoonose de cães para seres humanos pode ocorrer (White et al., 2017). Diversos estudos mostram o nível de prevalência da leptospirose em cães, que pode variar desde 1,8% na Austrália até 71,1% na Índia (López et al., 2019). Os principais sorovares infectantes nesses animais são Canicola e Icterohaemorrhagiae, que também pode infectar humanos (Ellis, 2010, Schuller et al., 2015).

Cães de ambiente urbano e sexo masculino são os mais afetados (López et al., 2019). Estes podem ser carreadores assintomáticos e, com isso, disseminar leptospirosas pela urina. Como a leptospirose é uma zoonose, donos de cães são um grupo de risco pela exposição a estes animais, podendo estar sujeitos a uma consequente infecção (Murphy, 2015, López et al., 2019). Médicos veterinários possuem alto risco de exposição ao patógeno devido ao contato direto com animais potencialmente infectados, portanto devem manipular apropriadamente os pacientes (Murphy, 2018).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A hipótese deste trabalho é que construções quiméricas contendo apenas porções expostas de proteínas de superfície podem ser alvos mais promissores para diagnóstico do que proteínas recombinantes inteiras.

3.2 Objetivo Geral

Desenvolver um teste de ELISA indireto para identificar novos alvos de diagnóstico contra leptospirose.

3.3 Objetivos Específicos

- Produzir oito proteínas recombinantes, estando, entre estas, uma quimera com epítomos expostos de duas proteínas e, cinco quimeras com porções expostas de uma proteína cada;
- Desenvolver os testes de ELISA indireto utilizando como antígeno as oito proteínas recombinantes com um painel de soro canino.

4 CAPÍTULOS

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Seleção de alvos proteicos por bioinformática

Previamente a este trabalho, através de vacinologia reversa e estrutural, nosso grupo de pesquisa descobriu novos potenciais alvos para vacina e diagnóstico. Foram identificadas 18 proteínas barril- β transmembrana e oito lipoproteínas, todas conservadas em 20 diferentes espécies de *Leptospira* (Grassmann et al., 2017a). Dentre essas, três foram utilizadas neste trabalho: CSIP08, CSIP10 e, para construção de uma quimera com a CSIP08, a CSIP06. As outras cinco proteínas aqui empregadas, OmpL115, OmpL125, OmpL68, OmpL72 e OmpL94, estão citadas no material suplementar deste mesmo estudo (Grassmann et al., 2017a). Todas as oito originalmente possuem estrutura de barril- β transmembrana.

4.1.2 Produção das proteínas recombinantes

Uma construção quimérica contendo as sequências genômicas para as porções expostas das proteínas CSIP08 e CSIP06 (Figura 1 e Tabela 1) foi clonada comercialmente (sem repetições de aminoácidos, finalizada com *stop codon* TAA em um plasmídeo pAE 6 $\times$ His) e utilizada para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star.

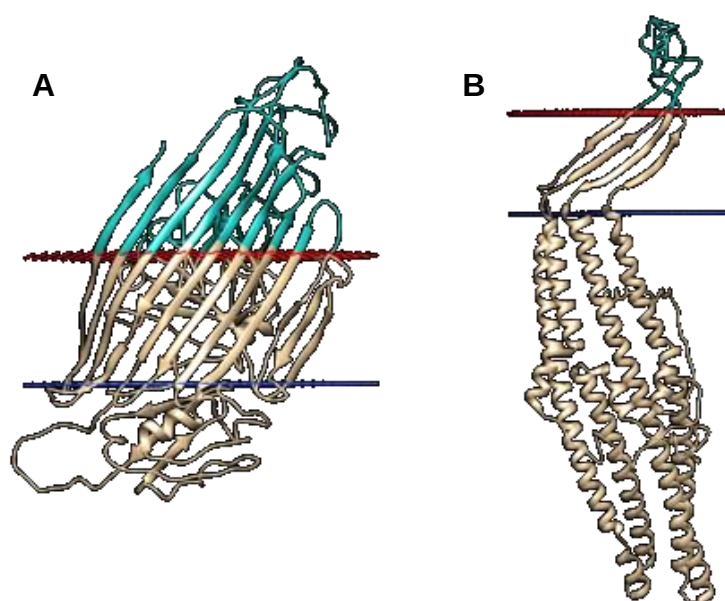


Figura 1. Esquema tridimensional das proteínas. **(A)** CSIP08; **(B)** CSIP06. O disco vermelho representa a membrana externa da bactéria e, o azul, a membrana interna. As porções em verde turquesa indicam os epítomos escolhidos para serem utilizados na quimera.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos das porções expostas escolhidos para constituírem a quimera.

Proteína	Aminoácidos constituídos na quimera
CSIP08	SPMYQMYTGASFQKPDKNGEKGFLVMRGAGARANQSYPFHADGLTSVGFA
	TGAETFLADYKDKRYPFKELSQYNPKETAQSFANPPSDADAARLDRIYFNEVT
	ENGLDMLVLDITKIGYPPSLYKRVQTIQNEYFREVD TGYKGKVSQIDLDPTYNFI
	HQQLNSSDVKSVLEGDSVRTRQIEYYDKSRE
CSIP10	NQNVNSADNIYNNNGNNNQFTHDSYGVNFNLV MPLGSSVVQSNGNTGVQKDG
	NGIQTYPGFGNQTVGPG

E. coli BL21 (DE3) Star foi utilizada para transformação com o plasmídeo pAE (6×His) recombinante contendo as sequências codificantes dos epítomos das proteínas CSIP06 e CSIP08 (quimera), ou com as sequências codificantes das proteínas CSIP08 ou CSIP10 (cedidas por colaboradores). As transformações foram feitas através de choque térmico conforme descrito a seguir: em um tubo foram adicionados 100 µl de CaCl₂, uma colônia isolada de *E. coli* Star (crescida por 16 h) a 37 °C em placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) e ágar (LB sólido) e 1 µl do plasmídeo pAE recombinante de interesse. O tubo foi mantido no gelo por 15 min, transferido para banho-maria a 42 °C por 1 min, e colocado no gelo por 2 min. Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação de 180 rotações por minuto (rpm) por 1 h. Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 8000 × g por 2 min, em temperatura ambiente (TA). 1 ml do sobrenadante foi descartado, e o pellet foi homogeneizado nos 100 µl restantes de meio e adicionado em uma placa de Petri contendo meio LB sólido acrescido de 100 µg/ml de ampicilina.

Em ambiente estéril, após assepsia, uma alça de Drigalski foi usada para expandir o cultivo na placa de Petri com movimentos circulares até a secagem total do líquido. A placa foi incubada por 16 h a 37 °C. Após o crescimento, uma colônia isolada deste cultivo transformado foi inoculada em 25 ml de meio LB acrescido de

100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo foi incubado a 37 °C por 16 h sob agitação de 180 rpm e, no próximo dia, foi vertido em um frasco erlenmeyer de 2 l contendo 500 ml de LB (100 µg/ml de ampicilina). Tal inóculo foi usado para expressão das proteínas de interesse, incubado a 37 °C sob agitação de 180 rpm até atingir a densidade ótica (DO) de 0,6 – 0,8 sob o comprimento de onda de 600 nm. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida pela adição de 500 µl de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) 1 M. A expressão continuou por mais 3 – 4 h quando o cultivo foi, então, centrifugado a 8000 × g por 10 min (4 °C) e o *pellet* resultante foi mantido a -20 °C até a próxima etapa. O *pellet* foi ressuspenso em 30 ml de *wash* com ureia (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 8 M ureia, pH 7.4), e foi realizada a lise das bactérias por sonicação através do seguinte protocolo: 30 s de sonicação, 10 s de pausa (processo repetido por mais 2 vezes). Agitação do tubo. 30 s de sonicação, 10 s de pausa (repetido mais 1 vez), 1 min de sonicação. Após isso, foi adicionado 30 µl de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). O tubo foi centrifugado a 12000 × g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante resultante da etapa anterior contendo a proteína de interesse foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando coluna HisTrap FF de 1 ml (GE *Healthcare*), no sistema automatizado ÄKTA Start (GE *Healthcare*) para sua purificação. As frações de proteínas purificadas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%. Depois da purificação, foi feita a diálise contra tampão fosfato-salino (PBS) (2 l) e gradiente de ureia (iniciando em 5 M), com seis trocas de 1 l, uma a cada 30 min, utilizando a membrana *SnakeSkin Dialysis Tubing* (Thermo Fisher Scientific). Em caso de precipitação da proteína, a mesma foi solubilizada em 0,2% de N-lauroylsarcosina e foi feita a diálise em PBS com 0,15% inicial de N-lauroylsarcosina.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce BCA *Protein Assay kit*, Thermo Fisher Scientific). As proteínas foram, então, analisadas por SDS-PAGE e caracterizadas por *Western blot*, a partir do seguinte protocolo: Cada proteína foi diluída em 1:5 no tampão de amostra (SDS com 5% de β-mercaptoetanol 5 x) e foi acrescentada ao poço do gel de poliacrilamida a 12% e a separação das amostras foi feita sob tensão de 100 V. Após a corrida das amostras no gel, estas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad *Laboratories*) por 3 h ou por 15 – 30 min utilizando *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad *Laboratories*). Esta membrana foi bloqueada por 1 h com

albumina sérica bovina (BSA) a 1%, diluída em PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T), em TA e sob agitação. Em seguida, foi incubada por 16 h, a 4 °C, com o anticorpo policlonal de rato específico para cada proteína, diluído a 1:1000 em PBS-T. Depois, foi incubada com anticorpo monoclonal anti-IgG de rato conjugado à enzima *Horseradish* peroxidase (HRP) (Jackson *ImmunoResearch*) sob as mesmas condições anteriores. Quando todas as proteínas foram analisadas em conjunto na mesma reação, foi utilizado o anticorpo anti-histidina conjugado à HRP. Entre cada incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T. A revelação da reação foi feita por quimiluminescência, utilizando *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo *Fisher Scientific*) e posterior leitura com *C-DiGit Blot Scanner* (LI-COR) e análise pelo software *Image Studio* (LI-COR), conforme instruções dos fabricantes, e/ou pela adição de solução reveladora com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). As proteínas foram separadas em alíquotas de 1 ml e mantidas a -20 °C até o uso.

De forma semelhante, posteriormente, foram incluídas e produzidas cinco proteínas quiméricas com epítomos expostos das proteínas OmpL115, OmpL125, OmpL68, OmpL72 e OmpL94 (plasmídeos cedidos por colaboradores).

4.1.3 Banco de soros caninos

O banco de soros caninos utilizados neste trabalho é composto por soros positivos e negativos para leptospirose caracterizados previamente pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas (LPDI) através da técnica de MAT. Estes soros são provenientes de projetos de vigilância ocorridos na cidade de Salvador/Bahia (BA). Os soros de Salvador foram cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-BA) em colaboração com o Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Salvador.

Para a padronização do protocolo de ELISA, um *pool* de 10 soros positivos e um *pool* de 10 soros negativos foram utilizados através da configuração de *checkerboard*. Após a padronização, cada soro foi analisado individualmente.

4.1.4 Protocolo para ELISA indireto

Placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato NUNC *Polysorp* (Thermo *Fisher Scientific*) foram sensibilizadas por 16 h a 4 °C, com quatro diferentes concentrações de antígenos por poço (25, 50, 100 ou 150 ng), diluídos em tampão

carbonato-bicarbonato (pH 9.6). Em seguida, para evitar reações inespecíficas, foi feito o bloqueio das placas com BSA 1%, diluído em PBS-T, por 1 h a 37 °C. Os soros foram diluídos a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em PBS-T e avaliados em duplicatas, utilizando 50 µl/poço. Depois, foram adicionados 50 µl/poço de anticorpo anti-IgM (ELISA-IgM) ou anti-IgG (ELISA-IgG) caninos, conjugados à HRP, diluídos em PBS-T a 1:2000, 1:4000, 1:6000 e 1:10000.

A revelação foi executada pela adição de tampão citrato-fosfato (pH 4), substrato O-fenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As placas foram mantidas em TA ao abrigo da luz por 20 min. As reações foram paradas pela adição de 25 µl de H₂SO₄ (2 M) por poço. As formações de cor resultantes foram lidas a 492 nm utilizando leitora de placas de ELISA. Entre cada etapa, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (200 µl/poço). Para controle positivo das reações, foi utilizado como anticorpo primário o soro policlonal de rato específico contra a proteína e, como controle negativo, soro de rato não inoculado (diferentes diluições). Como anticorpo secundário para os controles foi utilizado anticorpo monoclonal anti-IgG de rato conjugado à HRP (Jackson *Immunoresearch*) (diferentes diluições). Os soros foram sempre diluídos em PBS-T. Para avaliar o *background* de cada ensaio, foi montado o poço “branco”, onde foi adicionado o reagente de cada etapa, exceto o anticorpo primário, e este valor foi subtraído de cada poço. Para a primeira série de análises por *checkerboards*, foi utilizado o esquema de placa descrito na tabela 2 (os resultados referentes a esta primeira série estão descritos e discutidos no anexo A)

Tabela 2. Representação do esquema das placas da primeira série de *checkerboards*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A ^{1,8}	C+ ⁵	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
B ^{2, 8}	C+ ⁵	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
C ^{3, 8}	C- ⁶	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
D ^{4, 8}	C- ⁶	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
E ^{1, 9}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
F ^{2, 9}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
G ^{3, 9}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
H ^{4, 9}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	B ⁷

A cada duas colunas, uma diluição diferente do soro primário (em duplicata).

¹ 1:2000 do conjugado;

² 1:3000 do conjugado;

³ 1:4000 do conjugado;

⁴ 1:6000 do conjugado;

⁵ Controle positivo

⁶ Controle negativo

⁷ "Branco"

⁸ Foram usados os *pools* das amostras positivas;

⁹ Foram usados os *pools* das amostras negativas.

572

573 Após interpretação dos resultados gerados nessas primeiras análises, as
574 diluições do anticorpo secundário foram alteradas para 1:2000, 1:3000, 1:4000 e
575 1:6000. Foi, também, adicionado um poço "branco" para cada diluição desse anticorpo
576 secundário. Com isso, iniciou-se a segunda série de *checkerboards* e as placas foram
577 organizadas conforme detalhado na tabela 3.

578 **Tabela 3.** Organização das placas na segunda série de *checkerboards*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A^{1,11}	C ⁺ ⁵	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
B^{2, 11}	C ⁺ ⁵	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
C^{3, 11}	C ⁻ ⁶	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
D^{4, 11}	C ⁻ ⁶	1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	
E^{1, 12}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	B ⁷
F^{2, 12}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	B ⁸
G^{3, 12}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	B ⁹
H^{4, 12}		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	B ¹⁰

A cada duas colunas, uma diluição diferente do soro primário (em duplicata).

¹ 1:2000 do conjugado;

² 1:3000 do conjugado;

³ 1:4000 do conjugado;

⁴ 1:6000 do conjugado;

⁵ Controle positivo

⁶ Controle negativo

⁷ "Branco" utilizando a diluição de 1:2000;

⁸ "Branco" com 1:3000 do conjugado;

⁹ "Branco" com 1:4000 do conjugado;

¹⁰ "Branco" com 1:6000 do conjugado;

¹¹ Foram usados os *pools* das amostras positivas;

¹² Foram usados os *pools* das amostras negativas.

579

Os gráficos com a compilação das leituras de absorbâncias foram criados utilizando o *software GraphPad Prism 7.00* (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

4.1.5 Análise estatística

4.1.5.1 Sensibilidade, especificidade e curva ROC (Característica de operação do receptor)

A sensibilidade de um teste é sua capacidade de identificar corretamente as amostras verdadeiramente positivas. Por outro lado, a especificidade é a capacidade de identificar corretamente as amostras verdadeiramente negativas.

A curva ROC é usada para mostrar, em formato de gráfico, a correlação entre a sensibilidade e a especificidade para cada valor de *cut-off* possível do teste em questão. Estes valores foram calculados através do *software GraphPad Prism 7.00*, utilizando os parâmetros contidos para “ROC curve” (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

4.1.5.2 Coeficiente de concordância Kappa

O coeficiente de concordância de Kappa descreve a concordância entre diferentes observadores ou métodos (no caso, testes diagnósticos) ao realizarem a avaliação de uma mesma amostra. Seu valor pode variar de 0 até 1. Quanto mais próximo de 1, maior é o indicativo de que existe uma concordância entre os testes e, quanto mais próximo de 0, maior é o indicativo de que a concordância é aleatória.

Os cálculos foram feitos no *software Online Kappa Calculator* (Justus Randolph, disponível em <http://justus.randolph.name/kappa>).

4.1.5.3 Teste T de Welch

O teste T de Welch avalia a significância entre a diferença das médias obtidas. Este cálculo foi feito através do *software GraphPad Prism 7.00*, utilizando os dados contidos para “Welch’s T test” (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

4.2 Resultados

4.2.1 Produção das proteínas recombinantes

As proteínas foram produzidas e quantificadas com sucesso conforme descrito anteriormente, gerando concentrações satisfatórias. A figura 2 mostra a caracterização destas por SDS-PAGE (A) e *Western blot* (B) utilizando anticorpo anti-histidina. Os valores resultantes da quantificação das proteínas estão apresentados na tabela 4.

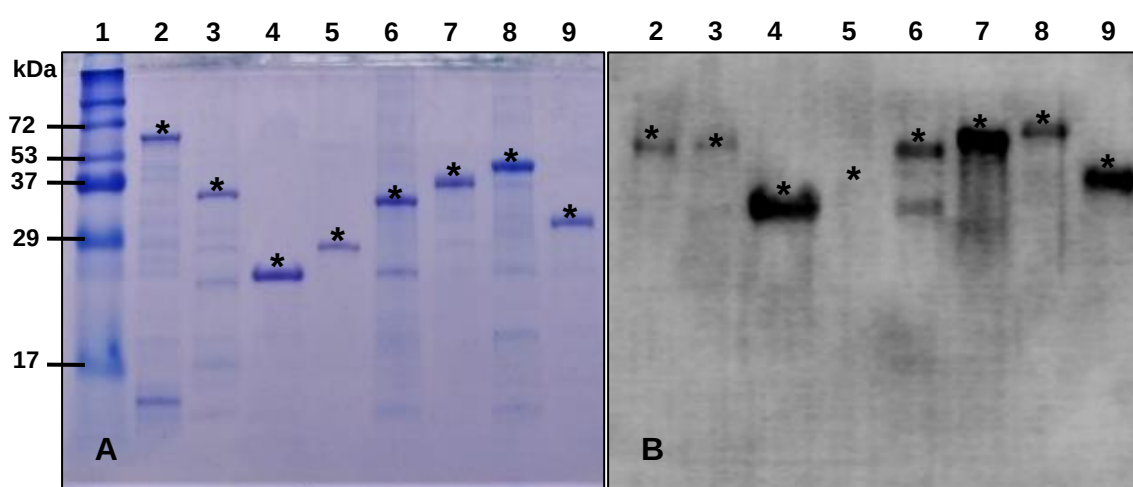


Figura 2. (A) Caracterização por SDS-PAGE das proteínas recombinantes produzidas. **(B)** *Western blot* das mesmas amostras. **1:** Marcador de peso molecular de proteínas pré-corado (Scienco *Biotech*); **2:** CSIP08 (61,9 kDa); **3:** CSIP10 (36,7 kDa); **4:** OmpL115 (22,4 kDa); **5:** OmpL125 (28,3 kDa); **6:** OmpL68 (36,7 kDa); **7:** OmpL72 (39,6 kDa); **8:** OmpL94 (44,6 kDa); **9:** Quimera (29,6 kDa). Os asteriscos indicam a banda correspondente à proteína de cada poço.

Tabela 4. Concentração das proteínas recombinantes.

rProteína	Concentração (ng/μl)
CSIP08	970,0
CSIP10	410,0
Quimera	360,2
OmpL115	2247,4
OmpL125	89,9
OmpL72	390,2
OmpL68	555,1

OmpL94

702,5

Foram executados WBs para avaliar se as proteínas produzidas seriam diferencialmente reconhecidas por soros positivos e negativos de hamsters. Na figura 3, foram utilizados *pools* positivos e, na figura 4, *pools* negativos.

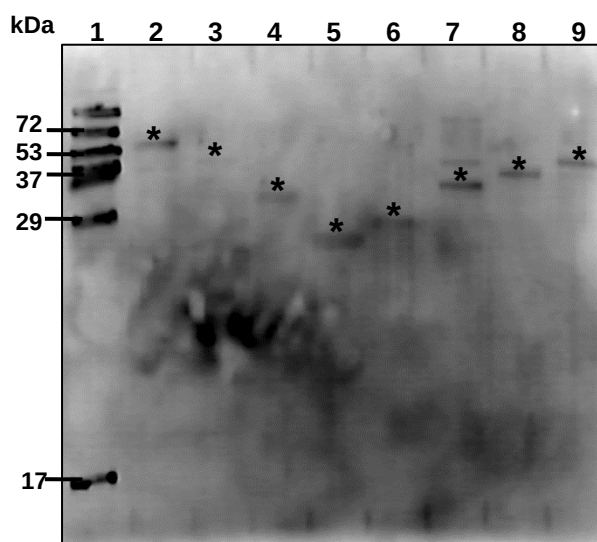


Figura 3. Capacidade de reconhecimento dos soros positivos no WB. **1:** Marcador de peso molecular de proteínas pré-corado (Scienco Biotech); **2:** CSIP08 (61,9 kDa); **3:** CSIP10 (36,7 kDa); **4:** Quimera (29,6 kDa); **5:** OmpL115 (22,4 kDa); **6:** OmpL125 (28,3 kDa); **7:** OmpL68 (36,7 kDa); **8:** OmpL72 (39,6 kDa); **9:** OmpL94 (44,6 kDa). Os asteriscos indicam a banda correspondente à proteína de cada proteína.

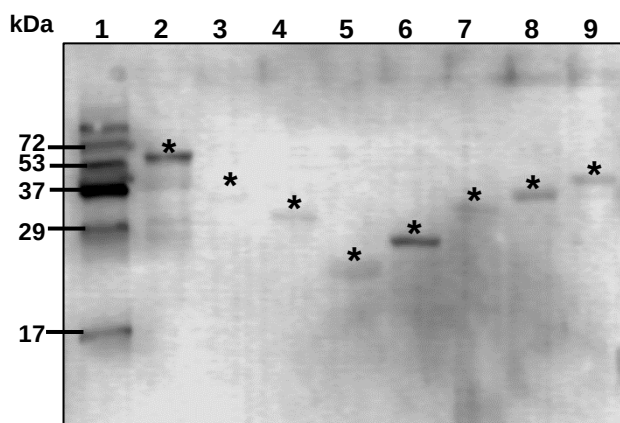


Figura 4. Capacidade de reconhecimento dos soros negativos no WB. **1:** Marcador de peso molecular de proteínas pré-corado (Scienco Biotech); **2:** CSIP08 (61,9 kDa); **3:** CSIP10 (36,7 kDa); **4:** Quimera (29,6 kDa); **5:** OmpL115 (22,4 kDa); **6:** OmpL125 (28,3 kDa); **7:** OmpL68 (36,7 kDa); **8:** OmpL72 (39,6 kDa); **9:** OmpL94 (44,6 kDa). Os asteriscos indicam a banda correspondente à proteína de cada proteína.

4.2.2 Segunda série de ELISA/checkerboards de soros caninos

Após correção da classificação e escolha de novos dos soros caninos, tendo como base resultados preliminares de ELISA e MAT (feitos por colaboradores), foi executada a segunda série de análises *checkerboards* baseados na tabela 3. Os melhores resultados destas análises estão demonstrados nas figuras 5 e 6.

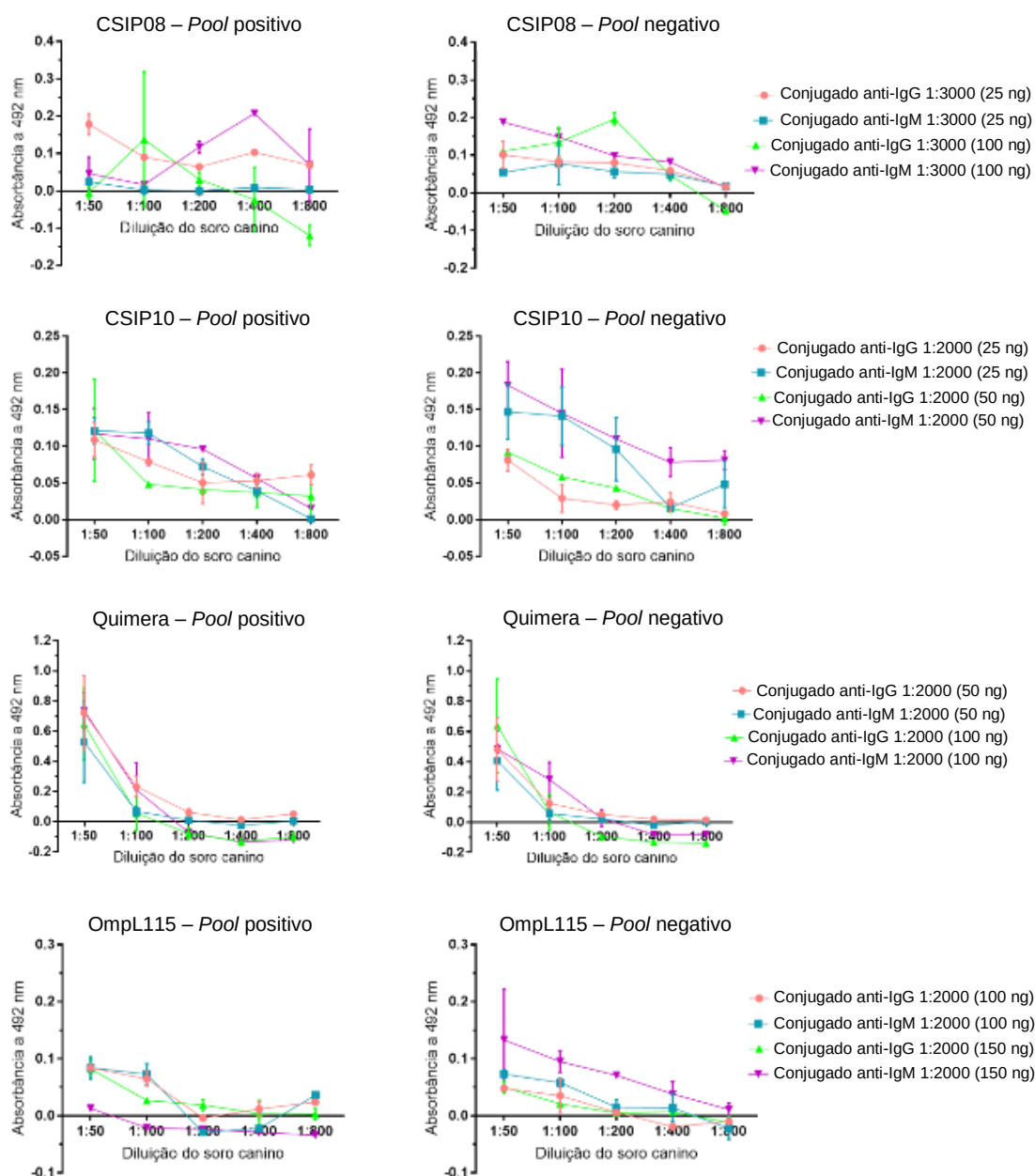


Figura 5. Melhores valores de absorbância obtidos na segunda série de *checkerboards* das proteínas CSIP08, CSIP10, Quimera e OmpL115.

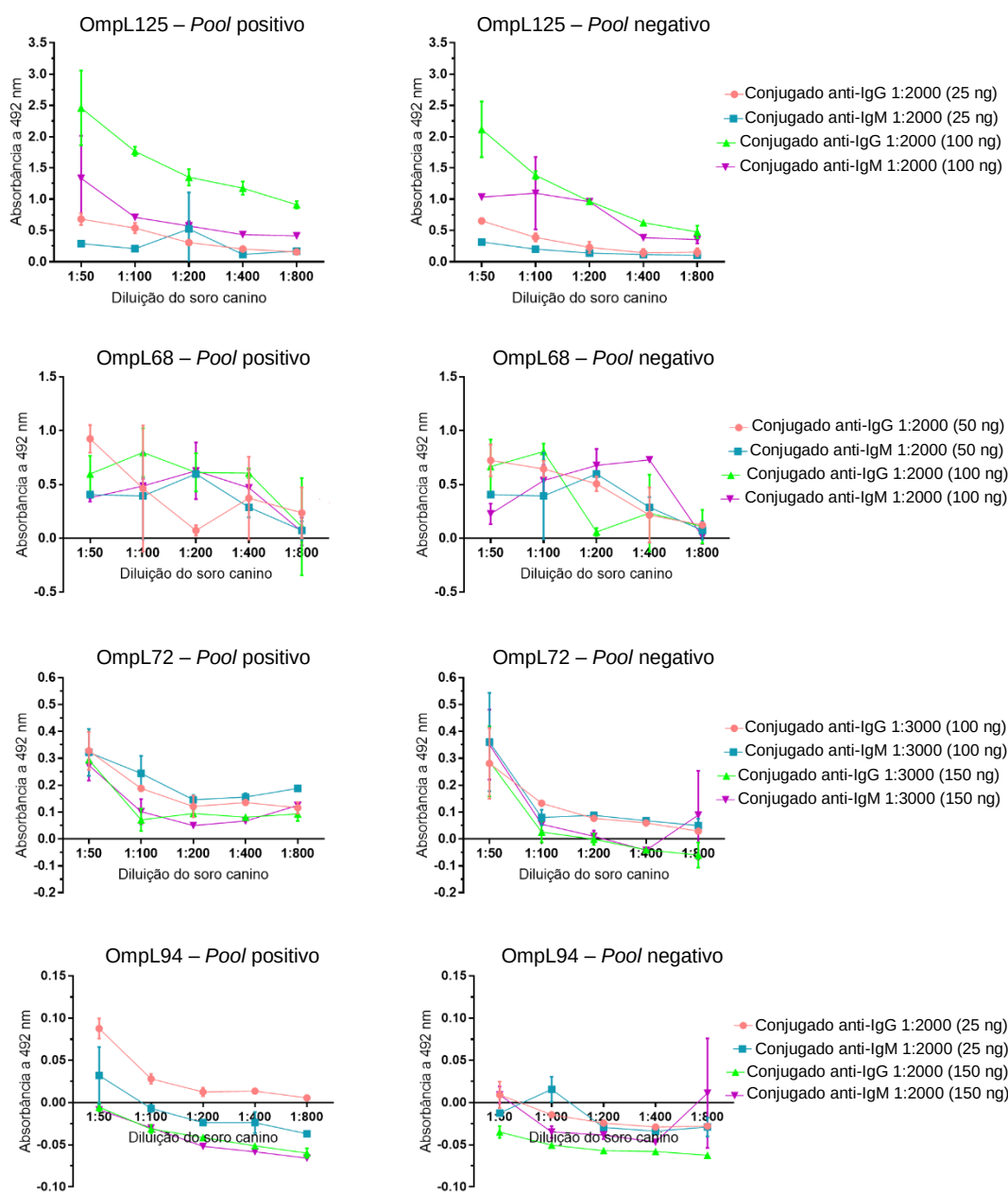


Figura 6. Melhores valores de absorbância obtidos na segunda série de *checkerboards* das proteínas OmpL125, OmpL68, OmpL72 e OmpL94.

A proteína que se mostrou mais promissora foi a OmpL125. Portanto, para os ensaios seguintes, as placas foram sensibilizadas com 100 ng desta proteína por poço. Foram adotadas diluições de 1:400, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 e 1:6000 para os soros caninos, e diluições de 1:1000 e 1:2000 para o anticorpo secundário (conjugado) (Figura 7).

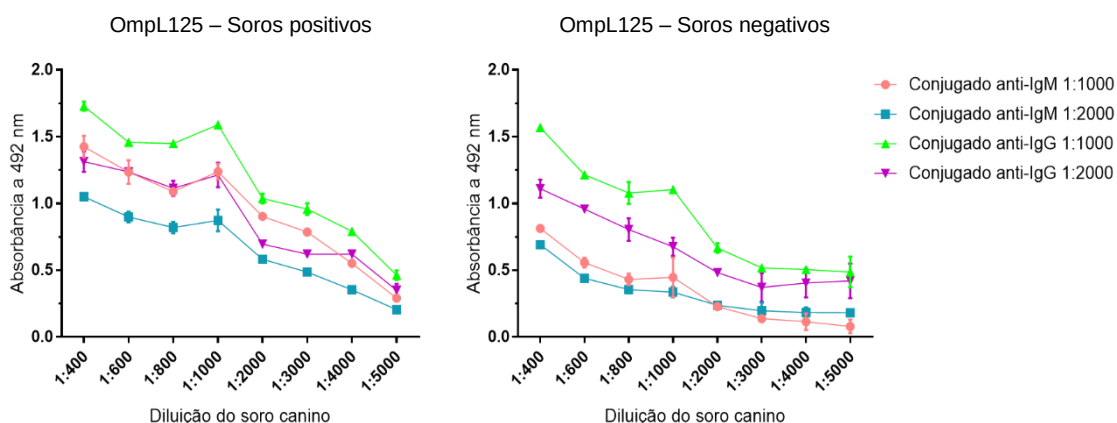


Figura 7. Valores de absorvância obtidos após a adaptação do protocolo para a proteína OmpL125.

4.2.3 Análise individual dos soros caninos

A análise individual dos soros foi feita utilizando a 100 ng da proteína OmpL125 por poço na placa. A diluição dos soros caninos adotada foi de 1:3000 e do anticorpo secundário (conjugado) de 1:1000 (Figura 8). Foram analisados 22 soros positivos e 23 soros negativos.

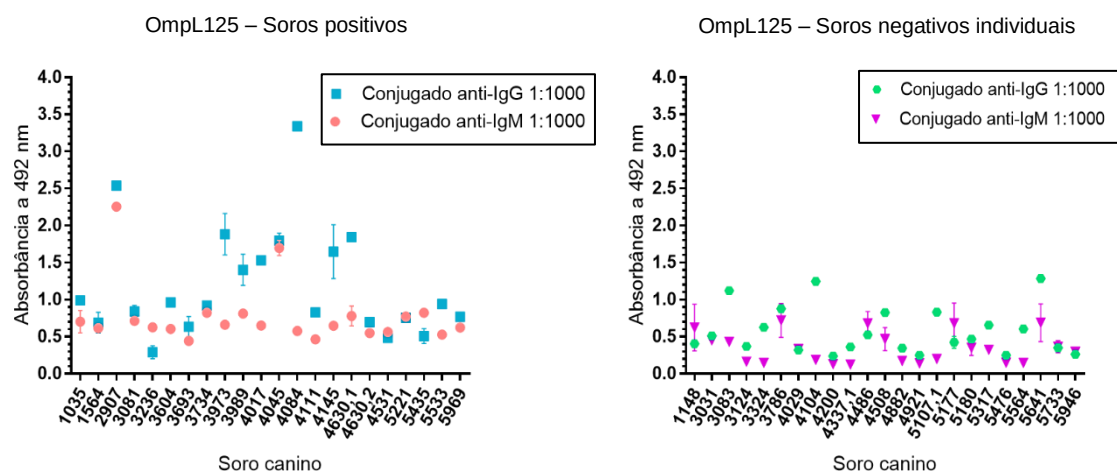


Figura 8. Valores de absorvância alcançados com os soros individuais e proteína OmpL125.

4.2.4 Análise estatística

4.2.4.1 Sensibilidade, especificidade e curva ROC

Os valores de sensibilidade e especificidade da curva ROC foram calculados utilizando os dados das análises individuais dos soros empregando a proteína OmpL125 (Figuras 9 e 10).

Para o ELISA-IgM, ao selecionar o *cut-off* de 0.498, obtém-se uma sensibilidade de 90,9% e uma especificidade de 78,2%. Para o ELISA-IgG, com *cut-off* de 0.6745, obtém-se 81,8% de sensibilidade e 73,9% de especificidade.

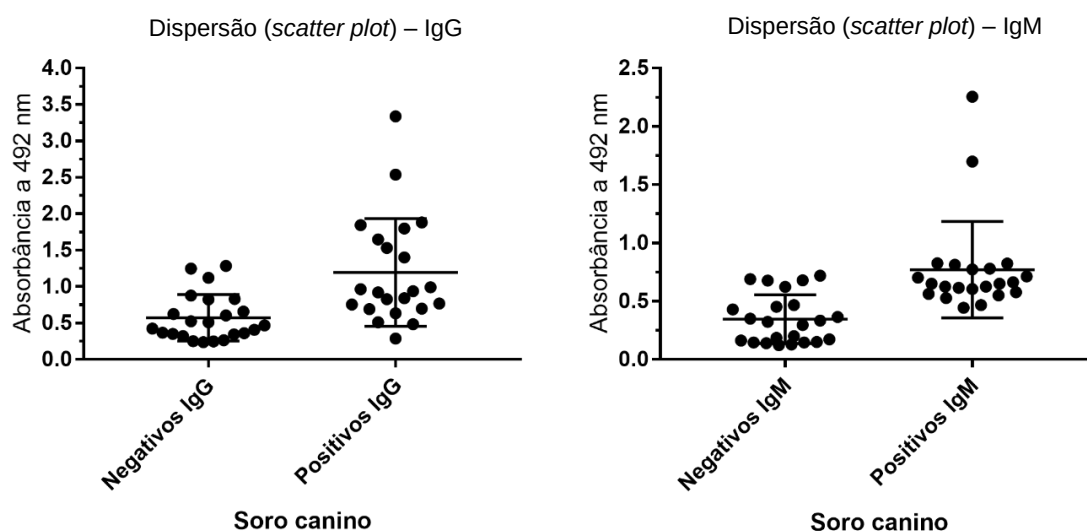


Figura 9. Distribuição espacial comparando os valores positivos e negativos obtidos com os soros caninos.

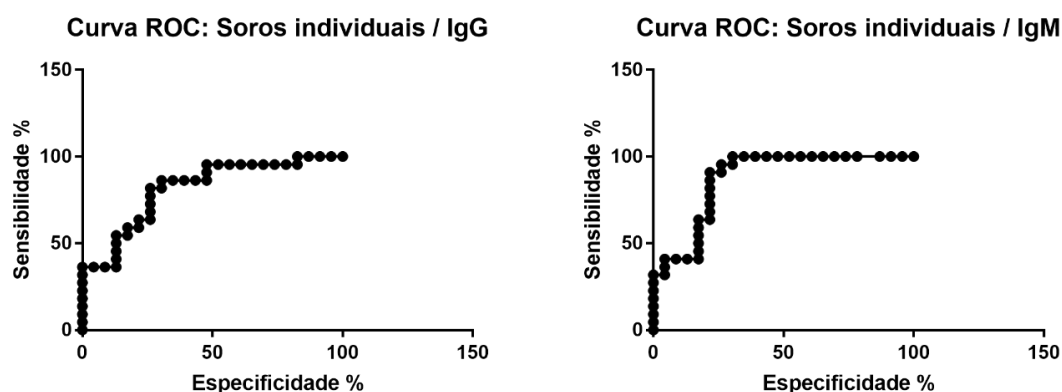


Figura 10. Comparação entre os dados obtidos de sensibilidade e especificidade com a curva ROC.

4.2.4.2 Coeficiente de concordância Kappa

Para gerar o coeficiente de concordância Kappa, foram cruzados os dados gerados neste trabalho com a padronização por MAT feita previamente por colaboradores utilizando os valores de *cut-off* de 0.498 para ELISA-IgM e 0.6745 para ELISA-IgG. O valor do coeficiente pode variar entre 0 (maior indicativo de que a

concordância é aleatória) e 1 (maior indicativo de que existe concordância entre os testes).

Com relação aos soros positivos, no ELISA-IgM, a porcentagem de concordância foi de 90.9% e o coeficiente Kappa foi de 0.82; e, no ELISA-IgG, a porcentagem de concordância foi de 68.8% e o coeficiente Kappa de 0.38. Com relação aos soros negativos, no ELISA-IgM, a porcentagem de concordância gerada foi de 64.4% e o coeficiente Kappa foi de 0.29; no ELISA-IgG, foi gerado 59.6% de concordância e um coeficiente Kappa de 0.19.

4.2.4.3 Teste T de Welch

A figura 11 mostra a significância entre a diferença das médias adquiridas com soros positivos ou negativos nos testes. No ELISA-IgG obteve-se o valor de $p=0.0221$ e, no ELISA-IgM, obteve-se o valor de $p=0.0011$. Portanto, não há diferença estatística significativa ao comparar os soros negativos com os positivos.

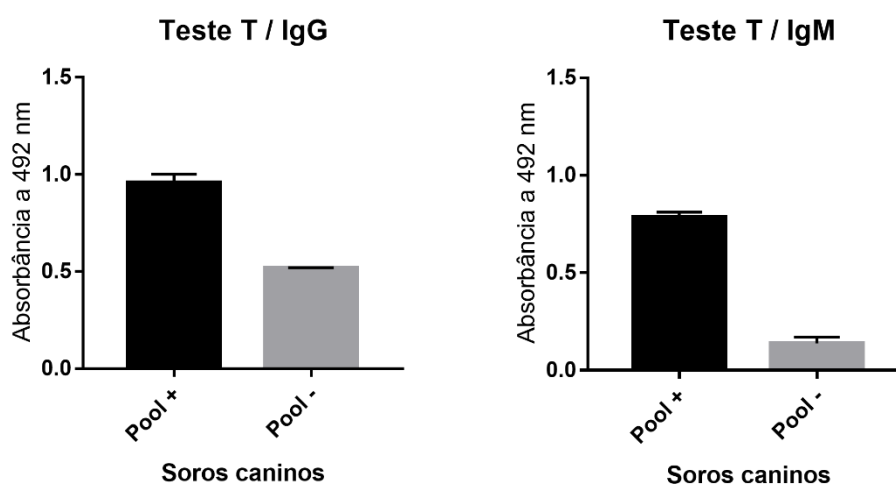


Figura 11. Comparação entre as médias dos valores de absorbância dos soros positivos e negativos através do teste T de Welch

5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

As oito proteínas recombinantes foram clonadas e produzidas com sucesso, gerando quantidades e concentrações de 89,9 – 2247,4 ng/μl. Levando em consideração que todas as proteínas foram expressadas, em média, na mesma quantidade de meio de cultura, o rendimento variou bastante entre elas (Tabela 4). As proteínas purificadas possuíram a massa molecular esperada e foram reconhecidas pelo anticorpo anti-histidina no *Western blot* (Figura 2). Coincidentemente, a proteína que se mostrou mais fastidiosa para expressar (OmpL125), que gerou menos rendimento e menor reconhecimento no *Western blot* foi a que se mostrou mais promissora como antígeno nas posteriores análises por ELISA (Figuras 6 a 11).

Para avaliar se as proteínas recombinantes produzidas seriam reconhecidas por soros positivos e negativos de hamsters, foram executados WBs, nos quais não é possível perceber diferença entre os soros positivos e negativos (Figuras 3 e 4), pois ambos foram positivos para a ligação antígeno-anticorpo. O fato de que os soros negativos de hamsters reconheceram tais proteínas pode indicar presença, nesses animais, de espécies saprófitas de *Leptospira*, as quais podem ter proteínas homólogas às estudadas ou indicar que os anticorpos são pouco específicos. Estas reações positivas com soros negativos para leptospirose também pode ser observada em Dounghawee et al. (2008).

A combinação de epítomos de duas proteínas (proteína químera) não gerou melhores resultados do que as outras abordagens. Os valores de absorbância gerados nos *checkerboards* com as proteínas CSIP08, CSIP10, químera, OmpL115, OmpL68, OmpL72 e OmpL94 se mostraram constantemente baixos, independentemente da quantidade de antígeno utilizada (Figuras 5 e 6), o que resultava em classificações incorretas e falso-negativos. Ao levar em consideração esses resultados, a hipótese deste trabalho se torna não foi comprovada, pois as construções quiméricas contendo apenas porções expostas (no caso, químera, OmpL115, OmpL68, OmpL72 e OmpL94) não mostraram ser alvos mais promissores para diagnóstico sorológico de leptospirose do que proteínas recombinantes inteiras (CSIP08 e CSIP10).

Esses resultados sugerem duas possíveis interpretações: 1 – que há pouca capacidade de reconhecimento entre os anticorpos de um indivíduo que entrou

naturalmente em contato com a bactéria intacta (e todos os seus antígenos) e as proteínas utilizadas; 2 – como o animal doente foi exposto naturalmente às leptospiras íntegras, as quais precisaram atravessar outras barreiras de defesa antes de gerar uma resposta humoral, a variedade de anticorpos produzidos é muito maior (e majoritariamente direcionados ao LPS) do que em um animal experimentalmente inoculado com a proteína de interesse e infectado de uma maneira que não exige que a bactéria enfrente tantas barreiras antes de gerar resposta humoral (sendo os anticorpos, nesse último caso, muito mais específicos). Levar em consideração que, no geral, os controles positivos geravam boas reações e que, nestes controles, foram usados soros policlonais produzidos especificamente contra a devida proteína.

A proteína OmpL125 mostrou maior capacidade de diferenciar indivíduos doentes e saudáveis do que os outros antígenos e parâmetros analisados quanto utilizada nas seguintes condições: 100 ng deste antígeno por poço, soros caninos com diluição de 1:3000 e anticorpo secundário (conjugado) com diluição de 1:1000. Ao analisar os soros individualmente, nota-se a diferença do nível de detecção do ELISA-IgG e do ELISA-IgM (Figura 6). Títulos de IgM > IgG podem indicar que o soro foi coletado na fase aguda.

A curva ROC (Figura 8) mostrou que os valores de sensibilidade e especificidade (para o ELISA-IgM, 90,9 e 78,2%, respectivamente e, para o ELISA-IgG, 81,8 e 73,9%, respectivamente) não são ideais para uso comercial. A análise Kappa mostrou que houve alto grau de concordância nos soros positivos ao comparar o ELISA-IgM com o MAT (90.9%, coeficiente Kappa= 0.82). Este consenso não se repetiu nos outros testes, que tiveram graus menores do que 69% e coeficientes Kappa mais próximos de 0, o que indica alta probabilidade de essas concordâncias terem acontecido aleatoriamente. O teste T de Welch, por outro lado, indicou que a média dos valores positivos ou negativos obtidos nos ELISAs são estatisticamente diferentes (Figura 9), e que essa distinção não ocorreu ao acaso ($p < 0.05$).

Os resultados obtidos neste trabalho não são satisfatórios e não condizem com o raciocínio teórico de que epítomos de proteínas de superfície de *Leptospira* spp. são bons alvos para diagnóstico visto que, por serem expostos no exterior da célula, deveriam ter um grande número de anticorpos produzidos e direcionados contra eles. Mesmo que, em teoria, ELISAs são testes promissores para diagnóstico de

leptospirose, os trabalhos publicados não se mostram reproduzíveis ou não geram valores de especificidade e sensibilidade suficientes para amplo uso comercial (Desakorn et al., 2012). Em adição, sua aplicação dificilmente pode ser padronizada mundialmente visto que o valor ótimo de *cut-off* pode variar em diferentes países e situações (Desakorn et al., 2012).

Abordagens moleculares podem ser melhores opções, dado que os microrganismos podem ser detectados antes do aparecimento de anticorpos, possibilitando um diagnóstico precoce e, mesmo possuindo algumas desvantagens, são uma melhor alternativa ao MAT, que é o “padrão ouro” atual para diagnóstico de leptospirose (Sea-Liang et al., 2019). O LAMP é uma abordagem molecular recentemente descrita que se mostra vantajosa, rápida e econômica em comparação com outros métodos utilizados, como PCR e MAT, podendo ser aplicada mesmo em países subdesenvolvidos e locais com pouca infraestrutura laboratorial (Tubalinal et al., 2018). A combinação de testes que detectam DNA com testes que detectam anticorpos é a abordagem ideal para diagnóstico laboratorial de leptospirose aumentando, assim, as chances da detecção da doença (Mousavi et al., 2017).

835 **6 CONCLUSÃO GERAL**

836 Os testes de ELISA utilizando epítomos de proteínas de superfície de
837 *Leptospira* spp. desenvolvidos neste trabalho não geraram resultados e valores
838 satisfatórios, impossibilitando sua aplicação como diagnóstico laboratorial de
839 leptospirose.

7 ANEXOS

ANEXO A – Primeira série de *checkerboards* com *pools* de soros caninos

Os ensaios de padronização dos ELISAs foram baseados no método *checkerboard* e executados com as oito proteínas (CSIP08, CSIP10, quimera, OmpL115, OmpL125, OmpL68, OmpL72 e OmpL94), com diversas variáveis: quantidades de antígeno, diluições do soro canino primário, diluições do anticorpo secundário e tipo de anticorpo detectado (ELISA-IgG ou IgM) (Figuras 13 a 29).

Os *pools* de soros caninos foram submetidos a *Western blot* para duas finalidades: 1 – avaliar a capacidade de estes soros reconhecerem as proteínas sob este método e 2 – comparar estes resultados com os obtidos por ELISA. Para isso, foram utilizadas as mesmas amostras e controles dos ensaios de ELISA, conforme apresentado na figura 3.

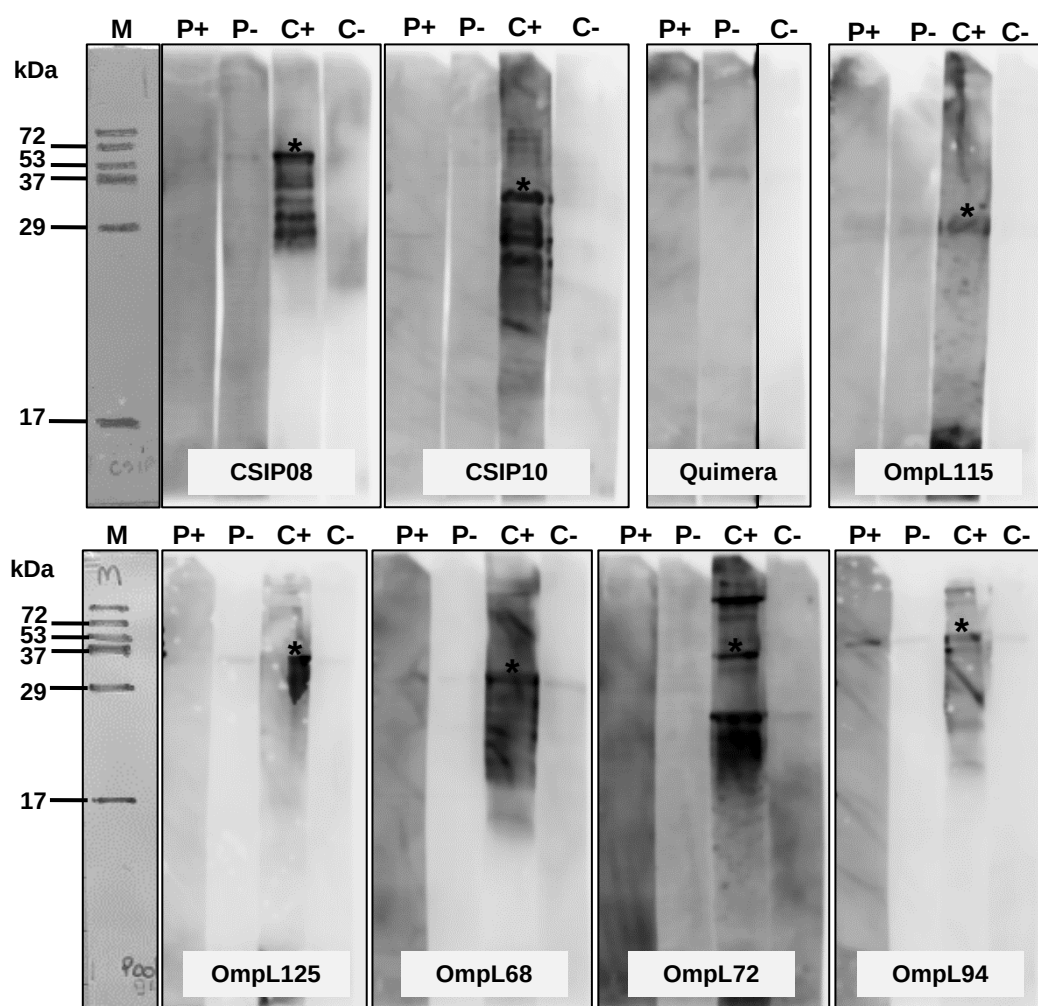
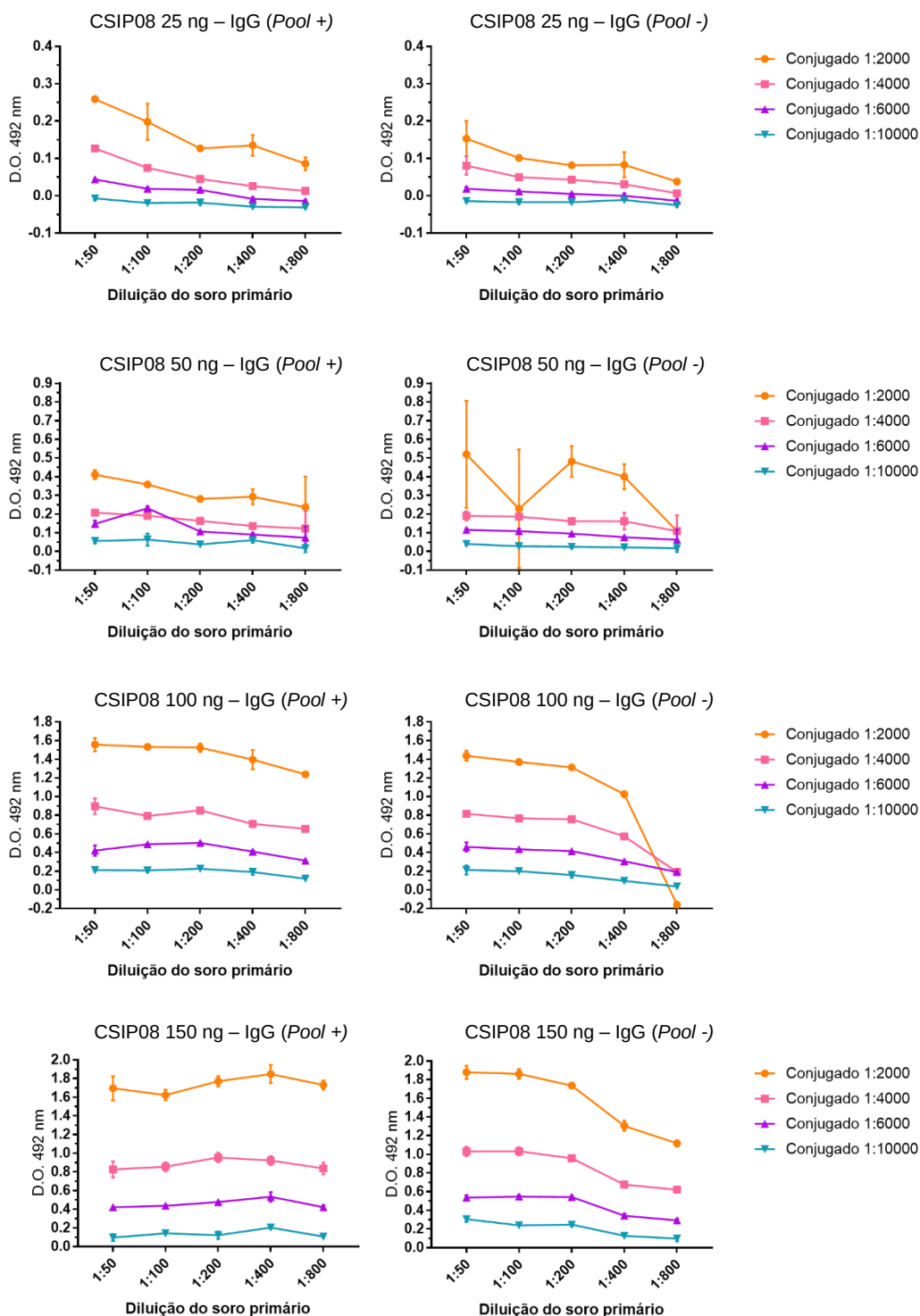


Figura 12. Capacidade de reconhecimentos dos soros por *Western blot*. **M:** Marcador de peso molecular de proteínas pré-corado (Scienco *Biotech*); **P+:** *Pool* positivo; **P-:** *pool* negativo; **C+:** controle positivo; **C-:** controle negativo. Os asteriscos indicam a banda correspondente à proteína de cada poço.

A1 Primeira série de ELISA/checkerboards de soros caninos

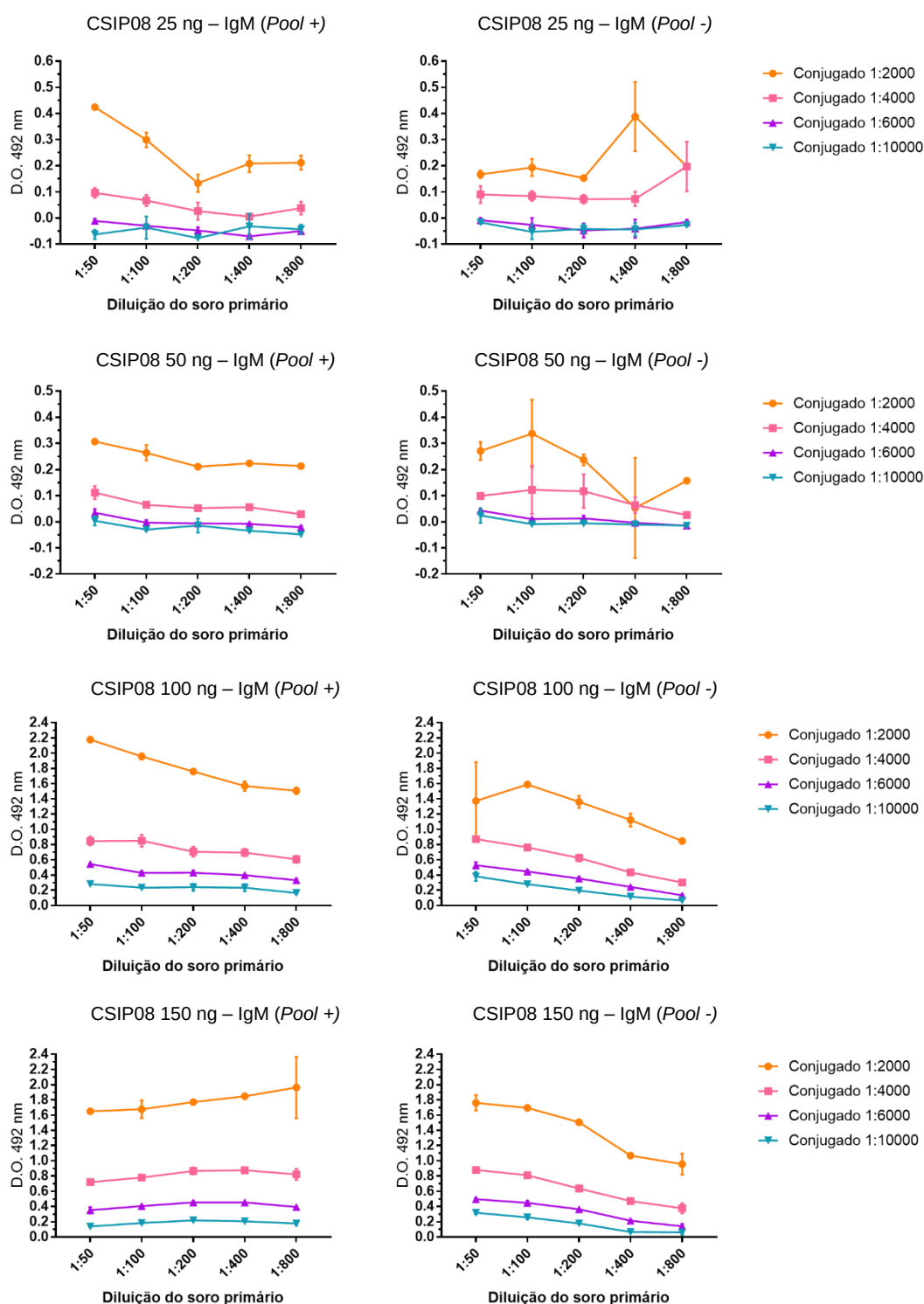
Em setembro de 2019, descobriu-se que os soros caninos utilizados até o momento estavam descritos com dados insuficientes e classificados erroneamente por colaboradores. Por este motivo, os resultados de todas estas análises foram incluídos como anexos deste trabalho.



872

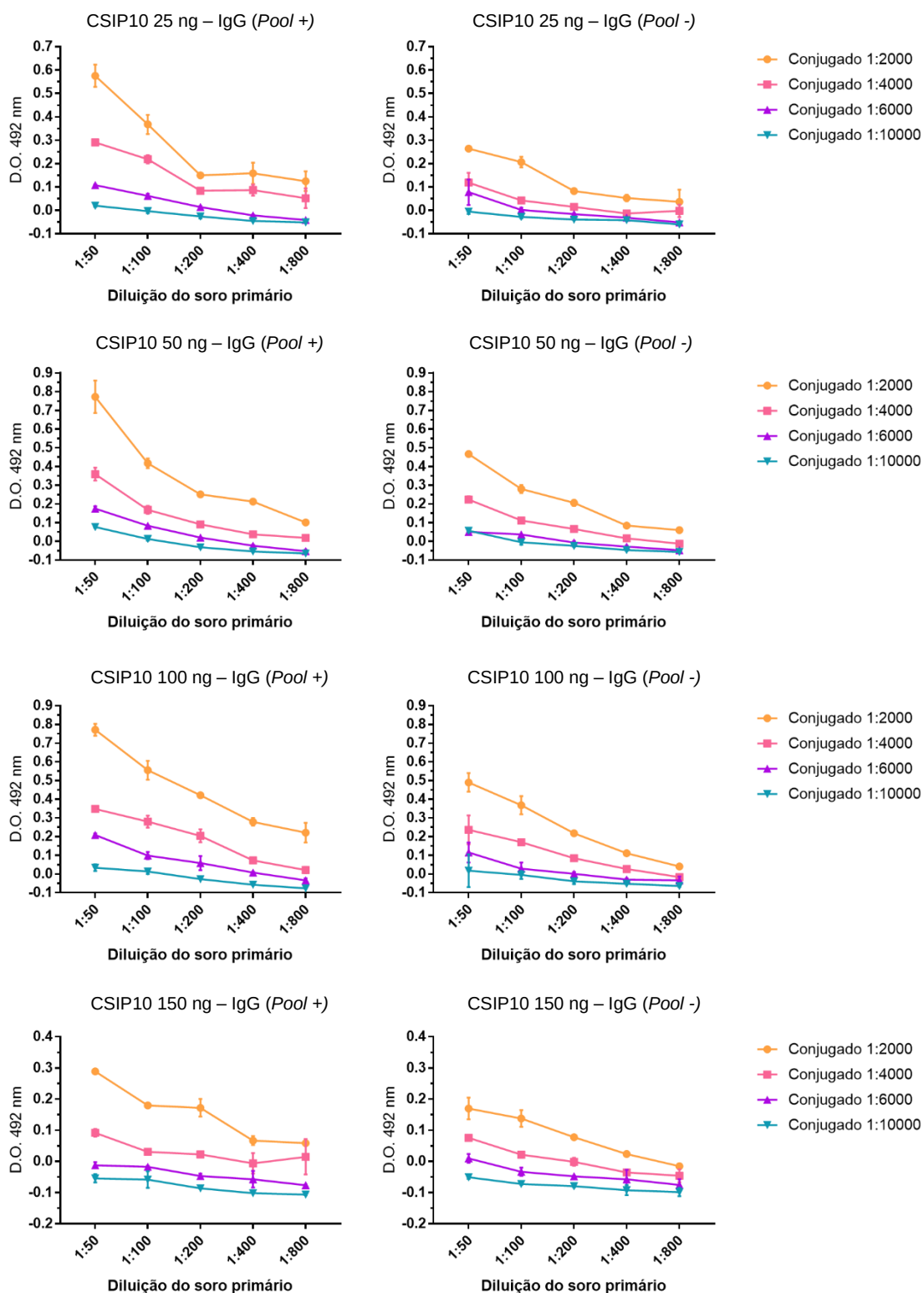
873 **Figura 13.** *Checkerboards* da proteína CSIP08 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições
 874 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 875 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 876 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.

877



878

879 **Figura 14.** *Checkerboards* da proteína CSIP08 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições
 880 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 881 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 882 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



883

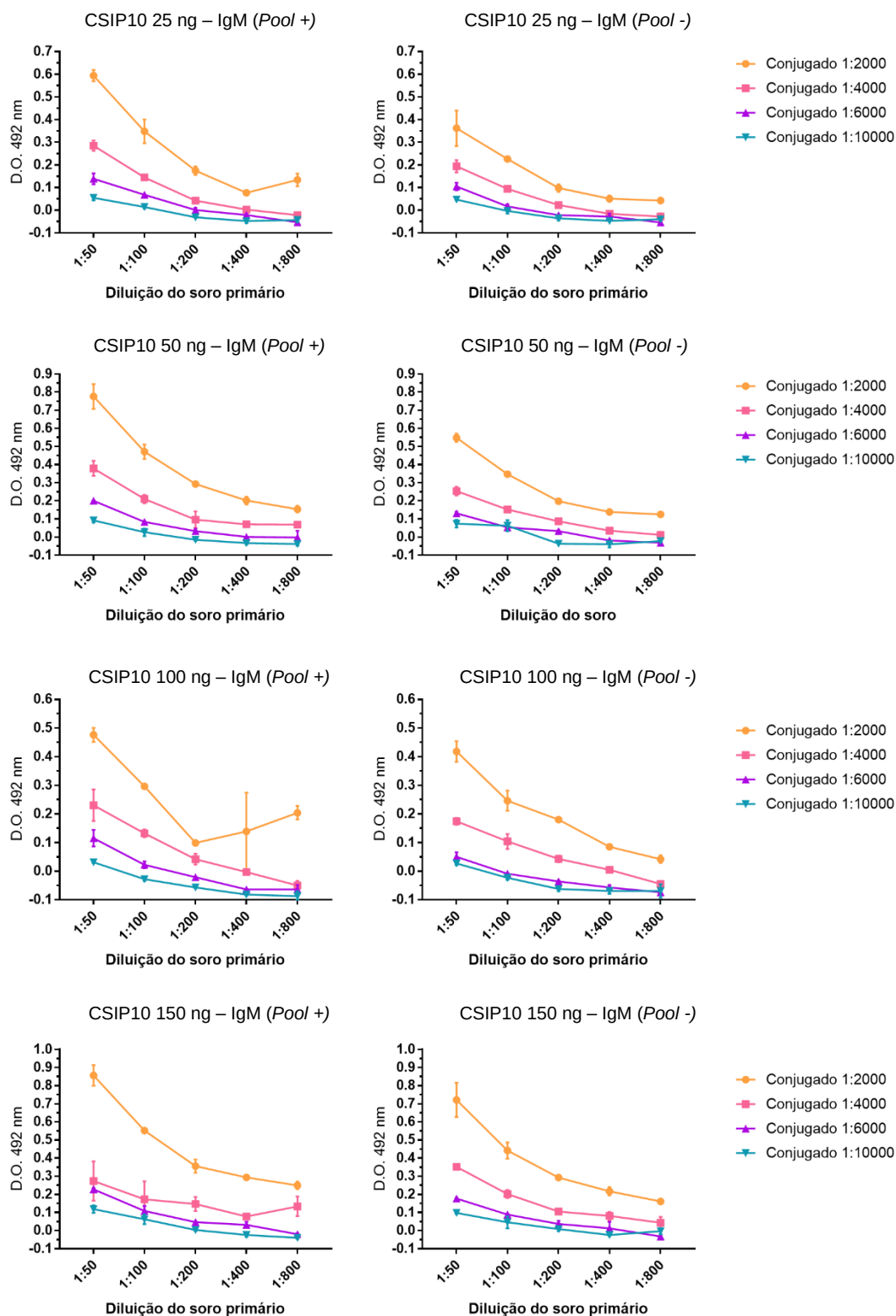
884

885

886

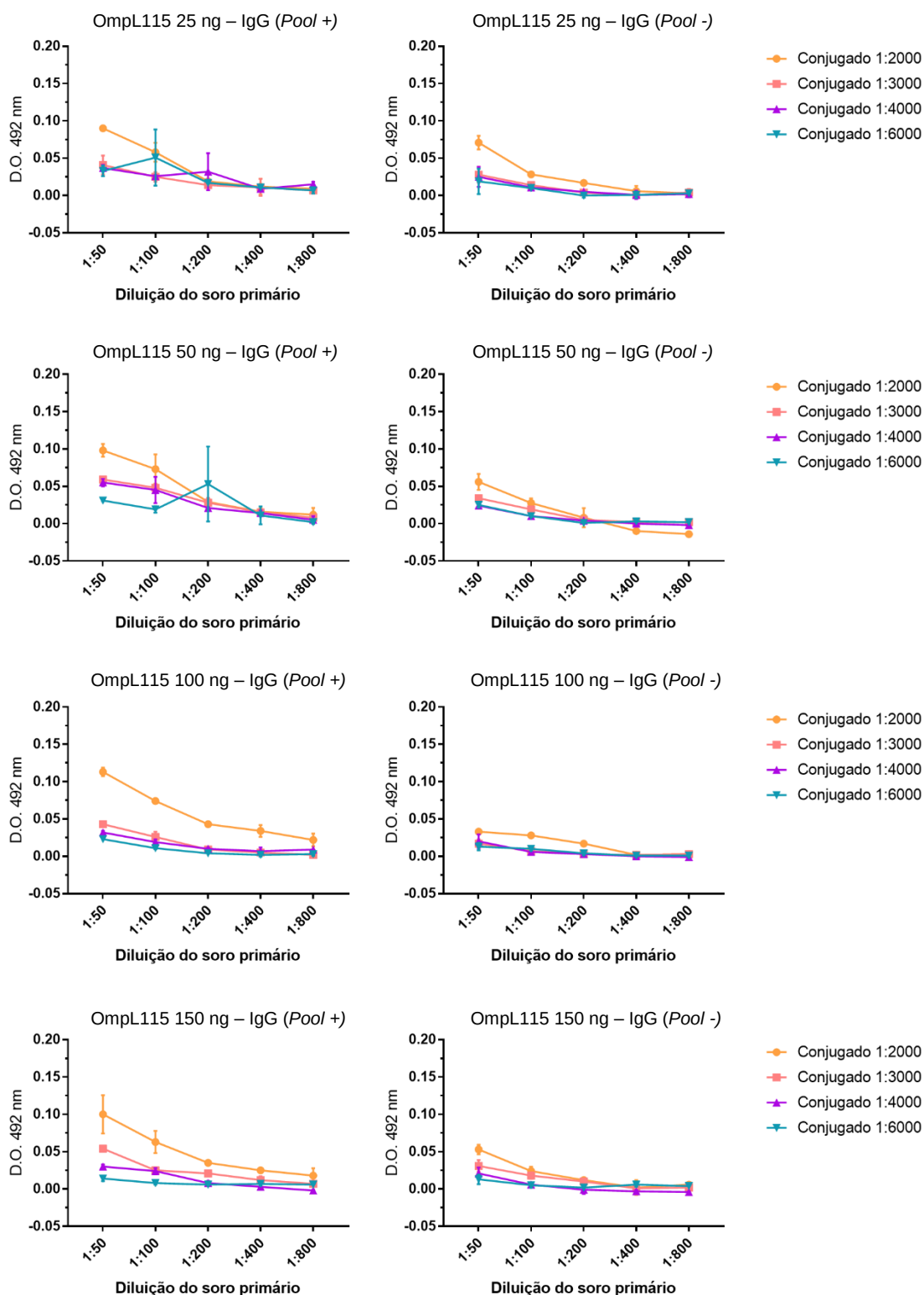
887

Figura 15. *Checkerboards* da proteína CSIP10 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



888

889 **Figura 16.** Checkerboards da proteína CSIP10 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições
 890 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 891 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 892 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



893

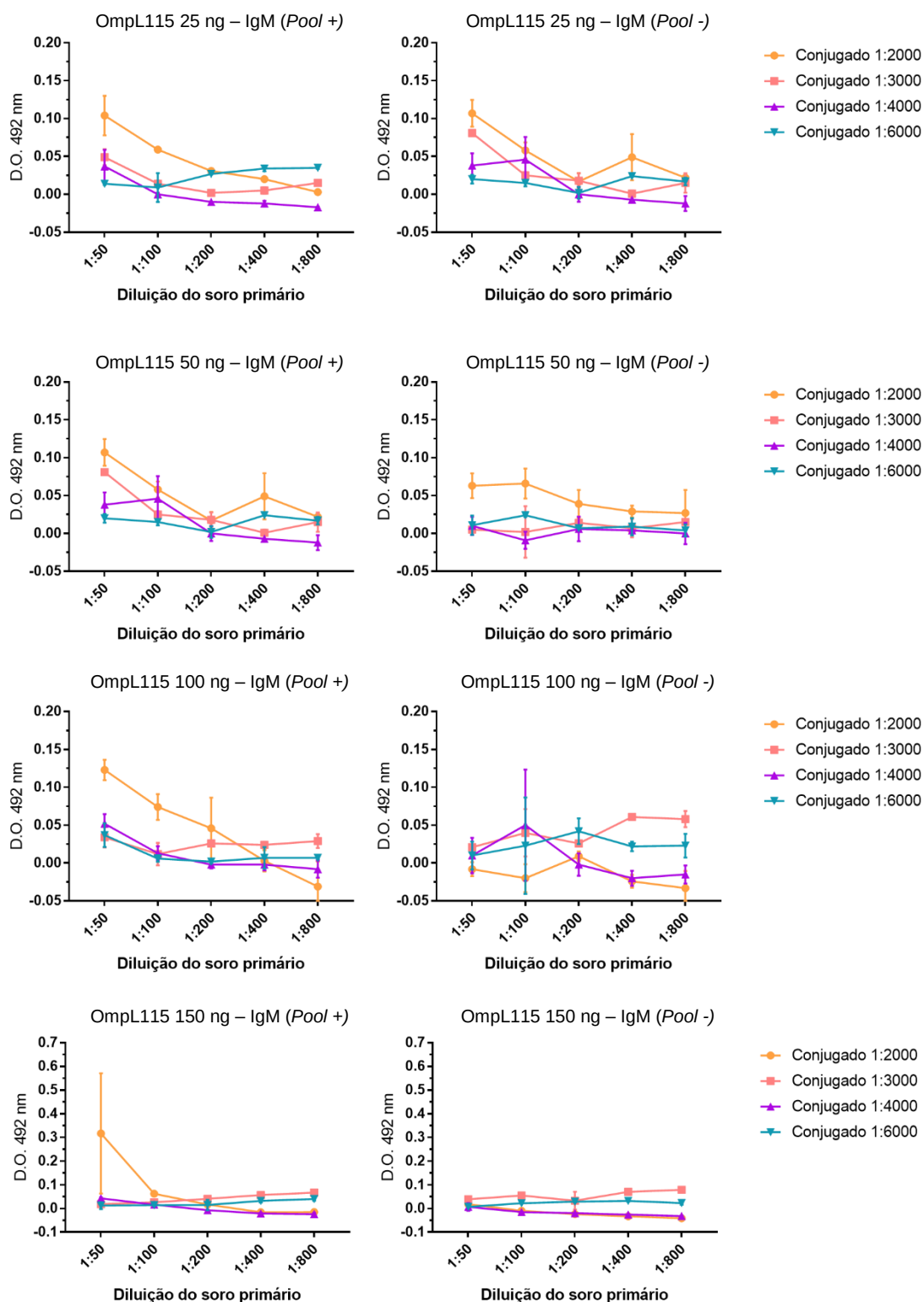
894

895

896

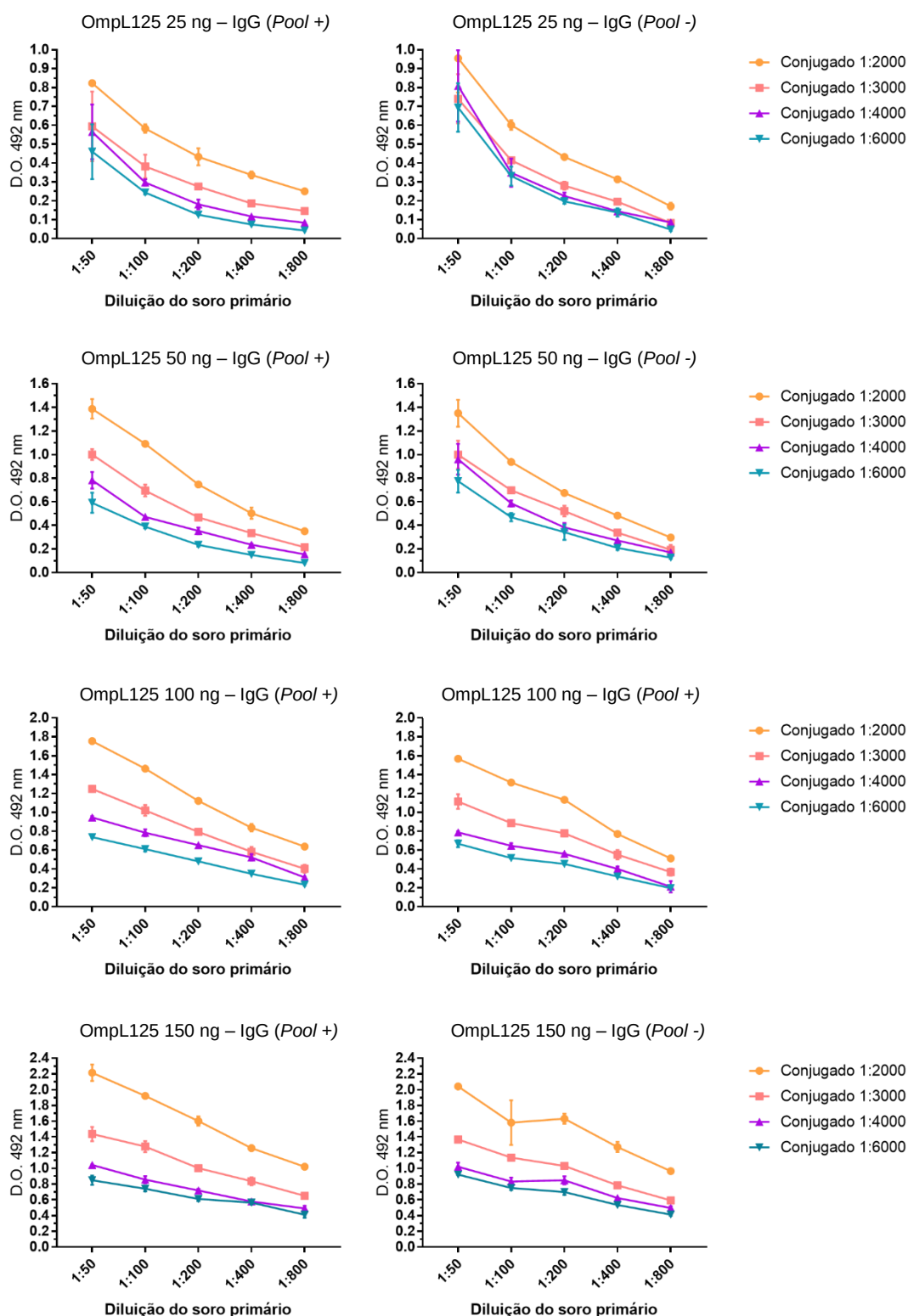
897

Figura 17. *Checkerboards* da proteína OmpL115 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



898

899 **Figura 18.** Checkerboards da proteína OmpL115 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições
 900 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 901 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 902 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



903

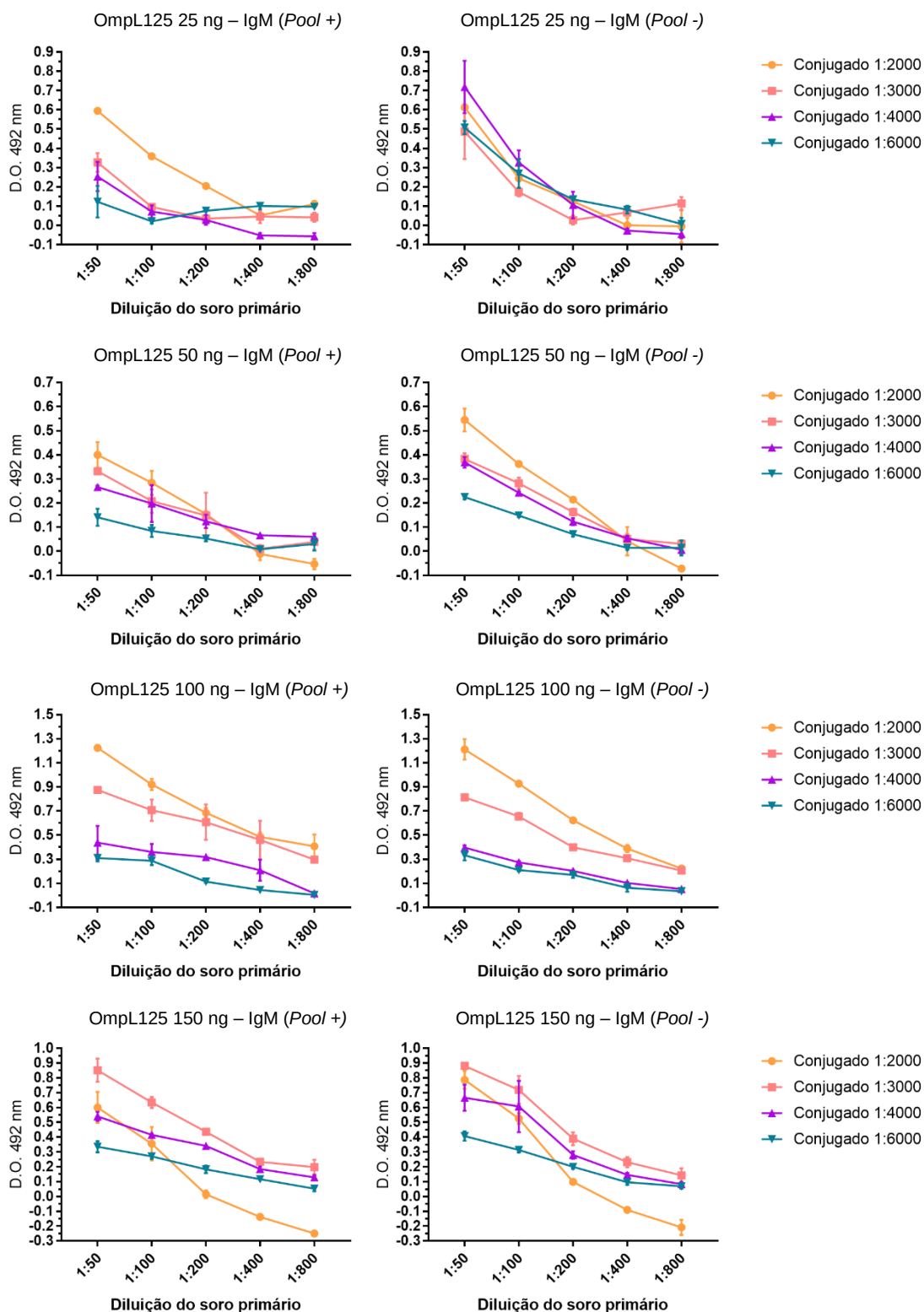
904

905

906

907

Figura 19. *Checkerboards* da proteína OmpL125 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



908

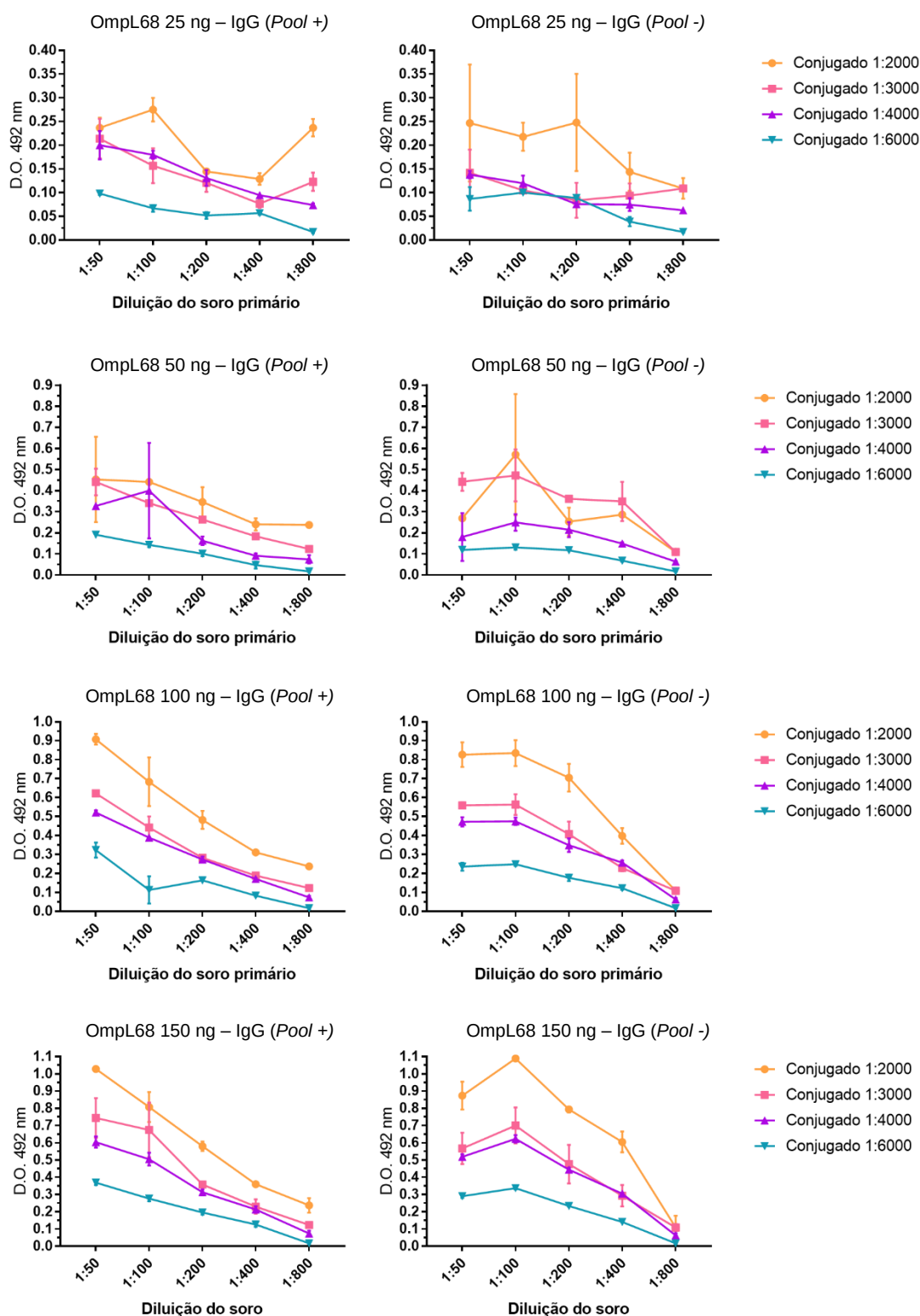
909

910

911

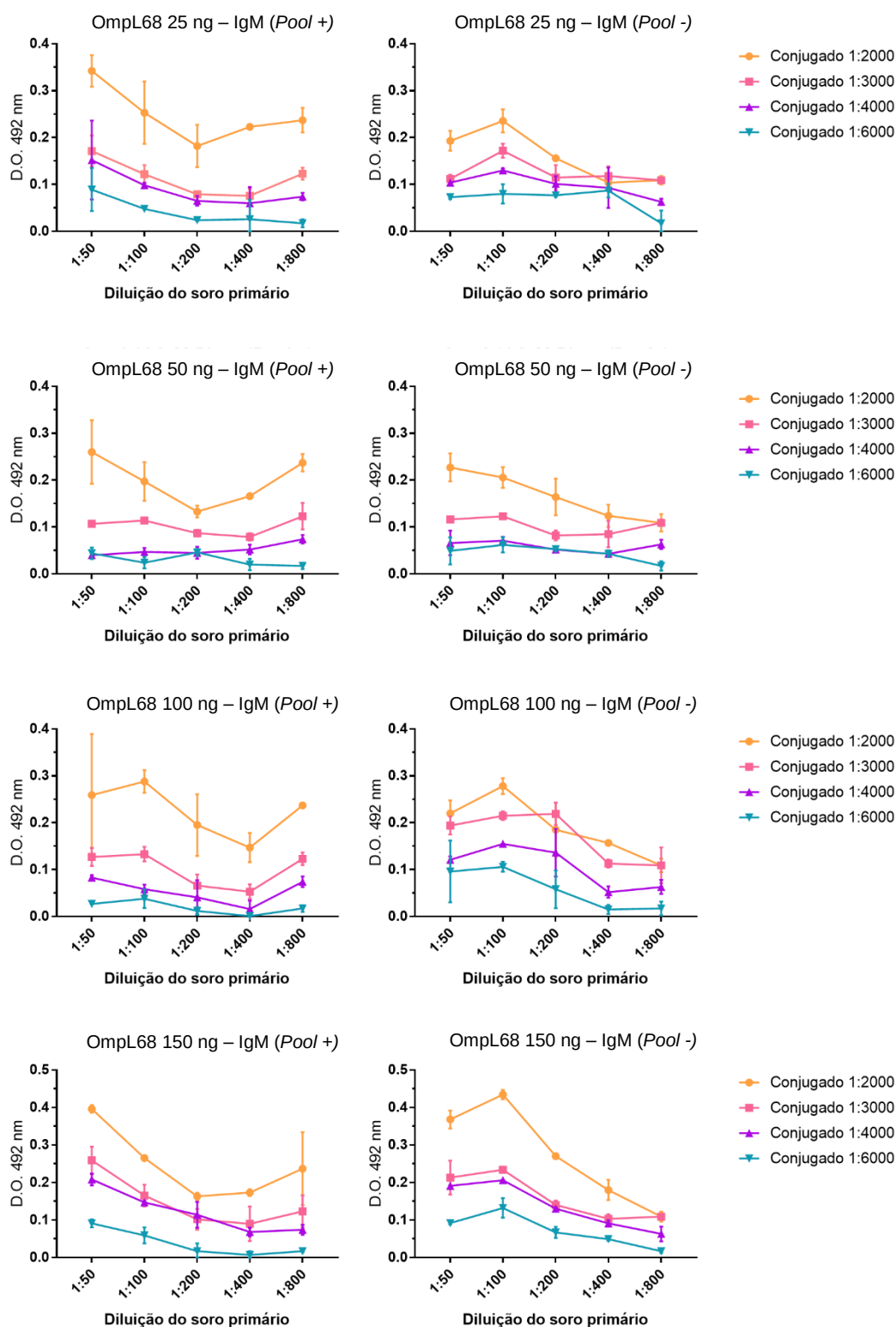
912

Figura 20. Checkerboards da proteína OmpL125 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



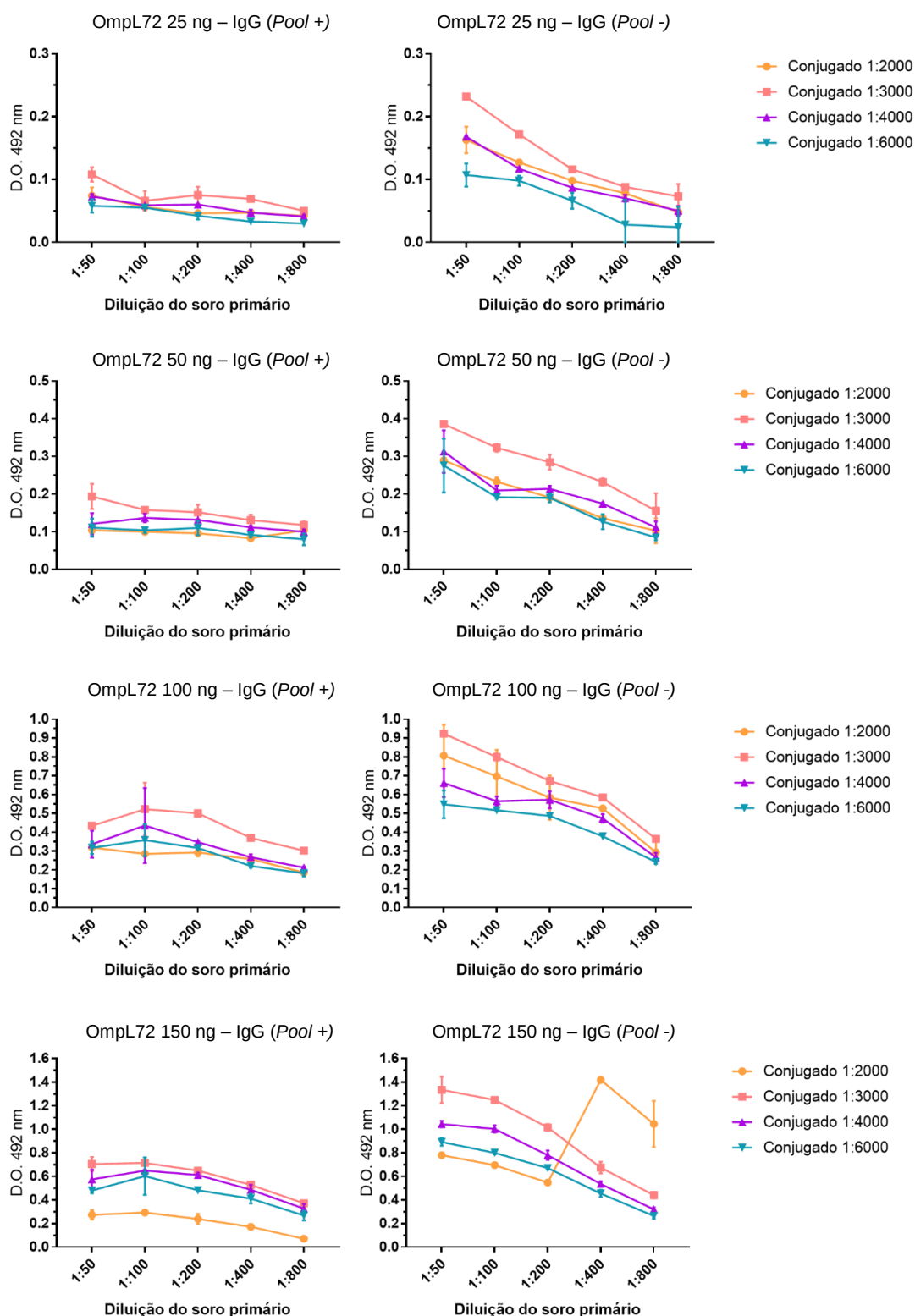
913

914 **Figura 21.** Checkerboards da proteína OmpL68 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições
 915 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 916 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 917 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



918

919 **Figura 22.** Checkerboards da proteína OmpL68 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições
 920 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 921 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 922 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



923

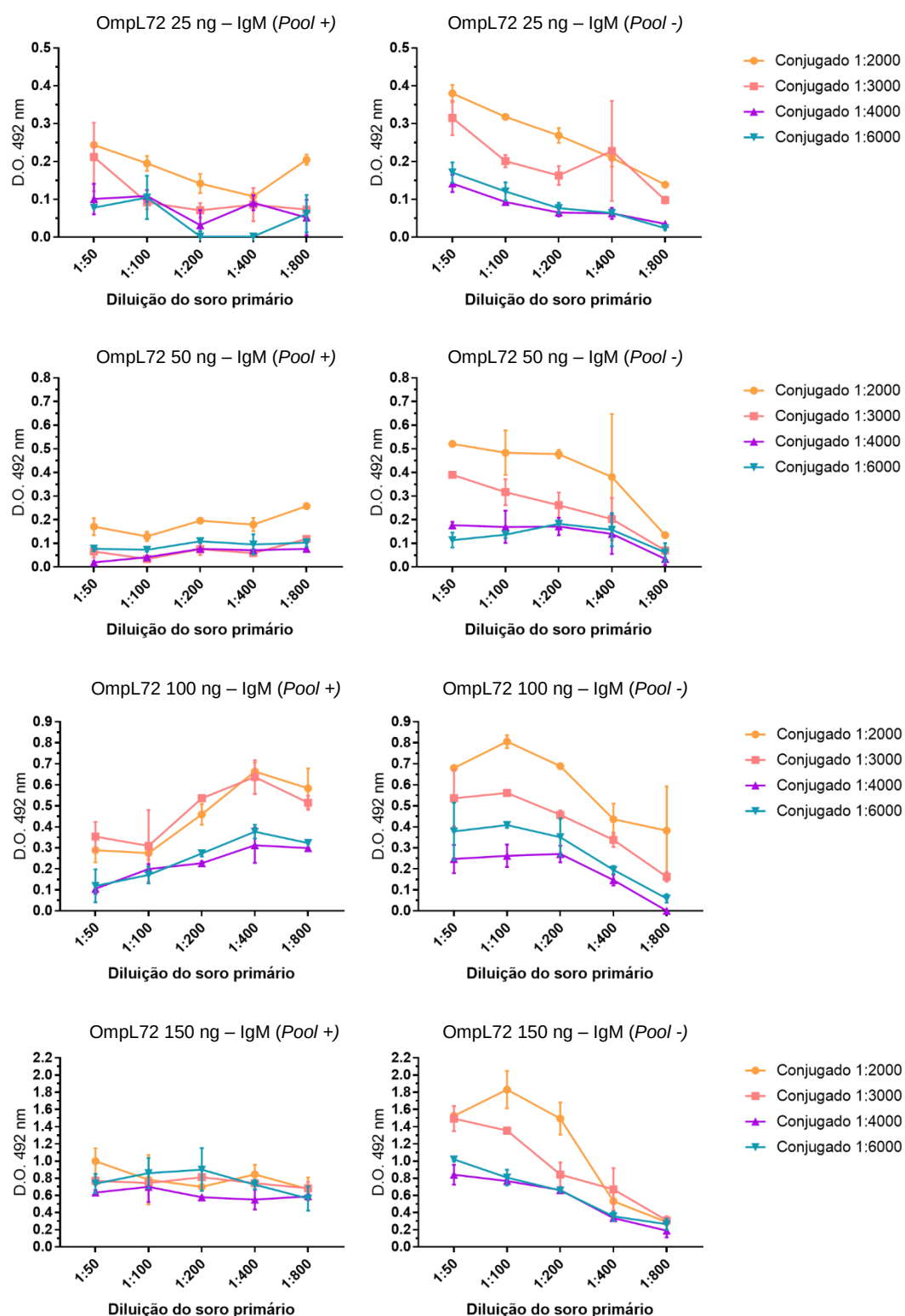
924

925

926

927

Figura 23. *Checkerboards* da proteína OmpL72 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



928

929 **Figura 24.** Checkerboards da proteína OmpL72 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições
 930 do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam
 931 diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools*
 932 positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.

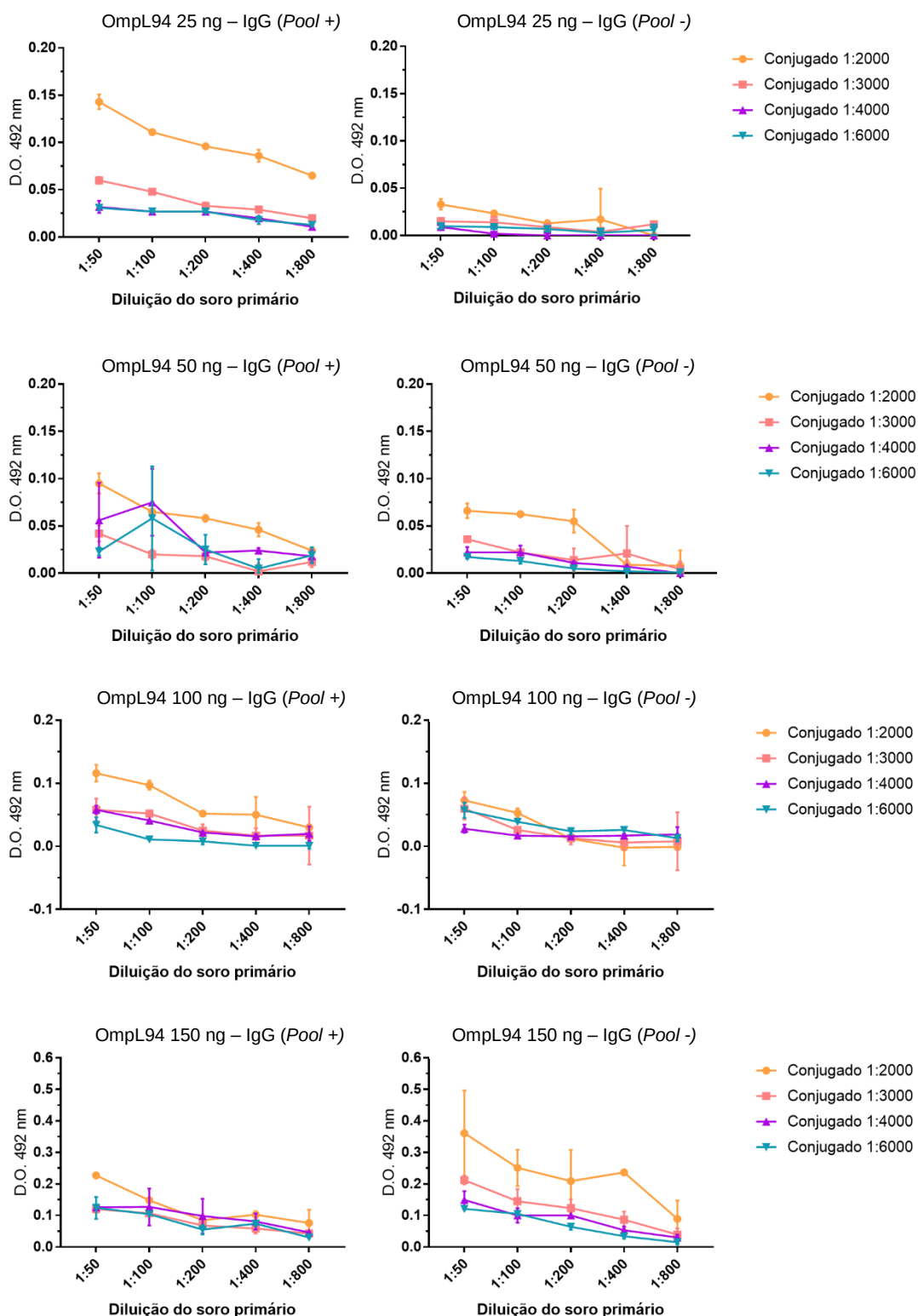
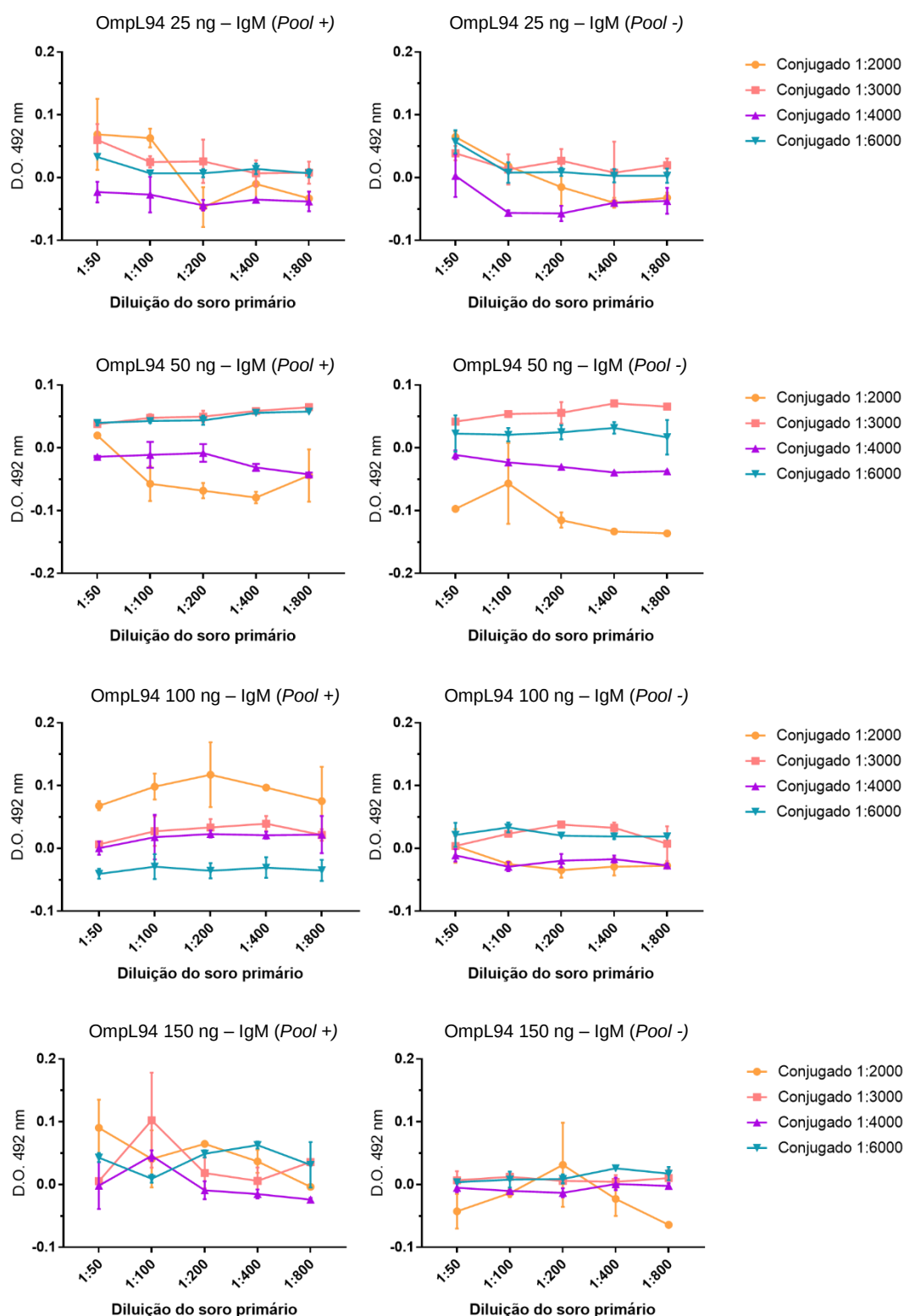


Figura 25. Checkerboards da proteína OmpL94 (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



938

939

940

941

942

Figura 26. Checkerboards da proteína OmpL94 (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.

Tendo em vista que os resultados dos testes de ELISA não estavam de acordo a pré-caracterização dos soros caninos utilizados, foram testados soros de hamsters (de outros experimentos do LPDI) sob as mesmas condições dos ensaios anteriores (Figura 27). Soros positivos foram oriundos de animais inoculados com PBS e posteriormente infectados com leptospiros patogênicas e que foram a óbito. Soros negativos foram coletados no início (dia zero) de outro experimento, de animais que nunca haviam sido inoculados. Para isso, o antígeno utilizado foi a OmpL94, nas concentrações de 50 ou 150 ng/poço com o método de ELISA-IgG.

Os gráficos da figura 27 mostram que os valores de absorbância obtidos eram constantemente baixos, resultando em falso-negativos. Estes valores não mudaram significativamente mesmo com a triplicação da quantidade de antígeno por poço, o que sugere, principalmente, que há pouca capacidade de reconhecimento entre o anticorpo e o antígeno utilizado.

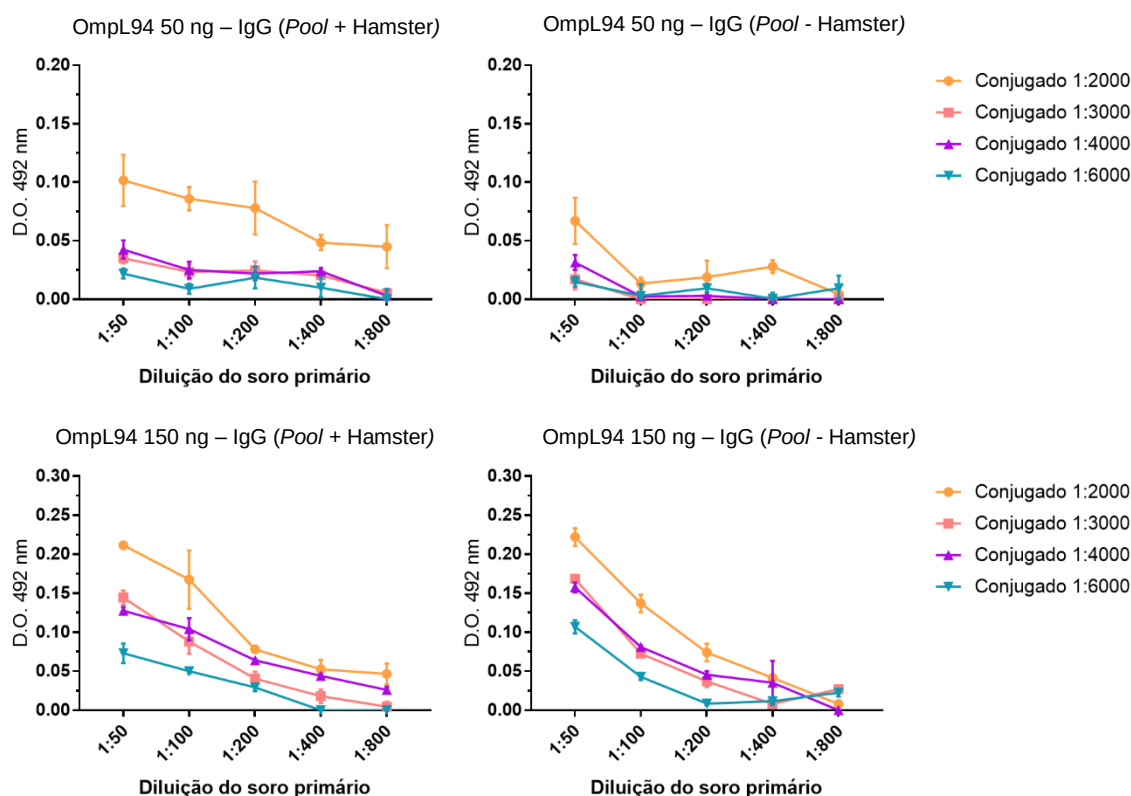
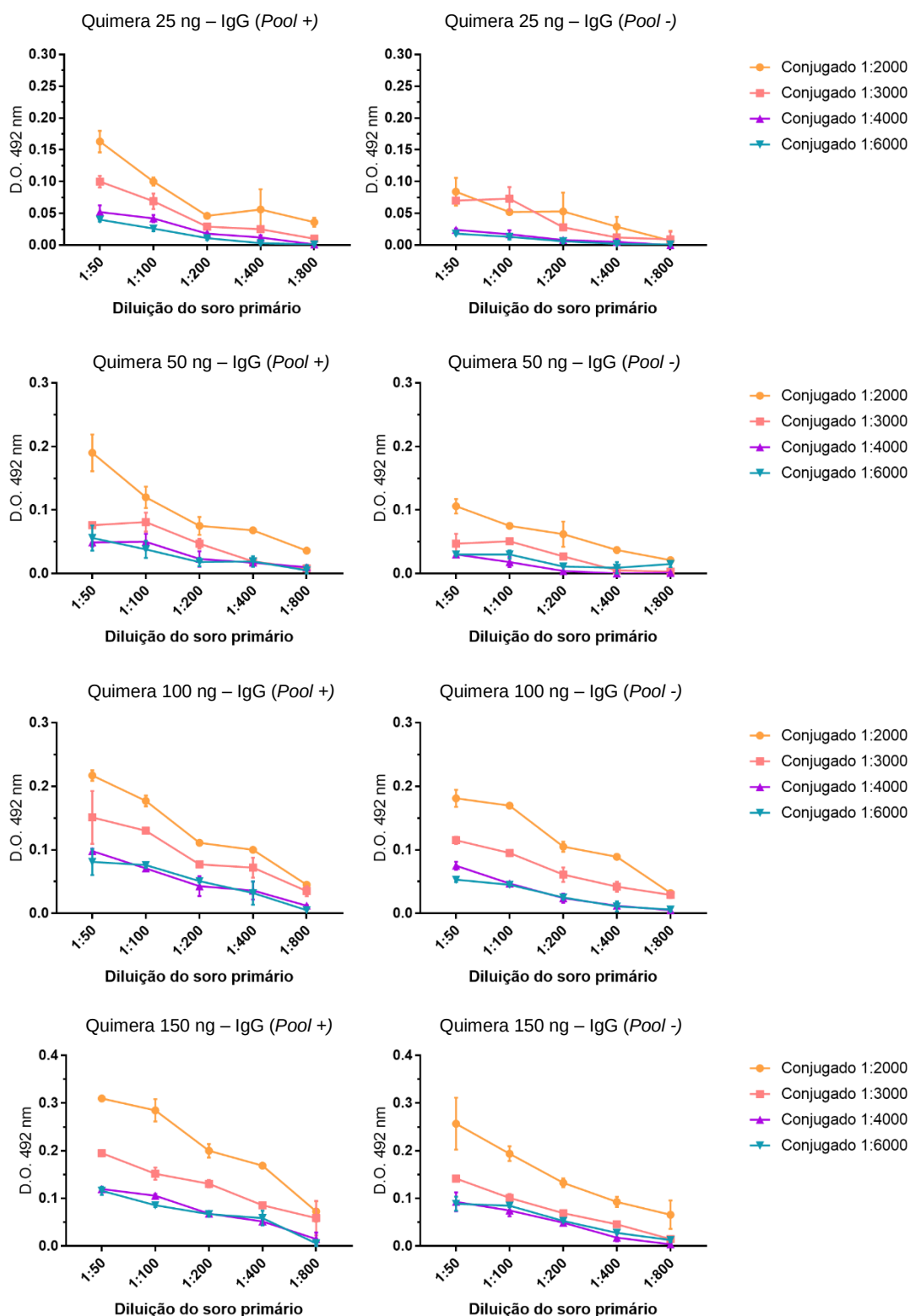


Figura 27. Checkerboards da proteína OmpL94 (ELISA-IgG) utilizando soros de hamsters. No eixo X, estão as diferentes diluições dos soros e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



962

963

964

965

966

Figura 28. Checkerboards da quimera (ELISA-IgG). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.

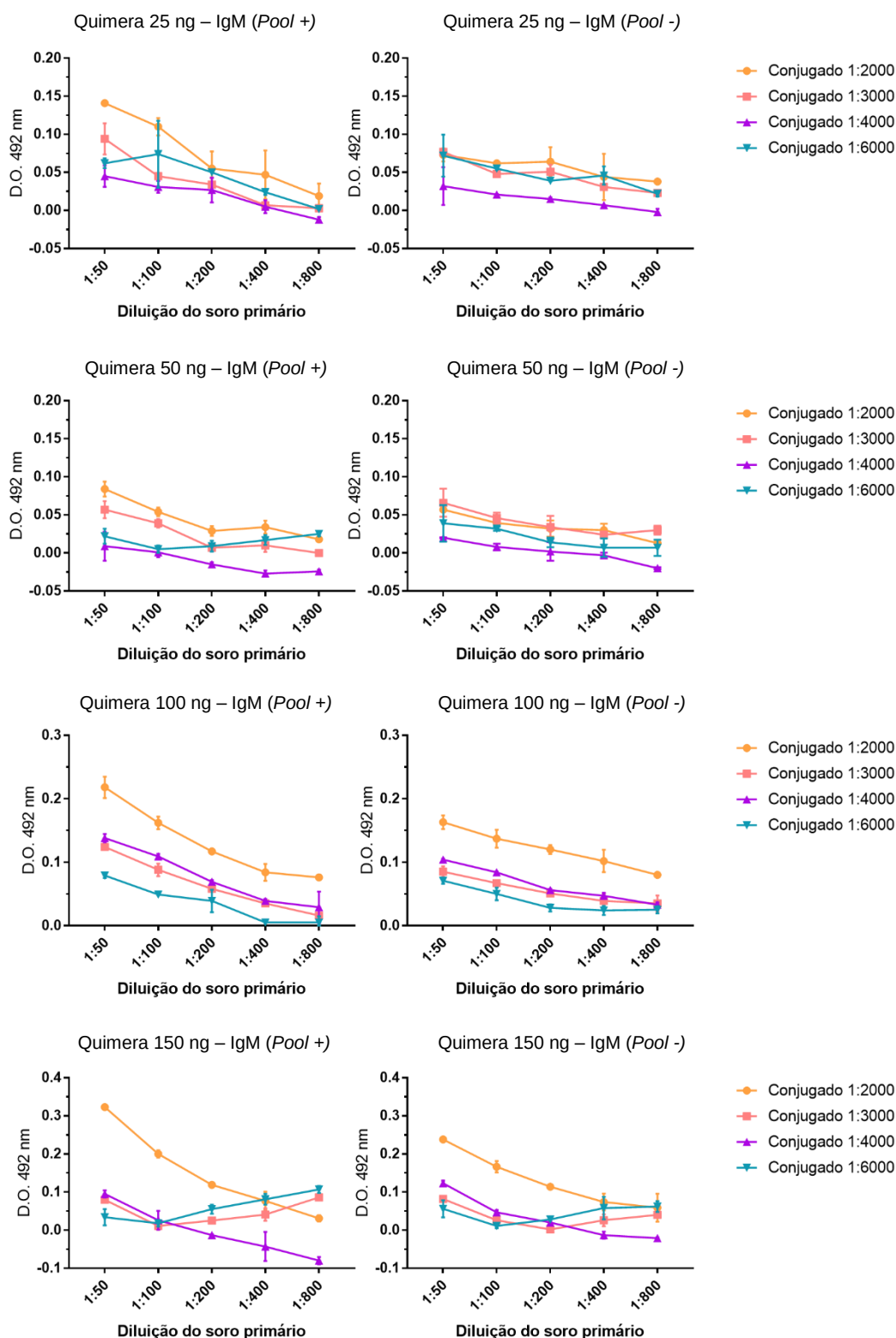


Figura 29. Checkerboards da quimera (ELISA-IgM). No eixo X, estão as diferentes diluições do soro primário e, no eixo Y, a densidade ótica obtida sob 492 nm. Os diferentes gráficos representam diferentes concentrações do antígeno, e quais soros foram utilizados. Gráficos da esquerda: *pools* positivos; gráficos da direita: *pools* negativos.



Expert Opinion on Drug Discovery



ISSN: 1746-0441 (Print) 1746-045X (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iedc20>

An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives

Carolina R. Felix, Bianca S. Siedler, Liana N. Barbosa, Gabriela R. Timm, Johnjo McFadden & Alan J. A. McBride

To cite this article: Carolina R. Felix, Bianca S. Siedler, Liana N. Barbosa, Gabriela R. Timm, Johnjo McFadden & Alan J. A. McBride (2020) An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives, Expert Opinion on Drug Discovery, 15:2, 179-188, DOI: [10.1080/17460441.2020.1694508](https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508>



View supplementary material ↗



Published online: 28 Nov 2019.



Submit your article to this journal ↗



Article views: 34



View related articles ↗



View Crossmark data ↗

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iedc20>

975 **9 REFERÊNCIAS**

- 976 ABDOEL, T. H., HOUWERS, D. J., VAN DONGEN, A. M., ADESIYUN, A. A.,
 977 JIMENEZ-COELLOE, M., CARDOSO, L., SUEPAUL, S. M., ORTEGA-
 978 PACHECO, A. & SMITS, H. L. 2011. Rapid test for the serodiagnosis of acute
 979 canine leptospirosis. *Vet Microbiol*.
- 980 ADLER, B. 2015a. *Leptospira and Leptospirosis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
 981 ADLER, B. 2015b. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387,
 982 251-72.
- 983 ADLER, B. & DE LA PENA MOCTEZUMA, A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet*
 984 *Microbiol*, 140, 287-96.
- 985 ANDRE-FONTAINE, G., AVIAT, F. & THORIN, C. 2015. Waterborne Leptospirosis:
 986 Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in
 987 Fresh Water. *Curr Microbiol*, 71, 136-42.
- 988 ASOH, T., SAITO, M., VILLANUEVA, S. Y., KANEMARU, T., GLORIANI, N. &
 989 YOSHIDA, S. 2014. Natural defense by saliva and mucosa against oral
 990 infection by Leptospira. *Can J Microbiol*, 60, 383-9.
- 991 AYDIN, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory
 992 experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- 993 BASHIRU, G. & BAHAMAN, A. R. 2018. Advances & challenges in leptospiral
 994 vaccine development. *Indian J Med Res*, 147, 15-22.
- 995 BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICARDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M.,
 996 LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO,
 997 E. & VINETZ, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global
 998 importance. *Lancet Infect Dis*, 3, 757-71.
- 999 CANALE-PAROLA, E. 1978. Motility and chemotaxis of spirochetes. *Annu Rev*
 1000 *Microbiol*, 32, 69-99.
- 1001 CHAURASIA, R., THRESIAMMA, K. C., EAPEN, C. K., ZACHARIAH, B. J., PAUL, R.
 1002 & SRITHARAN, M. 2018. Pathogen-specific leptospiral proteins in urine of
 1003 patients with febrile illness aids in differential diagnosis of leptospirosis from
 1004 dengue. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 37, 423-433.
- 1005 CHEN, H. W., WEISSENBERGER, G., ATKINS, E., CHAO, C. C.,
 1006 SUPUTTAMONGKOL, Y. & CHING, W. M. 2015. Highly Sensitive Loop-
 1007 Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Leptospira. *Int J*
 1008 *Bacteriol*, 2015, 147173.
- 1009 CONRAD, N. L., CRUZ MCBRIDE, F. W., SOUZA, J. D., SILVEIRA, M. M., FELIX,
 1010 S., MENDONCA, K. S., SANTOS, C. S., ATHANAZIO, D. A., MEDEIROS, M.
 1011 A., REIS, M. G., DELLAGOSTIN, O. A. & MCBRIDE, A. J. 2017. LigB subunit
 1012 vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of
 1013 leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005441.
- 1014 COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSO, P.,
 1015 MARTINEZ-SILVEIRA, M. S., STEIN, C., ABELA-RIDDER, B. & KO, A. I.
 1016 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review.
 1017 *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003898.
- 1018 CULLEN, P. A., XU, X., MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., KO, A. I., HAAKE, D. A. &
 1019 ADLER, B. 2005. Surfaceome of Leptospira spp. *Infect Immun*, 73, 4853-63.
- 1020 DESAKORN, V., WUTHIEKANUN, V., THANACHARTWET, V., SAHASSANANDA,
 1021 D., CHIERAKUL, W., APIWATTANAPORN, A., DAY, N. P.,
 1022 LIMMATHUROTSAKUL, D. & PEACOCK, S. J. 2012. Accuracy of a

- commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 86, 524-7.
- 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.
- DOUNGCHAWEE, G., KOSITANONT, U., NIWETPATHOMWAT, A., INWISAI, T., SAGARASAERANEE, P. & HAAKE, D. A. 2008. Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin m immunoblot testing. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 492-8.
- ELLINGHAUSEN, H. C., JR. & MCCULLOUGH, W. G. 1965. Nutrition of *Leptospira* Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. *Am J Vet Res*, 26, 45-51.
- ELLIS, W. A. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec*, 167, 602-5.
- ELLIS, W. A. & MICHNO, S. W. 1976. Bovine leptospirosis: a serological and clinical study. *Vet Rec*, 99, 387-91.
- FELIX, C. R., SIEDLER, B. S., BARBOSA, L. N., TIMM, G. R., MCFADDEN, J. & MCBRIDE, A. J. A. 2019. An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. *Expert Opin Drug Discov*, 1-10.
- FOUTS, D. E., MATTHIAS, M. A., ADHIKARLA, H., ADLER, B., AMORIM-SANTOS, L., BERG, D. E., BULACH, D., BUSCHIAZZO, A., CHANG, Y. F., GALLOWAY, R. L., HAAKE, D. A., HAFT, D. H., HARTSKEERL, R., KO, A. I., LEVETT, P. N., MATSUNAGA, J., MECHALY, A. E., MONK, J. M., NASCIMENTO, A. L., NELSON, K. E., PALSSON, B., PEACOCK, S. J., PICARDEAU, M., RICALDI, J. N., THAIPANDUNGPANIT, J., WUNDER, E. A., JR., YANG, X. F., ZHANG, J. J. & VINETZ, J. M. 2016. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004403.
- FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Complement System. *Scand J Immunol*, 73, 408-419.
- FRAGA, T. R., COURROL DDOS, S., CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., HIRATA, I. Y., VASCONCELLOS, S. A., JULIANO, L., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2014. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis*, 209, 876-86.
- GHAZAEI, C. 2018. Pathogenic *Leptospira*: Advances in understanding the molecular pathogenesis and virulence. *Open Vet J*, 8, 13-24.
- GLOOR, C. I., SCHWEIGHAUSER, A., FRANCEY, T., RODRIGUEZ-CAMPOS, S., VIDONDO, B., BIGLER, B. & SCHULLER, S. 2017. Diagnostic value of two commercial chromatographic "patient-side" tests in the diagnosis of acute canine leptospirosis. *J Small Anim Pract*, 58, 154-161.
- GOLDSTEIN, S. F. & CHARON, N. W. 1988. Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 9, 101-10.
- GORIS, M. G., LEEFLANG, M. M., LODEN, M., WAGENAAR, J. F., KLATSER, P. R., HARTSKEERL, R. A. & BOER, K. R. 2013. Prospective evaluation of three

- 1072 rapid diagnostic tests for diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop*
 1073 *Dis*, 7, e2290.
- 1074 GRASSMANN, A. A., KREMER, F. S., DOS SANTOS, J. C., SOUZA, J. D., PINTO,
 1075 L. D. S. & MCBRIDE, A. J. A. 2017a. Discovery of Novel Leptospirosis
 1076 Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front*
 1077 *Immunol*, 8, 463.
- 1078 GRASSMANN, A. A., SOUZA, J. D. & MCBRIDE, A. J. 2017b. A Universal Vaccine
 1079 against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol*, 8,
 1080 256.
- 1081 HAAKE, D. A. & LEVETT, P. N. 2015. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol*
 1082 *Immunol*, 387, 65-97.
- 1083 HAAKE, D. A. & MATSUNAGA, J. 2010. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer
 1084 membrane. *Mol Microbiol*, 77, 805-14.
- 1085 HAAKE, D. A. & ZUCKERT, W. R. 2015. The leptospiral outer membrane. *Curr Top*
 1086 *Microbiol Immunol*, 387, 187-221.
- 1087 INADA, R., IDO, Y., HOKI, R., KANEKO, R. & ITO, H. 1916. The Etiology, Mode of
 1088 Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis
 1089 Icterohaemorrhagica). *J Exp Med*, 23, 377-402.
- 1090 KARPAGAM, K. B. & GANESH, B. 2020. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic
 1091 infection of public health importance-an updated review. *Eur J Clin Microbiol*
 1092 *Infect Dis*.
- 1093 KO, A. I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. 2009. Leptospira: the dawn of the
 1094 molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*,
 1095 7, 736-47.
- 1096 KODJO, A., CALLEJA, C., LOENSER, M., LIN, D. & LIZER, J. 2016. A Rapid In-
 1097 Clinic Test Detects Acute Leptospirosis in Dogs with High Sensitivity and
 1098 Specificity. *Biomed Res Int*, 2016, 3760191.
- 1099 KUMAR, S., LATA, K. S., SHARMA, P., BHAIAPPANAVAR, S. B., SONI, S. & DAS,
 1100 J. 2019. Inferring pathogen-host interactions between Leptospira interrogans
 1101 and Homo sapiens using network theory. *Sci Rep*, 9, 1434.
- 1102 LANTZ, P. G., ABU AL-SOUD, W., KNUTSSON, R., HAHN-HAGERDAL, B. &
 1103 RADSTROM, P. 2000. Biotechnical use of polymerase chain reaction for
 1104 microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol Annu Rev*, 5, 87-
 1105 130.
- 1106 LEVETT, P. N. 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting
 1107 serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis*, 36, 447-52.
- 1108 LILENBAUM, W., RISTOW, P., FRAGUAS, S. A. & DA SILVA, E. D. 2002.
 1109 Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine
 1110 leptospirosis. *Rev Latinoam Microbiol*, 44, 124-8.
- 1111 LIZER, J., VELINENI, S., WEBER, A., KRECIC, M. & MEEUS, P. 2017. Evaluation of
 1112 3 Serological Tests for Early Detection Of Leptospira-specific Antibodies in
 1113 Experimentally Infected Dogs. *J Vet Intern Med*.
- 1114 LÓPEZ, M. C., VILA, A., RODÓN, J. & ROURA, X. 2019. Leptospira seroprevalence
 1115 in owned dogs from Spain. *Heliyon*, 5.
- 1116 MALMSTROM, J., BECK, M., SCHMIDT, A., LANGE, V., DEUTSCH, E. W. &
 1117 AEBERSOLD, R. 2009. Proteome-wide cellular protein concentrations of the
 1118 human pathogen Leptospira interrogans. *Nature*, 460, 762-5.
- 1119 MARTINS, G. & LILENBAUM, W. 2017. Control of bovine leptospirosis: Aspects for
 1120 consideration in a tropical environment. *Res Vet Sci*, 112, 156-160.

- 1121 MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M. A., CRODA, J., YOUNG, T. A., SANCHEZ, Y.,
1122 SIQUEIRA, I., BOLIN, C. A., REIS, M. G., RILEY, L. W., HAAKE, D. A. & KO,
1123 A. I. 2003. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins
1124 belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*, 49, 929-
1125 45.
- 1126 MCBRIDE, A. J., PEREIRA, F. A., DA SILVA, E. D., DE MATOS, R. B., DA SILVA, E.
1127 D., FERREIRA, A. G., REIS, M. G. & KO, A. I. 2007. Evaluation of the EIE-
1128 IgM-*Leptospira* assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop*, 102,
1129 206-11.
- 1130 MIOTTO, B. A., TOZZI, B. F., PENTEADO, M. D. S., GUILLOUX, A. G. A.,
1131 MORENO, L. Z., HEINEMANN, M. B., MORENO, A. M., LILENBAUM, W. &
1132 HAGIWARA, M. K. 2018. Diagnosis of acute canine leptospirosis using
1133 multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. *BMC*
1134 *Veterinary Research*, 14, 222.
- 1135 MOUSAVI, M. N. S., SADEGHIC, J., AGHAZADEHD, M., ASGHARZADEHE, M. &
1136 KAFIL, H. S. 2017. Current advances in urban leptospirosis diagnosis.
1137 *Reviews in Medical Microbiology*, 28, 119-123.
- 1138 MURPHY, K. 2015. Leptospirosis: a review to aid diagnosis and treatment.
1139 *Companion Animal*, 20.
- 1140 MURPHY, K. 2018. Dealing with leptospirosis in dogs. *Veterinary Record*, 183, 384-
1141 385.
- 1142 MURRAY, G. L. 2013. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet*
1143 *Microbiol*, 162, 305-14.
- 1144 MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HENRY, R., HARTSKEERL, R. A., SERMSWAN, R.
1145 W. & ADLER, B. 2010. Mutations affecting *Leptospira* interrogans
1146 lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*, 78, 701-9.
- 1147 MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HOKE, D. E., WUNDER, E. A., JR., HENRY, R., LO,
1148 M., ZHANG, K., SERMSWAN, R. W., KO, A. I. & ADLER, B. 2009. Major
1149 surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with
1150 *Leptospira* interrogans. *Infect Immun*, 77, 952-8.
- 1151 MWACHUI, M. A., CRUMP, L., HARTSKEERL, R., ZINSSTAG, J. & HATTENDORF,
1152 J. 2015. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis
1153 Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003843.
- 1154 NABITY, S. A., HAGAN, J. E., ARAUJO, G., DAMIAO, A. O., CRUZ, J. S., NERY, N.,
1155 WUNDER, E. A., JR., REIS, M. G., KO, A. I. & RIBEIRO, G. S. 2018.
1156 Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the Dual Path Platform
1157 (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized
1158 patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 12, e0006285.
- 1159 NILOOFA, R., FERNANDO, N., DE SILVA, N. L., KARUNANAYAKE, L.,
1160 WICKRAMASINGHE, H., DIKMADUGODA, N., PREMAWANSA, G.,
1161 WICKRAMASINGHE, R., DE SILVA, H. J., PREMAWANSA, S., RAJAPAKSE,
1162 S. & HANDUNNETTI, S. 2015. Diagnosis of Leptospirosis: Comparison
1163 between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid
1164 Immunochromatography Test. *PLoS One*, 10, e0129236.
- 1165 NURUL NAJIAN, A. B., ENSKU NUR SYAFIRAH, E. A., ISMAIL, N., MOHAMED, M.
1166 & YEAN, C. Y. 2016. Development of multiplex loop mediated isothermal
1167 amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick
1168 biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Anal Chim Acta*, 903, 142-8.

- 1169 OOTEMAN, M. C., VAGO, A. R. & KOURY, M. C. 2006. Evaluation of MAT, IgM
1170 ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol*
1171 *Methods*, 65, 247-57.
- 1172 PANWALA, T., RAJDEV, S. & MULLA, S. 2015. To evaluate the different rapid
1173 screening tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Diagn Res*, 9, DC21-4.
- 1174 PENNA, B., MARASSI, C. D., LIBONATI, H., NARDUCHE, L., LILENBAUM, W. &
1175 BOURHY, P. 2017. Diagnostic accuracy of an in-house ELISA using the
1176 intermediate species *Leptospira fainei* as antigen for diagnosis of acute
1177 leptospirosis in dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 50, 13-15.
- 1178 PICARDEAU, M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra
1179 incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15, 297-307.
- 1180 PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULLOUDIS, A. N., DURSKI,
1181 K. & HARTSKEERL, R. A. 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis:
1182 current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78, 1-8.
- 1183 PINNE, M. & HAAKE, D. A. 2009. A comprehensive approach to identification of
1184 surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira*
1185 interrogans. *PLoS One*, 4, e6071.
- 1186 PINNE, M. & HAAKE, D. A. 2013. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira*
1187 interrogans: presentation of new data and reevaluation of previous studies.
1188 *PLoS One*, 8, e51025.
- 1189 PINTO, P. S., LIBONATI, H. & LILENBAUM, W. 2017. A systematic review of
1190 leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health*
1191 *Prod*, 49, 231-238.
- 1192 RAPPUOLI, R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*, 3, 445-50.
- 1193 RATET, G., VEYRIER, F. J., FANTON D'ANDON, M., KAMMERSCHIT, X.,
1194 NICOLA, M. A., PICARDEAU, M., BONECA, I. G. & WERTS, C. 2014. Live
1195 Imaging of Bioluminescent *Leptospira* interrogans in Mice Reveals Renal
1196 Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics.
1197 *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3359.
- 1198 REAGAN, K. L. & SYKES, J. E. 2019. Diagnosis of Canine Leptospirosis. *Vet Clin*
1199 *North Am Small Anim Pract*, 49, 719-731.
- 1200 ROSA, M. I., REIS, M. F. D., SIMON, C., DONDOSSOLA, E., ALEXANDRE, M. C.,
1201 COLONETTI, T. & MELLER, F. O. 2017. IgM ELISA for leptospirosis
1202 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet*, 22,
1203 4001-4012.
- 1204 ROSSINI, A. D., TEIXEIRA, A. F., SOUZA FILHO, A., SOUZA, G. O.,
1205 VASCONCELLOS, S. A., HEINEMANN, M. B., ROMERO, E. C. &
1206 NASCIMENTO, A. 2019. Identification of a novel protein in the genome
1207 sequences of *Leptospira* interrogans with the ability to interact with host's
1208 components. *J Microbiol Immunol Infect*.
- 1209 SATHIYAMOORTHY, A., SELVARAJU, G., PALANIVEL, K. M. & SRINIVASAN, A. P.
1210 2017. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for
1211 diagnosis of canine leptospirosis. *Vet World*, 10, 530-535.
- 1212 SCHULLER, S., ARENT, Z. J., GILMORE, C. & NALLY, J. 2015. Prevalence of
1213 antileptospiral serum antibodies in dogs in Ireland. *Vet Rec*, 177, 126.
- 1214 SEA-LIANG, N., SEREEMASPUN, A., PATARAKUL, K., GAYWEE, J.,
1215 RODKVAMTOOK, W., SRISAWAT, N., WACHARAPLUSADEE, S. &
1216 HEMACHUDHA, T. 2019. Development of multiplex PCR for neglected
1217 infectious diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 13, e0007440.

- 1218 SILVA, M. V., CAMARGO, E. D., BATISTA, L., VAZ, A. J., BRANDAO, A. P.,
1219 NAKAMURA, P. M. & NEGRAO, J. M. 1995. Behaviour of specific IgM, IgG
1220 and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the
1221 disease and during convalescence. *J Trop Med Hyg*, 98, 268-72.
- 1222 SMYTHE, L. D., WUTHIEKANUN, V., CHIERAKUL, W., SUPUTTAMONGKOL, Y.,
1223 TIENGRIM, S., DOHNT, M. F., SYMONDS, M. L., SLACK, A. T.,
1224 APIWATTANAPORN, A., CHUEASUWANCHAI, S., DAY, N. P. & PEACOCK,
1225 S. J. 2009. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor
1226 of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 695-7.
- 1227 SONTHEYANON, P., CHIERAKUL, W., WUTHIEKANUN, V., THAIPADUNGPANIT,
1228 J., KALAMBAHETI, T., BOONSILP, S., AMORNCHAI, P., SMYTHE, L. D.,
1229 LIMMATHUROTSAKUL, D., DAY, N. P. & PEACOCK, S. J. 2011. Accuracy of
1230 loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in
1231 Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 84, 614-20.
- 1232 SUBATHRA, M., SENTHILKUMAR, T. M. & RAMADASS, P. 2013. Recombinant
1233 OmpL1 protein as a diagnostic antigen for the detection of canine
1234 leptospirosis. *Appl Biochem Biotechnol*, 169, 431-7.
- 1235 SUBATHRA, M., SENTHILKUMAR, T. M., RAMADASS, P. & DHINAKAR RAJ, G.
1236 2011. Development of rapid flow-through-based dot-immunoassay for
1237 serodiagnosis of leptospirosis in dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34,
1238 17-22.
- 1239 THIBEAUX, R., GIRAULT, D., BIERQUE, E., SOUPE-GILBERT, M. E., RETTINGER,
1240 A., DOUYERE, A., MEYER, M., IRAOLA, G., PICARDEAU, M. & GOARANT,
1241 C. 2018. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and
1242 Revisiting the Diagnosis. *Front Microbiol*, 9, 816.
- 1243 TOMA, C., KOIZUMI, N., KAKITA, T., YAMAGUCHI, T., HERMAWAN, I., HIGA, N. &
1244 YAMASHIRO, T. 2018. Leptospiral 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase as an
1245 early urinary biomarker of leptospirosis. *Heliyon*, 4, e00616.
- 1246 TOMA, C., OKURA, N., TAKAYAMA, C. & SUZUKI, T. 2011. Characteristic features
1247 of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell*
1248 *Microbiol*, 13, 1783-92.
- 1249 TROIA, R., BALBONI, A., ZAMAGNI, S., FRIGO, S., MAGNA, L., PERISSINOTTO,
1250 L., BATTILANI, M. & DONDI, F. 2018. Prospective evaluation of rapid point-of-
1251 care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Vet J*, 237, 37-42.
- 1252 TRUEBA, G., ZAPATA, S., MADRID, K., CULLEN, P. & HAAKE, D. 2004. Cell
1253 aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water.
1254 *Int Microbiol*, 7, 35-40.
- 1255 TUBALINAL, G. A. S., BALBIN, M. M., VILLANUEVA, M. A., DOMINGO, C. Y. J. &
1256 MINGALA, C. N. 2018. Evaluation of LAMP for detection and/or screening of
1257 *Leptospira* spp. infection among domestic animals in the Philippines. *J Adv*
1258 *Vet Anim Res*, 5, 459-465.
- 1259 VERNEL-PAUILLAC, F. & WERTS, C. 2018. Recent findings related to immune
1260 responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection.
1261 *Microbes Infect*.
- 1262 VINCENT, A. T., SCHIETTEKATTE, O., GOARANT, C., NEELA, V. K., BERNET, E.,
1263 THIBEAUX, R., ISMAIL, N., MOHD KHALID, M. K. N., AMRAN, F.,
1264 MASUZAWA, T., NAKAO, R., AMARA KORBA, A., BOURHY, P., VEYRIER,
1265 F. J. & PICARDEAU, M. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of
1266 pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS*
1267 *Negl Trop Dis*, 13, e0007270.

- 1268 VK, C., TY, L., WF, L., YWY, W. S., AN, S., S, Z. & A, M. 2018. Leptospirosis in
1269 human: Biomarkers in host immune responses. *Microbiol Res*, 207, 108-115.
- 1270 WAGGONER, J. J. & PINSKY, B. A. 2016. Molecular diagnostics for human
1271 leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 29, 440-5.
- 1272 WERTS, C., TAPPING, R. I., MATHISON, J. C., CHUANG, T.-H., KRAVCHENKO,
1273 V., SAINT, G. I., HAAKE, D. A., GODOWSKI, P. J., HAYASHI, F., OZINSKY,
1274 A., UNDERHILL, D. M., KIRSCHNING, C. J., WAGNER, H., ADEREM, A.,
1275 TOBIAS, P. S. & ULEVITCH, R. J. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide
1276 activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology*, 2,
1277 346-352.
- 1278 WHITE, A. M., ZAMBRANA-TORRELIO, C., ALLEN, T., ROSTAL, M. K., WRIGHT,
1279 A. K., BALL, E. C., DASZAK, P. & KARESH, W. B. 2017. Hotspots of canine
1280 leptospirosis in the United States of America. *Vet J*, 222, 29-35.
- 1281 WILSON, H., BOVENS, C. & MURPHY, K. 2015. Increase in canine leptospirosis
1282 cases. *Vet Rec*, 176, 235.
- 1283 WUNDER, E. A., JR., FIGUEIRA, C. P., BENAROUDJ, N., HU, B., TONG, B. A.,
1284 TRAJTENBERG, F., LIU, J., REIS, M. G., CHARON, N. W., BUSCHIAZZO,
1285 A., PICARDEAU, M. & KO, A. I. 2016. A novel flagellar sheath protein, FcpA,
1286 determines filament coiling, translational motility and virulence for the
1287 *Leptospira* spirochete. *Mol Microbiol*, 101, 457-70.
- 1288 WUTHIEKANUN, V., CHIERAKUL, W., LIMMATHUROTSAKUL, D., SMYTHE, L. D.,
1289 SYMONDS, M. L., DOHNT, M. F., SLACK, A. T., LIMPAIBOON, R.,
1290 SUPUTTAMONGKOL, Y., WHITE, N. J., DAY, N. P. & PEACOCK, S. J. 2007.
1291 Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J Clin*
1292 *Microbiol*, 45, 1363-5.
- 1293 ZUERNER, R. L. 2015. Host response to leptospira infection. *Curr Top Microbiol*
1294 *Immunol*, 387, 223-50.
- 1295