FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JANDRA PACHECO DOS SANTOS

DETECÇÃO DE PEPTÍDEOS DE PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* E SUA UTILIZAÇÃO NA GERAÇÃO DE ANTICORPOS E EM PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

UBERLÂNDIA

2019

JANDRA PACHECO DOS SANTOS

DETECÇÃO DE PEPTÍDEOS DE PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* E SUA UTILIZAÇÃO NA GERAÇÃO DE ANTICORPOS E EM PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima.

UBERLÂNDIA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237d 2019

Santos, Jandra Pacheco dos, 1979
Detecção de peptídeos de proteína hipotética de *Leptospira interrogans* e sua utilização na geração de anticorpos e em plataforma de diagnóstico sorológico [recurso eletrônico] / Jandra Pacheco dos Santos. - 2019.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1254 Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Leptospirose. 3. Bovinos - Doenças. 4. Bioinformática. I. Lima, Anna Monteiro Correia, 1973, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

DETECÇÃO DE PEPTÍDEOS DE PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* E SUA UTILIZAÇÃO NA GERAÇÃO DE ANTICORPOS E EM PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 12 de Março de 2019.

_____

Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima (Orientadora) – FAMEV/UFU

_____

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi – FAMEV/UFU

_____

Profa. Dra. Ana Laura Grazziotin – FAMEV-UFU

_____

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues – IBTEC/UFU

_____

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara – ICB/UFMG

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JANDRA PACHECO DOS SANTOS - Nascida em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, em 05 de dezembro de 1979, filha de José dos Santos e Sandra Pacheco Silva dos Santos. Médica Veterinária, graduada em agosto de 2003 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Em 2005 iniciou o mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal. Em 2014 iniciou o doutorado na mesma instituição. Foi Médica Veterinária responsável pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário de Uberaba (HVU) de 2007-2014. Foi professora no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba (UNIUBE) de 2010-2018. Tem experiência nas seguintes áreas: medicina veterinária preventiva; doenças infecciosas e microbiologia veterinária.

Ao meu esposo, Álvaro Ferreira Júnior, companheiro de todos os momentos, inclusive os de incerteza, comuns a quem tenta se aventurar por novos caminhos. Obrigada por não medir esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida.

Dedico.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

O saber se aprende com mestres e livros.
A Sabedoria, com o corriqueiro, com a vida e com os humildes.

O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada.
Caminhando e semeando, sempre se terá o que colher."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não teria se tornado uma realidade, e aos quais serei sempre grata.

A Deus, por ter me proporcionado uma vida, família e amigos maravilhosos.

Aos meus pais, José dos Santos e Sandra Pacheco Silva dos Santos e às minhas irmãs, Candice LaMeyer e Mariane Pacheco dos Santos Lourencetti. A união e o amor da nossa família são os meus tesouros mais preciosos.

Um agradecimento especial às minhas sobrinhas, Sofia Victoria LaMeyer, Maria Fernanda Pacheco Lourencetti e Olivia Alice LaMeyer, três lindas flores que chegaram neste mundo para encher de cor e felicidade os jardins dos nossos corações.

Agradeço também aos meus *brothers in law*, Matthew LaMeyer e Fábio Lourencetti. Obrigada por todos os momentos de muitas alegrias juntos.

À professora Doutora Anna Monteiro Correia Lima, pela sua orientação, apoio, disponibilidade, palavras de incentivo e colaboração no solucionar de problemas que foram surgindo ao longo da realização desse trabalho. Obrigada por acreditar em mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro e tecnológico para realização desta pesquisa. À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), pela oportunidade de realizar este estudo. Ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC), por me receber e fornecer material necessário para a conclusão desta pesquisa. A todos os técnicos, residentes e colegas do laboratório, pela convivência cordial.

Ao aluno do curso de graduação em Medicina Veterinária da UFU, Fellipe Souza Pereira, pela disponibilidade e ajuda na padronização dos testes sorológicos.

À Universidade de Uberaba (UNIUBE), em especial ao diretor do curso de Medicina Veterinária, professor Doutor Eustáquio Rezende Bittar, por ter flexibilizado o meu horário de aulas na graduação e tornado possível a realização das disciplinas do programa de doutorado.

Ao Hospital Veterinário de Uberaba (HVU), por disponibilizar espaço físico para que parte do projeto fosse realizado. Às colegas veterinárias Antonieta Gomes e Maritssa Afonso, por abrirem as portas dos Laboratórios do HVU sempre que foi necessário.

Às queridas alunas do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIUBE, Graziela de Paula, Sofia Prata Fernandes, Thamires Vitor de Melo e Vanessa Leal, pela ajuda com a alimentação dos animais, limpeza das gaiolas e coleta dos ovos.

Ao professor Doutor Ricardo Toshio Fujiwara, à professora Doutora Daniella Batholomeu e ao doutorando Guilherme Pinheiro, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela contribuição nas seleção dos peptídeos das proteínas de *Leptospira interrogans* e orientação para realização dos testes sorológicos. Agradeço a atenção e a disponibilidade em ajudar sempre que solicitados.

À Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), por disponibilizar laboratórios para que a extração de anticorpos, técnica de imunofluorescência e parte das análises sorológicas do experimento fossem realizadas. Aos técnicos dos laboratórios do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia Animal dessa instituição, e também aos alunos do curso de graduação em Medicina Veterinária, Guilherme Teles e Ellainy Maria Conceição, pela ajuda com essas análises.

Ao professor Doutor Siomar Castro Soares da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e seus co-orientados de doutorado Letícia de Castro Oliveira e Arun Jaiswal, pela realização das análises computacionais com ferramentas de bioinformática e contribuições no capítulo de vacinologia reversa. Agradeço o empenho e dedicação na realização das análises.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho, por suas contribuições a ciência.

Às minhas amigas Camila Cristina da Silva, Moabe Borges Salomão e Tatiana Sandoval Shimizu pela grande amizade e compreensão nas minhas muitas ausências. Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, e que, por uma falha da minha memória, aqui não foram citados.

RESUMO

As leptospiras patogênicas são reconhecidas como agentes responsáveis pela leptospirose, uma doença infectocontagiosa, reemergente e uma das zoonoses de maior ocorrência em todo o mundo, principalmente em países com clima tropical, como o Brasil. No primeiro capítulo dessa Tese, foram apresentadas as considerações gerais sobre a bactéria e o uso de ferramentas de bioinformática e anticorpos IgY contra leptospirose. No segundo capítulo os objetivos foram a identificação *in silico* de alvos com potencial para aplicação no diagnóstico de leptospirose e também no desenvolvimento de vacinas. Foram comparados 80 genomas de *Leptospira* usando *Leptospira interrogans* sorovar Lai como referência. Foram detectados 1096 genes não homólogos a hospedeiros de *Leptospira*, dos quais foram preditas 212 proteínas putativas expostas na membrana e 87 antígenos secretados. Foram identificadas 37 proteínas como candidatas promissoras para a produção de tecnologias para diagnóstico e desenvolvimento de vacinas. Entre a proteínas de interesse preditas, 43,2% (16/37) ainda não possuem descrição de agrupamento em superfamílias ou famílias de proteínas. No terceiro capítulo, foi avaliado o desenvolvimento de anticorpos policlonais IgY e IgG a partir da inoculação de galinhas e coelhos, respectivamente, com epítopos quimicamente sintetizados e preditos a partir de uma proteína hipotética de *L. interrogans.* Foram selecionados três epítopos de células B (P127, P128 e P129). Foram obtidos 8,05 ± 0,55 mg/mL de anticorpos IgY totais extraídos da gema. Na padronização de plataforma de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), o peptídeo com maior indução de resposta humoral foi o P127. O título máximo obtido para IgY sérica e da gema foi 1.600 e 200, respectivamente, e para os coelhos 800. Na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) os anticorpos IgY (1:50) reconheceram as *Leptospira*. Nessa pesquisa, os peptídeos sintéticos de *L. interrogans* induziram a produção de anticorpos IgY específicos e mostraram-se promissores para a sua utilização em plataformas ELISA e RIFI destinadas ao estudo da leptospirose. No quarto capítulo, o objetivo foi a padronização de uma plataforma ELISA com o uso dos peptídeos sintéticos ($ELISA_{Peptídeo}$) de *L. interrogans* (P127, P128 e P129) para o diagnóstico da leptospirose bovina. P127 demonstrou a melhor reatividade na otimização e foi selecionado para os testes de padronização utilizando soros bovinos de dois rebanhos (RB1, n=80; RB2, n=100). A sensibilidade e a especificidade relativas (ELISA *versus* MAT), para RB1 e RB2 foram 85% - 93% e 78% - 80%, respectivamente. Os índices *Kappa* para RB1 e RB2 foram 78% (bom) e 58% (regular), respectivamente. Neste estudo, os peptídeos sintéticos de proteína hipotética de *L. interrogans* foram reconhecidos por anticorpos IgG séricos de bovinos naturalmente expostos à bactéria. Os epítopos de proteínas hipotéticas de *L. interrogans* preditos por meio de imunoinformática são promissores para o desenvolvimento de biológicos específicos, plataformas ELISA e RIFI, e são reconhecidos por anticorpos de infecção natural.

Palavras-chave: Anticorpos aviários; bioinformática; bovinos, diagnóstico indireto; ELISA, leptospirose.

ABSTRACT

Pathogenic leptospiras are recognized as causative agents of leptospirosis, a re-emergent infectious disease and one of the most prevalent zoonosis worldwide, especially in tropical climates, such as Brazil. In the first chapter of this thesis, general considerations about the bacteria and the use of bioinformatics tools and IgY antibodies against leptospirosis were presented. In the second chapter, the aim was to identify *in silico* protein targets with potential application in the diagnosis of leptospirosis and development of vaccines, using reverse vaccinology techniques. We compared 80 strains of *Leptospira interrogans* using *Leptospira interrogans* serovar Lai as the reference genome. A total of 1096 conserved proteins absent in the hosts were identified, including 212 gene products predicted as putative surface-exposed proteins and 87 secreted proteins. We identified 37 proteins as promising candidates for the production of vaccines and as diagnostic markers. Sixteen of these proteins (43.2%) do not have a predicted family or domain by the InterProScan program. In the third chapter, we evaluated the development of IgY and IgG polyclonal antibodies from the inoculation of chickens and rabbits, respectively, with epitopes chemically synthesized and predicted from the hypothetical protein (AAN50190.1) of *Leptospira interrogans*. Three B cell epitopes (P127, P128 and P129) were selected. A total of 8.05 ± 0.55 mg / mL of total IgY antibodies extracted from the yolk were obtained. In the standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the peptide with the highest humoral response induction was P127. The maximum titre obtained for yolk and serum IgY was 1,600 and 200, respectively, and for rabbits 800. In the indirect immunofluorescence (IFT) reaction, IgY antibodies (1:50) recognized leptospiras. In this study, the synthetic peptides of *L. interrogans* induced the production of specific IgY antibodies and were shown to be promising for use in ELISA and IFT platforms for the study of leptospirosis. In the fourth chapter, the aim was the standardization of an ELISA platform using synthetic peptides ($ELISA_{peptide}$) of *L. interrogans* (P127, P128 and P129) for the diagnosis of bovine leptospirosis. P127 showed the best reactivity during the optimization and was selected for the standardization tests using bovine serum panels from two herds (RB1, n = 80, RB2, n = 100). The relative sensitivity and specificity (ELISA versus MAT) for RB1 and RB2 were 85% - 93% and 78% - 80%, respectively. The *Kappa* index for RB1 and RB2 were 78% (good) and 58% (regular), respectively. In this study, the synthetic peptides of the hypothetical protein of *L. interrogans* were recognized by serum IgG antibodies from bovines naturally exposed to the bacterium. The epitopes of *L. interrogans* hypothetical proteins predicted by immunoinformatic are promising for the development of specific biologicals, ELISA and IFT platforms, and are recognized by natural infection antibodies.

Keywords: Avian antibodies, bioinformatic, bovine, indirect diagnostic, ELISA, leptospirosis.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Hospedeiros de manutenção dos principais sorovares de leptospiras. Adaptado de Bharti *et al*., 2003. 27

Tabela 2. Soroprevalência da leptospirose bovina, avaliada nos últimos 12 anos, em rebanhos bovinos de diferentes Estados do Brasil, com o *Microscopic Agglutination Test* (MAT). 41

Tabela 3. Testes ELISA para diagnóstico da leptospirose desenvolvidos a partir de diferentes antígenos. 48

CAPÍTULO 2

Table 1. Genomic features of all *Leptospira interrogans* strains. 113

Table 2. Subcellular location of *Leptospira interrogans* strain proteins. 116

Table 3. Antigenic proteins of *Leptospira interrogans* identified using software Vaxign. 117

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Descrição do número de animais, inóculos e identificação utilizada no texto para as galinhas e os coelhos utilizados no estudo. 143

Tabela 2. Concentração ótima de reagentes utilizados no teste ELISA indireto para detecção de anticorpos IgY da gema e amostras de soro de galinhas e IgG nas amostras de soro de coelhos inoculados com peptídeos. 144

Tabela 3. Identificação dos peptídeos selecionados pelo programa BepiPred, sequência de aminoácidos, localização na proteína, índice de imunogenicidade e número de acesso da proteína hipotética de *Leptospira interrogans* sorovar Lai. 145

Tabela 4. Lista com a identificação de peptídeos sintetizados e utilizados para testes $ELISA_{Peptídeo}$, sequência de aminoácidos e sua localização na proteína. 146

Tabela 5. Índice Avidez para IgG e IgY de animais inoculados com o peptídeo 127 após o tratamento com ureia 6M ou PBS 0,01M. 147

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Descrição das categorias de bovinos, número de animais utilizados no estudo, identificação das amostras (ID), comentários relevantes e aplicação no ELISA$_{Peptídeo}$. 168

Tabela 2. Identificação dos peptídeos selecionados pelo programa BepiPred, sequência de aminoácidos, localização na proteína, índice de imunogenicidade e número de acesso da proteína hipotética de *Leptospira interrogans* sorovar Lai. 169

Tabela 3. Descrição da identificação dos peptídeos sintetizados e utilizados para o teste ELISA$_{Peptídeo}$, sequência de aminoácidos e sua localização na proteína hipotética. 170

Tabela 4. Valores de média, desvio padrão e *cut-off* das amostras de soro de bezerros recém-nascidos (RN, n=12) e de bovinos jovens não reagentes no MAT (SN, n=12) de acordo com a otimização do ELISA$_{Peptídeo}$. 171

Tabela 5. Coeficiente de variação (CV) intraplaca e interplaca utilizando amostras de soro de bovinos reagentes (SR=12) no MAT (título ≥ 800) de acordo com a otimização do ELISA$_{Peptídeo}$ utilizando P127. 172

Tabela 6. Descrição da sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os rebanhos RB1 e RB2 de acordo com o ELISA$_{Peptídeo}$ utilizando P127. 173

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Foto de micrografia eletrônica de leptospiras adaptada de Picardeau, 2013. São bactérias finas e helicoidais com diâmetro de 0,15 a 0,30 µm e comprimento variando de 6 a 20 µm. 25

Figura 2. Dendrograma adaptado de Thibeaux *et al*., 2018 baseado na comparação de espectro de massa MALDI-ToF de 35 espécies de leptospiras divididas em três clados. Novas espécies identificadas em 2018 estão em negrito. 28

Figura 3. Ciclo da infecção por leptospiras adaptado de Ko *et al*., 2009. Os mamíferos excretam a bactéria para o ambiente e são considerados fontes de infecção. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais. 31

CAPÍTULO 2

Figure 1. Experimental design summarizing the results obtained by means of in silico methodology in the prediction of candidate genes for use in diagnostic technologies or with potential for biological generation, with a view to the production of vaccines. 112

CAPÍTULO 3

Figura 1. **Obtenção da fração enriquecida em anticorpos IgY (P2).** A gemas dos ovos obtidos de galinhas experimentalmente inoculadas com os peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* foram armazenadas a -20°C (A). Separação da fração solúvel em água (S1) do precipitado rico em lipídeos (P1), após a incubação com água acidificada (pH 5.0-5.2) (B). Produto da precipitação do sobrenadante (S1) com sulfato de sódio 19%, o pellet (P2) representa a fração enriquecida em anticorpos IgY e o sobrenadante (S2) contém os contaminantes (C). 136

Figura 2. **Eletroforese em gel de poliacrilamida e Dot-Blot da fração P2 da extração de IgY da gema do ovo.** (A) SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, da fração P2 da gema do ovo de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans.* MW – *molecular weigth;* kDa – kilodalton; HC – *heavy chain;* LC – *Ligth chain.* Coloração com Coomassie Blue 250R. Análise – Software LabImage 1D L360. (B) Dot Blot da fração P2. BSA – *Bovine Serum Albumin.* 137

Figura 3. ***Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto para a cinética dos anticorpos IgY na fração P2 da gema dos ovos de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund.** Ga1, Ga2 e Controle: galinhas inocludas com P127 (A), P128(B) ou P129 (C) e BSA, respectivamente. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**) e P<0,001 (***) 138

Figura 4. ***Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto para a titulação dos anticorpos IgY na fração P2 da gema dos ovos de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund.** P127, P128 e P129: peptídeos sintéticos. Ga1, Ga2 e Pool: galinhas mais reativas aos peptídeos isoladamente ou inoculados na forma 139

de pool. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**); P<0,001 (***).

Figura 5. ***Enzyme-linked immunosorbent assay*** **(ELISA) indireto para a titulação dos anticorpos IgY séricos de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund. Ga1, Ga2: duplicata de galinhas inoculadas com peptídeos individuais.** Pool: galinhas inoculadas com os três peptídeos; Controle: galinha inoculada com BSA. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**); P<0,001 (***) entre $P127_{Ga1}$ e $P128_{Ga2}$; $P127_{Ga1}$ e $P129_{Ga1}$. 140

Figura 6. ***Enzyme-linked immunosorbent assay*** **(ELISA) indireto para a titulação dos anticorpos IgG séricos de coelhos inoculados com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund.** Pool: coelhos inoculados com os três peptídeos; Controle: coelho inoculado com BSA. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**). 141

Figura 7. **Imunofluorescência indireta para IgY anti-peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae.** (A) albumina sérica bovina 3%; (B) $IgY_{(-)}$ - 1:50; (C) $IgY_{(+)}$ - 1:50. α-IgY-FITC: anti-IgY marcado com isotiocianato de fluoresceína (1:320). 142

CAPÍTULO 4

Figura 1. **Densidade óptica de amostras de soro de bovinos reagentes (SR) no *Microscopic Agglutination Test* na execução da otimização do $ELISA_{Peptídeo}$.** Plot da DO média dos bovinos SR (n=12) para P127, P128 e P129. Linhas pontilhadas: superior – DO dos não reagentes mais três desvios padrão (3DP); inferior – DO dos não reagentes mais dois desvios padrão (2DP). DO > 3DP = reagente; DO < 2DP = não reagente; 2DP≤DO≥3DP = intermediária. 164

Figura 2. **Comparação da média da densidade óptica de bovinos reagentes (SR) e não reagentes (NR) no MAT de acordo com a otimização do $ELISA_{Peptídeo}$.** Análise em box plot de SR (n=12) e NR (n=12), para P127, P128 e P129. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. 165

Figura 3 . **Densidade óptica de bovinos dos rebanhos RB1 e RB2 reagentes no MAT (MAT_{+}) e não reagentes (MAT_{-}) de acordo com a padronização do $ELISA_{Peptídeo}$.** Plot da DO média dos bovinos RB1 (MAT_{+} =40 e MAT_{-} =40) e RB2 (MAT_{+} =50 e MAT_{-} =50) para P127, P128 e P129. Linhas pontilhadas: superior – DO dos não reagentes mais três 166

desvios padrão (3DP); inferior – DO dos não reagentes mais dois desvios padrão (2DP). DO > 3DP = reagente; DO < 2DP = não reagente; 2DP≤DO≥3DP = intermediária.

Figura 4. **Comparação da média da densidade óptica dos bovinos de RB1 e RB2 de acordo com a padronização do ELISA$_{Peptídeo}$.** Análise em box plot de RB1$_{MAT+}$ (n=40), RB1$_{MAT-}$ (n=40), RB2$_{MAT+}$ (n=50) e RB2$_{MAT-}$ (n=50) para P127, P128 e P129. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. 167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma

µl: Microlitro

ACF: Adjuvante completo de Freund

AIF: Adjuvante incompleto de Freund

C3b: Componente 3b do Complemento

C4b: Componente 4b do Complemento

C5: Componente 5 do Complemento

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ECVAM: *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELISAi: Indirect *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMJH: *Ellinghausen McCullough Medium*

Fc: Fragmento cristalisável

FHL1: Proteína fator H *like*-1

Hap1: Human huntingtin-associated *protein*

IFN-y: *Interferon-y*

IgA: Imunoglobulina A

IgD: Imunoglobulina D

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IgY: Imunoglobulina Y

Kb: Kilobase

Kg: Kilograma

Len: *Leptospiral endostatin like*

Lig: *Leptospiral immunoglobulin-like*

LipL21: *Leptospiral lipoprotein 21*

LipL32: *Leptospiral lipoprotein 32*

LipL41: *Leptospiral lipoprotein 41*

LPS: lipopolissacarídeo

Lsa: *Leptospiral surface adhesin*

MALDI-ToF: *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*

MAT: *Microagglutination test*

Mbp: milhões de pares de base

MEC: Matriz extracelular

mg: Miligrama

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

ml: Mililitros

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

^{o}C: Grau Celsius

OIE: Organização Mundial da Saúde Animal

Omp: *Outer Membrane Protein*

ORF: *Open Reading Frame*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PEG: Polietilenoglicol

pH: Potencial hidrogeniônico

PHs: Proteínas hipotéticas

rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

CD: *Cluster of Differentiation*

TLR: Receptor *toll-like*

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TRAIL: *Related apoptosis-inducing ligand*

UI: Unidades Internacionais

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats

VPN: Valor Preditivo Negativo

VPP: Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 19

1 INTRODUÇÃO 20

2 OBJETIVOS 23

2.1 Objetivo Geral 23

2.2 Objetivos Específicos 23

3 REVISÃO DE LITERATURA 24

3.1 O agente etiológico e a doença 24

3.1.1 Aspectos microbiológicos 24

3.1.2 Taxonomia 25

3.1.3 Fontes de infecção e transmissão 29

3.1.4 Determinantes moleculares e sua participação na patogenicidade 32

3.1.5 Manifestações clínicas nos animais 36

3.1.6 Epidemiologia da leptospirose bovina no Brasil 39

3.1.7 Diagnóstico da leptospirose em animais 42

3.1.8 Uso de antimicrobianos para tratamento em animais 51

3.1.9 Vacina convencionais disponíveis para animais 52

3.2. Identificação *in silico* de proteínas candidatas a vacina e diagnóstico da leptospirose 53

3.2.1. Genomas de *Leptospira* disponíveis para estudos na área de bioinformática 53

3.2.2 O processo da vacinologia reversa 53

3.2.3 Imunobioinformática 55

3.2.4 Estudos de pan genômica e genômica comparativa/subtrativa em leptospiras 57

3.2.5 Proteínas hipotéticas (PHs) antigênicas com potencial para uso no diagnóstico da leptospirose 57

3.3 Produção de anticorpos em modelo aviário 59

3.3.1 Características gerais dos anticorpos IgY 59

3.3.2 Características dos antígenos e sua aplicação 60

3.3.3. Purificação e caracterização dos anticorpos 61

3.3.4. Aplicação dos anticorpos policlonais 61

REFERÊNCIAS 63

CAPÍTULO 2 – Reverse vaccinology against *Leptospira*: *In silico* identification of potential candidates for antigens and vaccine targets 93

CAPÍTULO 3 – Utilização de peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* na produção e caracterização de anticorpos IgY e IgG policlonais 122

CAPÍTULO 4 – Diagnóstico sorológico da leptospirose bovina utilizando peptídeo sintético de proteína hipotética de *Leptospira interrogans* 151

CONSIDERAÇÕES FINAIS 177

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

As espiroquetas são bactérias que tendem a se deslocar com movimentos ondulantes semelhantes ao de uma hélice, com características de membrana externa únicas no universo bacteriano (HAAKE, 2000; PICARDEAU, 2013). Entre os seus representantes, destaca-se o gênero *Leptospira*, constituído por bactérias patogênicas ou saprófitas. As patogênicas são reconhecidas como agentes responsáveis pela leptospirose, uma doença infectocontagiosa, reemergente e uma das zoonoses de maior ocorrência em todo mundo, principalmente em países com regiões tropicais e subtropicais (BHARTI *et al.*, 2003).

Os humanos são hospedeiros acidentais dessa bactéria, em um ciclo com o envolvimento de animais domésticos e silvestres. Todos os mamíferos domésticos ou silvestres são suscetíveis à infecção por *Leptospira* Os roedores sinantrópicos estão entre os principais reservatórios de *Leptospira*, os quais excretam a bactéria na urina e, assim, contaminam as fontes de água tornando-as uma via de infecção para outros animais e, também, para os seres humanos (LEVETT, 2001).

A elevada capacidade de adaptação aos diferentes ambientes e, também, aos diversos hospedeiros, revela a complexidade da biologia da *Leptospira*. O conhecimento, mesmo que parcial, dos mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares da *Leptospira* trouxeram um pouco de esclarecimento a respeito da relação bactéria e hospedeiro (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). O sequenciamento do genoma completo de *L. interrogans* sorovar Lai e *L. interrogans* sorovar Copenhageni, nos anos 2000, acelerou a aquisição de informações importantes sobre o patógeno (REN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004b).

A interpretação e as inferências, a partir dos bancos de dados genômicos, têm sido facilitadas por meio das ferramentas de bioinformática e dos estudos de proteômica. A predição de proteínas *in silico*, com significativas sensibilidade e especificidade analíticas, e a síntese química de peptídeos trouxeram as vantagens de obtenção de alvos antigênicos sem a necessidade do cultivo *in vitro* e sem a limitação da quantidade obtida destes alvos a partir de estirpes cultivadas em laboratório (SETTE; RAPPUOLI, 2010).

Por meio de características conservadas nas sequências de aminoácidos, muitas lipoproteínas da superfície celular da *Leptospira* foram preditas como tendo a função de adesinas. Essas lipoproteínas são promissoras para esclarecimento dos

processos envolvidos na interação, colonização e evasão do sistema imune do hospedeiro (EVANGELISTA *et al.*, 2014). Além delas, proteínas anotadas como hipotéticas e de função desconhecida, foram descritas como polivalentes e estando associadas a processos que ajudam a bactéria a se estabelecer. Essas proteínas de leptospiras patogênicas tem surgido como alvos antigênicos promissores para o desenvolvimento e/ou inovação das plataformas de diagnóstico indireto e/ou direto da leptospirose em animais e humanos (FERNANDES *et al.*, 2016).

De acordo com a OIE (World Organisation for Animal Health), o teste de referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose é o teste de microaglutinação (em inglês *microscopic agglutination test*, MAT). Trata-se de uma técnica com elevada especificidade e sensibilidade diagnósticas, a qual detecta anticorpos aglutinantes, das classes IgM ou IgG, no soro de animais infectados, vacinados ou convalescentes (PICARDEAU, 2013). As limitações do MAT incluem a não diferenciação de anticorpos vacinais, a necessidade de manutenção de bactérias vivas, a utilização de um painel de estirpes o qual pode não contemplar todos os sorovares de uma região e a dificuldade para padronização dos procedimentos operacionais do teste (FAINE, 1999).

Uma alternativa ao MAT é o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), o qual já foi desenvolvido para o diagnóstico de leptospirose humana, canina e bovina (DENEKE *et al.*, 2014; CHANDY *et al.*, 2017; SATHIYAMOORTHY *et al.*, 2017). Os antígenos empregados nessas plataformas ELISA incluem o lipopolissacarídeo de *Leptospira*, a fração proteica extraída de bactérias cultivadas *in vitro* e a versão recombinante de proteínas bacterianas. Entre as vantagens do ELISA estão as elevadas sensibilidades e especificidades em relação ao MAT, a economia de tempo e a redução dos gastos com reagentes (MARQUEZ *et al.*, 2017). A possibilidade da utilização de peptídeos sintéticos nas plataformas ELISA, para diagnóstico indireto de *Leptospira*, tem o potencial para eliminar a manutenção de bactérias para a obtenção de antígenos e de aumentar a especificidade do teste (AVIAT *et al.*, 2010; CHANDY *et al.*, 2017).

Entre as opções para a detecção da *Leptospira* nos tecidos de um animal infectado ou para a captura de antígenos bacterianos na urina dos hospedeiros estão as técnicas de imunofluorescência direta e o ELISA *sandwich*, respectivamente. Ambos utilizam anticorpos específicos contra os alvos antigênicos presentes no patógeno (MARQUEZ *et al.*, 2017). Uma alternativa sustentável e inovadora para a

geração de biológicos empregados nesses testes são os anticorpos IgY. Esses anticorpos são produzidos a partir de galinhas imunizadas com o alvo de interesse, e que, posteriormente, são purificados da gema do ovo (XU *et al.*, 2011).

Entre as vantagens do desenvolvimento do IgY estão a redução dos procedimentos dolorosos durante a produção destes anticorpos, a ausência de procedimentos invasivos no transcorrer da purificação, a sua semelhança funcional com o IgG dos mamíferos e a sua elevada concentração no purificado da gema (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Quanto aos benefícios analíticos o IgY não ativa o complemento e nem se liga ao receptor para Fc de mamíferos. Entre as limitações estão a dificuldade para separação da fração lipídica da gema e a grande variedade de protocolos de purificação o que, por conseguinte, se reflete nas oscilações das concentrações obtidas do anticorpo (SCHADE *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de peptídeos obtidos a partir de uma proteína hipotética de *Leptospira interrogans*, predita por meio de ferramentas de bioinformática, para geração de imunobiológicos e desenvolvimento de plataformas de diagnóstico.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Detectar proteínas de *Leptospira interrogans*, ainda não caracterizadas (hipotéticas), secretadas ou expostas na superfície da membrana externa da bactéria e potencialmente antigênicas;

2.2.2 Gerar imunoglobulinas Y (IgY) e IgG policlonais contra três sequências peptídicas (epítopos) sintéticas, preditas como as de maior imunogenicidade, em proteína hipotética de *Leptospira interrogans* (item 2.2.1). Avaliar a reatividade dos anticorpos produzidos contra os peptídeos em *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e caracterizá-los quanto a avidez e o título.

2.2.3 Desenvolver uma plataforma ELISA indireto para o diagnóstico de bovinos expostos a *Leptospira*, a partir de peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O agente etiológico e a doença

3.1.1 Aspectos microbiológicos

A leptospirose é causada por bactérias da ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Etiologicamente, o termo Leptospira deriva do grego leptós (delgado) e do latim “spira” (espiral), que originou o termo espiral delgada. O gênero *Leptospira* apresenta forma peculiar espiralada ou helicoidal (espiroquetas), flexível, com 0,1 µm a 0,30 µm de diâmetro por 6 a 20 µm de comprimento, com extremidades similares a pontos de interrogação, o que lhe conferiu a denominação *Leptospira interrogans* (Figura 1) (PICARDEAU, 2013; HAAKE; LEVETT, 2015).

A *Leptospira* exibe uma arquitetura de parede celular que se assemelha a de bactérias Gram negativas e Gram positivas. A estrutura de membrana dupla típica e a presença de lipopolissacarídeos (LPS) são características de bactérias Gram negativas, enquanto a íntima associação da membrana citoplasmática com o peptidoglicano é uma reminiscência da arquitetura de Gram positivas (LEVETT, 2001). A variabilidade do LPS determina os distintos sorovares (unidade taxonômica de identificação sorológica) e induz a produção de anticorpos por parte do hospedeiro (FAINE, 1999).

A motilidade é conferida pela presença de dois filamentos axiais (endoflagelos), inseridos em cada polo da bactéria e que se estendem para o interior do espaço periplasmático da célula sem sobreposição. Eles fazem a bactéria girar em torno do próprio eixo e executar movimentos de flexão e extensão. Vários quimiorreceptores estão também localizados nos pólos de células. Eles detectam diferentes substratos e adaptam a direção da rotação flagelar com base nas condições ambientais (PICARDEAU, 2017).

Em virtude dos altos teores lipídicos na membrana externa e da sua estrutura delgada, estas bactérias não se coram bem pela coloração de Gram, sendo necessárias para visualização destas espiroquetas colorações especiais a base de sais de prata. No entanto, opta-se mais frequentemente na rotina de diagnóstico bacteriológico por exames diretos em microscopia de campo escuro, bem como pela tentativa de isolamento por cultivo em meios especiais, seguido da tipificação dos isolados (PAES, 2016).

As bactérias do gênero *Leptospira* são aeróbicas e exigem vitaminas B1/B12 e ácidos graxos de cadeia longa como fontes de energia e carbono, fornecidos pela incorporação de soro de coelho ou fração V de soroalbumina bovina aos meios de cultura. O meio comercial mais utilizado na rotina atualmente é chamado Ellinghausen McCullough Medium (EMJH)(ZUERNER, 2005). As cepas patogênicas podem ser isoladas em temperatura entre 28º e 30º C e pH 7,2 a 7,6. Essas bactérias não resistem a ambientes secos, radiação solar direta, pH ácido e elevada salinidade (FAINE, 1999).

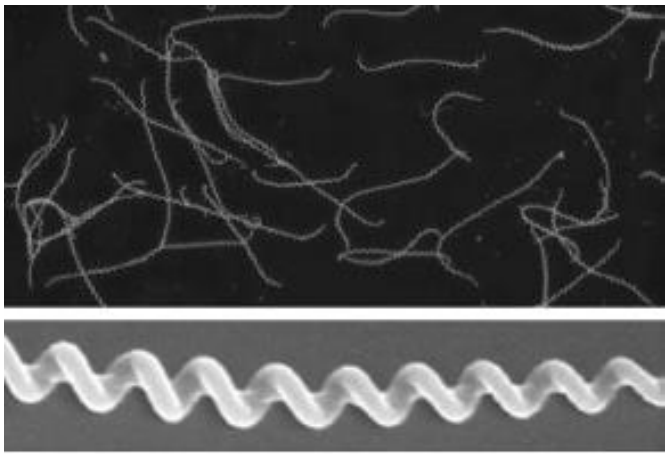


Figura 1 – Foto de micrografia eletrônica de *Leptospira* adaptada de PICARDEAU, 2013. São bactérias finas e helicoidais com diâmetro de 0,15 a 0,30 µm e comprimento variando de 6 a 20 µm.

3.1.2 Taxonomia

Em 1982, o Comitê de taxonomia do gênero *Leptospira* adotou como referência a divisão de *Leptospira* em dois grupos: as patogênicas, classificadas como *L. interrogans* e as saprófitas classificadas como *L. biflexa* (FAINE, STALLMAN, 1982). Com base na diferenciação dos antígenos de superfície das espécies de *Leptospira*, pode-se realizar a classificação antigênica, na qual o sorovar é a unidade taxonômica básica do gênero. Mais de 300 sorovares com antígenos comuns já foram reconhecidos e categorizados em sorogrupos (BULACH; ADLER, 2018). O sistema de nomenclatura do sorogrupo não tem posição taxonômica, mas é ainda mantido porque a determinação presuntiva do sorogrupo infectante por sorologia tem valor epidemiológico (HAAKE; LEVETT, 2015). Sorovares patogênicos de *Leptospira* geralmente têm preferência por hospedeiros específicos, considerados de manutenção (por exemplo, sorovar Hardjo e bovinos, sorovar Canicola e cães, sorovar

Icterohaemorrhagiae e roedores) (Tabela 1). Animais não adaptados a sorovares são denominados hospedeiros acidentais. No entanto, essas associações não são absolutas e a base molecular para essa preferência por hospedeiros é desconhecida (PICARDEAU, 2017).

O advento da taxonomia baseada em dados moleculares, mais racional e objetiva, trouxe mudanças nesse sistema de classificação. As análises de hibridização DNA-DNA e a análise filogenética do gene 16S rRNA dividiu o gênero *Leptospira* em três distintos clados (PICARDEAU, 2017). A associação das técnicas de sequenciamento do gene 16S rRNA, de espectrometria de massa por meio de MALDI-ToF e o sequenciamento genômico completo identificaram, até o momento desta revisão de literatura (março de 2019), 35 espécies de *Leptospira* divididas nos três clados: (i) as patogênicas com 13 espécies, as quais podem infectar e causar doença em humanos e animais; (ii) as intermediárias com 11 espécies que foram isoladas de humanos e animais e podem causar manifestações clínicas leves e (iii) as saprófitas com 11 espécies que não causam doença (Figura 2) (THIBEAUX *et al.*, 2018b). Estudos genômicos sugerem que existe heterogeneidade na virulência dentro do cluster das patogênicas. Esta característica é adquirida de forma independente em patogênicas e intermediárias, além disto, algumas espécies do cluster intermediárias tem sido frequentemente reconhecidas como causadoras de doenças (THIBEAUX *et al.*, 2018a).

Tabela 1 – Hospedeiros de manutenção dos principais sorovares de *Leptospira*. Adaptado de BHARTI *et al.*, 2003.

Hospedeiro de manutenção	Sorovares
Bovinos	Hardjo, Pomona
Cães	Canicola
Camundongos	Ballum, Arborea, Bim
Cavalos	Bratislava
Guaxinim	Grippotyphosa
Marsupiais	Grippotyphosa
Morcegos	Cynopteri, Wolffi
Ovelhas	Hardjo
Ratos	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Suínos	Pomona, Tarassovi

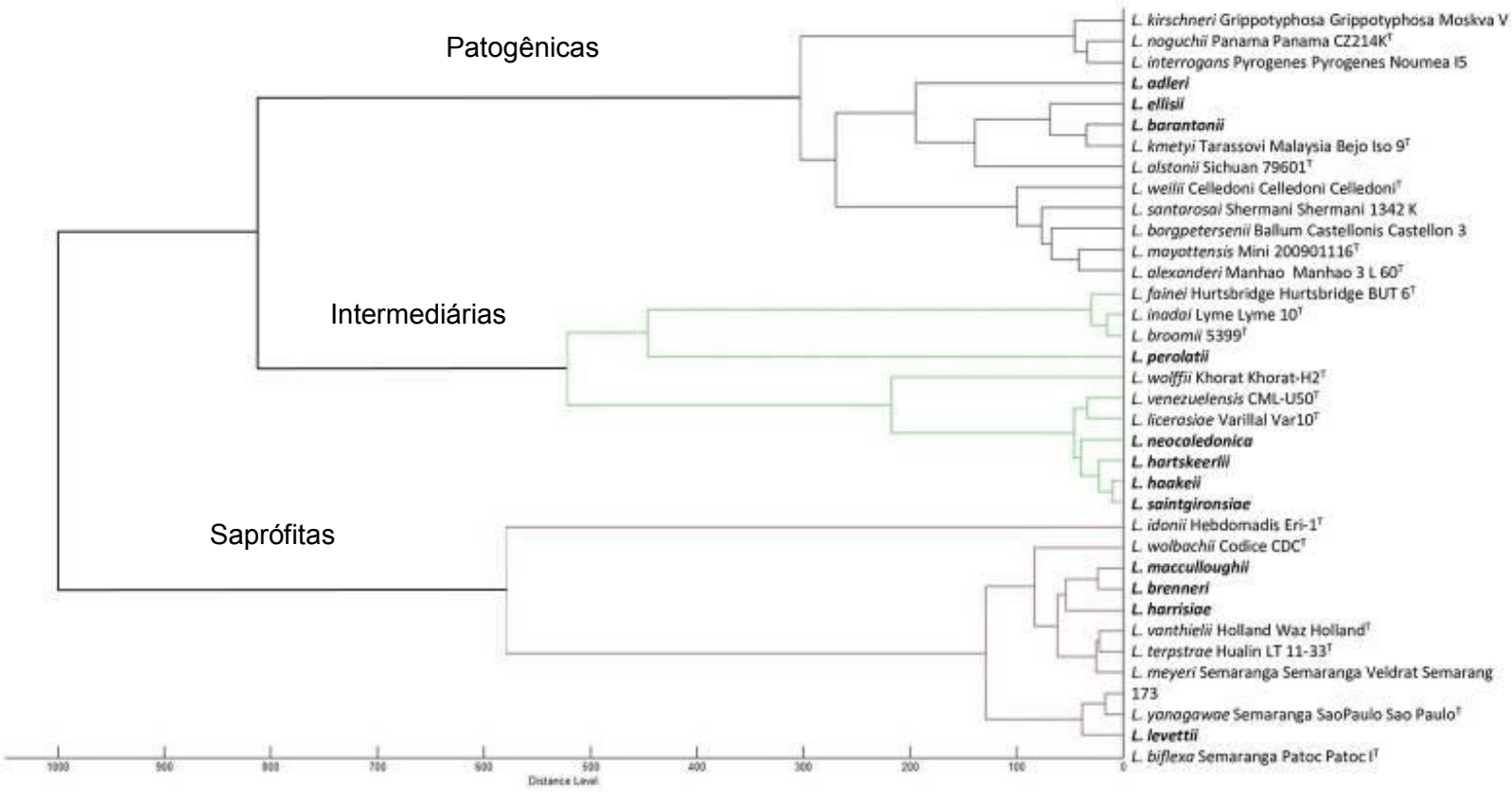


Figura 2 – Dendrograma adaptado de THIBEAUX *et al.*, 2018b baseado na comparação de espectro de massa MALDI-ToF de 35 espécies de *Leptospira* divididas em três clados. Novas espécies identificadas pelo autor supracitado estão em negrito.

3.1.3 Fontes de infecção e formas de transmissão

A leptospirose tem distribuição mundial, em áreas rurais e urbanas, devido à grande variedade de espécies animais, principalmente mamíferos, que podem se infectar. Os roedores são considerados mantenedores da transmissão enzoótica na maioria dos ambientes, pois podem excretar altas concentrações de *Leptospiras* (10^7 microrganismos por mL de urina), ao longo de meses após o início da infecção (EVANGELISTA; COBURN, 2010). Esse grupo de animais adaptados inclui não apenas ratos e camundongos, mas também ratazanas, ouriços e marsupiais, os quais podem servir como reservatórios de leptospirose (Figura 3) (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Alguns roedores, incluindo hamsters (*Mesocricetus auratus*) e porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*), são altamente susceptíveis à leptospirose e podem ser utilizados como modelos animais da leptospirose humana (GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017).

Uma ampla diversidade de mamíferos domésticos (p.ex: equinos, bovinos, caninos e suínos) ou selvagens (p.ex: quatis, veados, gambás, morcegos, capivaras, leões marinhos) podem carrear *Leptospira* nos túbulos renais e, portanto, podem excretar o patógeno no ambiente por meio da urina (NORMAN *et al.*, 2008; BESSA *et al.*, 2010; BARRAGAN *et al.*, 2017; FORNAZARI *et al.*, 2018; JAEGER; LOUREIRO; LILENBAUM, 2018). Os relatos de leptospirose em gatos domésticos são raros, porém a soroconversão e a eliminação da bactéria na urina já foram demonstradas (HARTMANN *et al.*, 2013).

A transmissão direta do microrganismo desempenha um papel mais importante para os hospedeiros não-humanos do que para os humanos. Em geral, ela ocorre por contato com urina e, ocasionalmente, com sangue e tecidos de animais infectados. Nos hospedeiros não-humanos, pode ocorrer transmissão venérea (pelo sêmen de machos infectados), via transplacentária ou, ainda, por ingestão de tecidos contaminados (carnivorismo) (VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; PAES, 2016). A transmissão indireta ocorre por meio da exposição prolongada à água, ao solo úmido ou aos alimentos contaminados com *Leptospira*. O risco de infecção aumenta quando os hospedeiros tem acesso a ambientes favoráveis à manutenção de *Leptospira*, como coleções de água com pouca movimentação encontradas em tanques, mananciais, rios ou lagos (MONAHAN; MILLER; NALLY, 2009; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Os surtos de leptospirose humana ocorrem durante a estação chuvosa, em cidades com saneamento básico precário, onde as enchentes aumentam o risco da transmissão indireta. A *Leptospira* atravessa a pele quando umedecida, sendo esta característica importante principalmente para a cadeia epidemiológica da leptospirose humana (LEVETT, 2001; PICARDEAU, 2013). Outras portas de entrada são as mucosas conjuntival, oral, nasofaríngea e genitourinária (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Os humanos são considerados como hospedeiros acidentais (não adaptados) e, apesar de eliminarem *Leptospira* (1,3 x 10^6/mL de urina), não apresentam um papel significativo na cadeia de transmissão (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; BARRAGAN *et al.*, 2016). Em áreas urbanas, onde predominam animais sinantrópicos e os cães, os casos humanos tem associação direta com o tamanho dessas populações e a prevalência da infecção. Nas áreas rurais, os bovinos são importantes carreadores renais de *Leptospira* com potencial zoonótico. O grande volume de urina excretado por esses animais pode transportar elevada concentração de bactérias (3,7 X 10^4 /mL de urina). Esse contexto proporciona um alto risco de infecção humana (BARRAGAN *et al.*, 2016). Achados recentes sugerem que *Leptospira* veiculada por mamíferos domésticos e peridomésticos são mais relacionadas à infecção humana, em comparação àquelas veiculadas por mamíferos selvagens em áreas de baixa circulação de humanos (BARRAGAN *et al.*, 2017).

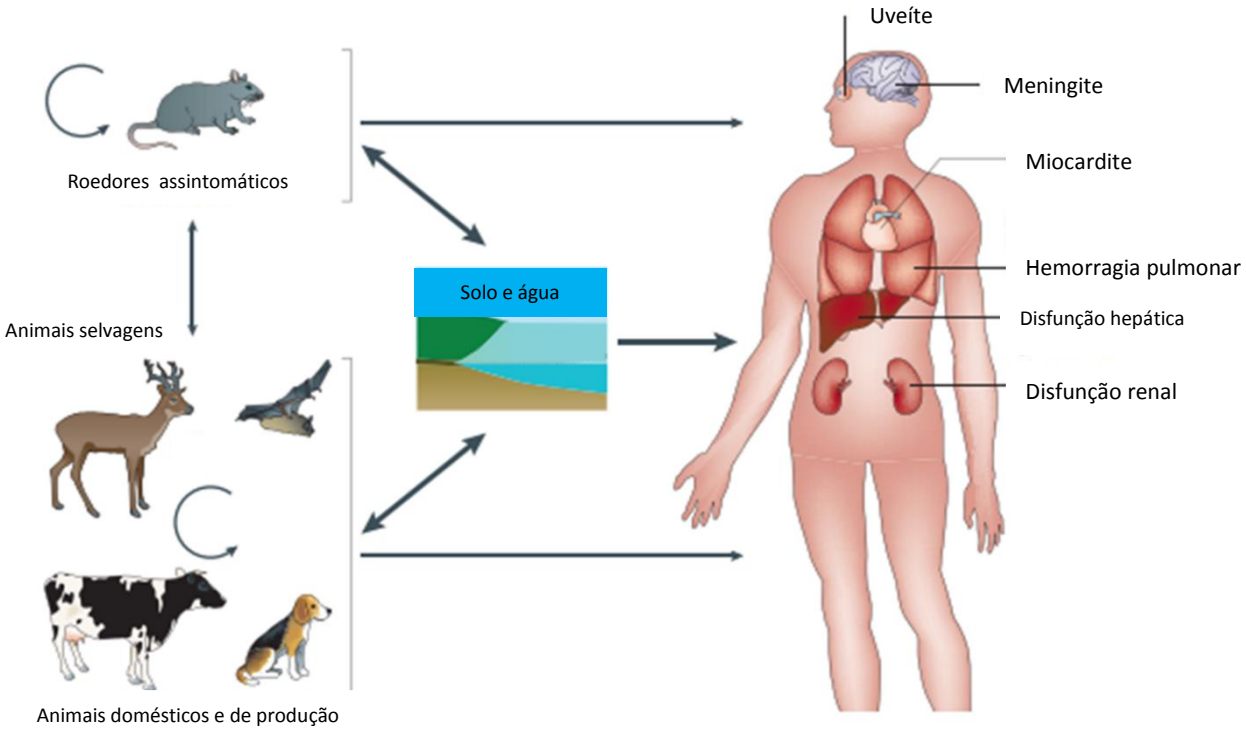


Figura 3 – Ciclo da infecção por *Leptospira* adaptado de KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009. Os mamíferos excretam a bactéria para o ambiente e são considerados fontes de infecção. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais.

3.1.4 Determinantes moleculares e sua participação na patogenicidade

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos invasores, incluindo a *Leptospira*. Entre os componentes inatos estão as barreiras físicas que são estabelecidas nas portas de entrada para uma provável infecção, incluindo as mucosas do trato respiratório, gastrintestinal, urogenital e da conjuntiva ou a pele e os tecidos subcutâneos. As barreiras químicas que estão presentes na saliva e no suco gástrico também desempenham funções de defesa contra os patógenos (TIZARD, 2014).

Invasão, disseminação e colonização

O muco que recobre as mucosas funciona como uma barreira física contra infecções. Devido a sua composição rica em carboidratos o muco pode aprisionar bactérias. A intensa motilidade é descrita como essencial para que a *Leptospira* atravesse as barreiras físicas. O movimento característico do tipo saca-rolhas, faz com que a *Leptospira* se desloque rapidamente em meios viscosos, incluindo o muco. Nesse contexto, acontece a invasão da mucosa por meio da movimentação direta através da camada superficial de muco até as células epiteliais (TAKABE *et al.*, 2017).

A pele integra é mais resistente à invasão por *Leptospira* do que a pele que contém alguma solução de continuidade. Os cortes, as abrasões ou a imersão prolongada em água fragilizam as camadas superficiais da pele, possibilitando a ocorrência de portas de entrada por meio das quais a *Leptospira* alcança os vasos do tecido subcutâneo, incluído os capilares, as arteríolas e as vênulas. Ainda não estão completamente esclarecidos quais são os mecanismos que as *Leptospiras* utilizam para atravessar a parede dos vasos sanguíneos (PICARDEAU, 2017).

A adesão de *Leptospira* às células do hospedeiro precede a invasão bacteriana. A aderência é realizada por meio de moléculas que estão localizadas na membrana externa bacteriana e são denominadas adesinas. Essas proteínas de adesão se ligam a receptores de superfície que são encontrados nas células das portas de entrada para a infecção (PICARDEAU, 2017). Além da função biológica de adesina, os estudos de proteômica demonstraram que as *Leptospiras* sintetizam proteínas que podem se ligar às proteínas do hospedeiro que estão relacionadas com a hemostasia (por exemplo, fibrinogênio, plasminogênio), com constituintes da matriz extracelular (MEC) (por exemplo, laminina, elastina, fibronectina, colágeno), e com componentes

do sistema complemento (por exemplo, fator H ou a proteína ligante de C4b). Em conjunto, essas atividades biológicas das proteinas de *Leptospira* facilitam a colonização tecidual, dificultam a coagulação e propiciam a evasão da resposta imunológica (MURRAY, 2015).

Durante a infecção, as *Leptospiras* precisam aderir e trafegar pela MEC. Muitas proteínas já foram descritas com a capacidade de se ligarem aos componentes da MEC, entre elas a família das *Immunoglobulin-like proteins* (Lig) (CHOY *et al.*, 2007; CHOY *et al.*, 2011; FIGUEIRA *et al.*, 2011), *endostatin-like proteins* (Len) (STEVENSON *et al.*, 2007), as *Outer membrane protein* com função porina (OmpL1) (FERNANDES *et al.*, 2012) e as lipoproteínas (LipL32) (HAUK *et al.*, 2008). Entretanto, a despeito da função adesina das proteínas Len, OmpL 1 e LipL32, a eficiência dessas três moléculas, para ligação à MEC, é variável. Dependendo do modelo de célula hospedeira que é utilizado nos estudos *in vitro*, OmpL1 supera as outras duas, como adesina (ROBBINS *et al.*, 2015). O grande número de proteínas de *Leptospira* que foram sugeridas com função adesina sugere a existência de um mecanismo de redundância funcional entre elas. Essa hipótese talvez explique, em parte, a manutenção da capacidade de invasão das *Leptospiras* que foram deletadas seletivamente para os genes codificadores das adesinas (VIEIRA *et al.*, 2014).

Na fase inicial da leptospirose, as bactérias multiplicam na corrente circulatória e caracterizam o fenômeno da leptospiremia. Além disso, o patógeno dissemina por todo o organismo, principalmente para pulmão, fígado, rins e baço. Em modelo experimental *Rattus norvergicus* para a Leptospirose crônica, as bactérias foram removidas de todos os tecidos infectados, exceto dos rins. Nesse órgão, as bactérias persistiram nos túbulos proximais configurando uma possível adaptação a esse tecido (ATHANAZIO *et al.*, 2008).

A disseminação inicial das bactérias para múltiplos órgãos é provavelmente o resultado de sua translocação rápida através das monocamadas de células hospedeiras. Além da motilidade, a invasão pode ser mediada pela secreção de enzimas capazes de degradar as membranas celulares do hospedeiro. As patogênicas possuem genes codificadores de proteases que podem degradar a membrana da célula hospedeira (colagenase, metaloproteases e termolisinas) (NASCIMENTO *et al.*, 2004a). Também secretam hemolisinas, conforme demonstrado *in vitro*. Essa atividade hemolítica se deve, em parte, à atividade de esfingomielinases e fosfolipases (FLORES-DÍAZ *et al.*, 2016). Culturas *in vitro* do

sorovar Pomona produziram esfingomielina C com atividade hemolítica em sangue de carneiro (BERNHEIMER; BEY, 1986) e sinais clínicos de anemia hemolítica foram descritos em ruminantes infectados com esse sorovar (ELLIS, 2015), corroborando a importância destas proteínas como fatores de virulência. A lise dos eritrócitos também pode contribuir para a disponibilização do ferro para a bactéria, durante a infecção (NARAYANAVARI *et al.*, 2012).

As *Leptospiras* alojadas nos rins do hospedeiro demonstraram inibição da expressão de genes que codificam proteínas com potencial de estimulação da resposta imune local. Aparentemente, o fato do rim ser um órgão imunologicamente privilegiado pode favorecer a persistência da bactéria nesse local, especialmente nos hospedeiros adaptados à infecção (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2008; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A formação de biofilmes é um mecanismo de adesão e parece estar relacionado a colonização tecidual por *Leptospira* (RISTOW *et al.*, 2008). Os biofilmes são estruturas complexas, compostas por bactérias que formam comunidades funcionais interativas, as quais compartilham nutrientes e ficam protegidas das condições adversas do meio ambiente, incluindo os antibióticos e o sistema imunológico do hospedeiro. Para sobreviver dentro dos túbulos renais, a *Leptospira* forma estruturas semelhantes a biofilmes, o que pode favorecer sua sobrevivência e a excreção intermitente dessa bactéria na urina, em animais cronicamente infectados (YAMAGUCHI *et al.*, 2018). Proteínas de membrana externa (OmpL1, OmpA) e lipoproteínas (LipL21) tiveram sua expressão aumentada em biofilmes de *Leptospira*, evidenciando a provável importância destas proteínas em etapas iniciais de adesão das bactérias às superfícies bióticas e abióticas e também na manutenção dos biofilmes maduros (IRAOLA *et al.*, 2016).

Evasão da resposta imune inata e adaptativa

A penetração da *Leptospira* nos tecidos do hospedeiro permite o seu contato com os componentes celulares e os humorais da imunidade inata. Entre os componentes celulares encontram-se os macrófagos, que possuem funções fagocitárias e bactericidas. Os macrófagos reconhecem e fagocitam a *Leptospira*, entretanto, foi verificado em modelo murino que essas bactérias sobrevivem nos fagossomos e são capazes de multiplicar no citoplasma do macrófago (CHEN *et al.*,

2017). Mecanismos bacterianos anti-oxidativos sugerem que a *Leptospira* é adaptada ao ambiente hostil do fagossomo e, por isso, podem resistir às espécies reativas de oxigênio (PICARDEAU, 2017). Além disso, a *Leptospira* tem potencial para a indução da apoptose dos macrófagos por meio da ativação das caspases (DU *et al.*, 2018).

As proteínas do sistema complemento fazem parte dos mecanismos humorais do hospedeiro por possuírem funções bactericidas e pró-inflamatórias. Entretanto, a *Leptospira* pode evadir do sistema complemento por meio de três mecanismos: (1) componentes bacterianos atuam no recrutamento de proteínas reguladoras do sistema complemento como o fator H, a proteína ligante de C4b (C4BP), a proteína fator H-like 1 (FHL-1) e a vitronectina. O papel biológico dessas proteínas é inibir ativação do complexo de ataque da membrana; (2) aquisição de proteases do hospedeiro, capazes de se ligarem ao plasminogênio aderido a superfície bacteriana e transformá-lo em plasmina. A plasmina atua na defesa da bactéria por meio da clivagem de C3b, C4b e C5 e, com isso, reduz a opsonização e a fagocitose e (3) produção de proteases que inativam as proteínas do complemento próximas a bactéria (FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016).

Os mecanismos da imunidade inata do hospedeiro capturam a *Leptospira*, processam seus antígenos e apresentam seus determinantes antigênicos para as células da imunidade adaptativa. A resposta imune adaptativa contra a leptospirose é baseada, principalmente, na produção de anticorpos específicos, entre eles os com funções aglutinantes, fixadores de complemento ou opsonizantes. Esse perfil de resposta é chamado de humoral. O repertório de anticorpos específicos é direcionado, principalmente, contra o LPS da *Leptospira* e não há proteção cruzada entre membros de sorogrupos diferentes (GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017).

Foi demonstrado que camundongos *nude*, os quais não produzem células T, são capazes de montar uma resposta imune protetora contra a bactéria. Isso sugere a relevância das células B na proteção contra *Leptospira* e a aparente independência da resposta mediada por células T no modelo murino (CHASSIN *et al.*, 2009). As células B atuam contra a *Leptospira* por meio da (i) produção de Imunoglobulina M (IgM) contra o LPS circulante, em um mecanismo dependente da sinalização via o receptor *Toll-like* 4 (TLR4) e (ii) da síntese de Interferon-γ (IFN-γ) no fígado, dependente da sinalização via *Toll-like* 2 (TLR2) e TLR4. As células B humanas apresentam uma deficiência em sua capacidade de detectar o lipídio A do LPS de

Leptospira. Esse fenômeno talvez explique o fato dos humanos desenvolverem a leptospirose aguda mais facilmente do que os camundongos (CHASSIN *et al.*, 2009).

3.1.5 Manifestações clínicas nos animais

A leptospirose pode apresentar uma ampla variedade de sinais clínicos, os quais irão depender do sorovar envolvido e do hospedeiro, tais como dose infectante, virulência da *Leptospira*, adaptação ao hospedeiro, a espécie do hospedeiro e também da sua idade e seu *status* imunológico (EVANGELISTA; COBURN, 2010; PICARDEAU, 2017).

Bovinos

Em bovinos, a leptospirose é uma importante causa de queda nos índices reprodutivos. Em fêmeas bovinas gestantes, os sinais clínicos mais frequentes são repetição de cio, perdas embrionárias e abortamentos, com o feto expelido após 24 a 48 horas e em processo de autólise. Natimortalidade ou nascimento de crias a termo, porém debilitadas, também podem ser observados. Estes sinais clínicos são ocasionados principalmente por estirpes do sorogrupo Sejroe, para o qual os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção (LILENBAUM; MARTINS, 2014; GENOVEZ, 2016; LIBONATI et al., 2018). Foram detectadas vacas portadoras uterinas, sugerindo que a colonização do útero está associada à fisiopatogenia da falha reprodutiva (CABRAL PIRES et al., 2018).

A manifestação aguda da doença nesses animais não é frequente e está associada com sorovares para os quais esses animais são considerados hospedeiros acidentais, como Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae (JAFARI DEHKORDI; SHAHBAZKIA; RONAGH, 2011; PINTO *et al.*, 2016). Em bovinos jovens, o sorovar Pomona pode ocasionar surtos graves, com febre, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão pulmonar e morte (DRAGHI *et al.*, 2011; GENOVEZ, 2016).

A síndrome da queda do leite (*milk drop syndrome*) está associada a infecção pelos sorovares Hardjo e Pomona. Podem ocorrer manifestações de queda brusca na produção leiteira, com o leite apresentando coloração amarelada, consistência de

colostro e elevada contagem de células somáticas (PEARSON; MACKIE; ELLIS, 1980; GENOVEZ, 2016).

Suínos

Em suínos, a leptospirose é uma importante causa de diminuição na produção, ocasionando abortos, mortalidade perinatal e nascimento de leitões prematuros (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). No Brasil, os sorovares mais comumente descritos associados a infecção aguda nesses animais são pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae (MIRAGLIA *et al.*, 2015). A infecção aguda em leitões pode provocar sepse e alta mortalidade.

Por outro lado, as cepas adaptadas como as do sorogrupo Pomona causam mais frequentemente infecção subclínica e o estado de portador renal (ELLIS, 2015). Uma revisão sistemática com trabalhos realizados na América Latina mostrou que o sorogrupo Pomona foi mais prevalente até a década de 1980, enquanto o sorogrupo Icterohaemorrhagiae aumentou sua prevalência após esse período. Esse fenômeno coincide com o período de implementação da tecnificação na suinocultura, levando a diminuição da transmissão direta do sorovar Pomona. Por outro lado, a prevalência de Icterohaemorrhagiae indica que roedores estão sendo a principal fonte de infecção dos animais (PINTO; LIBONATI; LILENBAUM, 2017).

Equinos

Na América Latina, incluindo Brasil, os equinos apresentam alta prevalência de reagentes para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae (BRAGA *et al.*, 2011; HAMOND *et al.*, 2014; PINTO; LIBONATI; LILENBAUM, 2017). Outros sorogrupos, por exemplo Australis, particularmente o sorovar Bratislava, parecem estar adaptados ao hospedeiro equino (VERMA; STEVENSON; ADLER, 2013). Embora as formas subclínica e crônica sejam as mais frequentes, pode haver perdas relacionadas a morte embrionária, aborto e natimortalidade (ELLIS, 2015).

A uveíte, também conhecida como oftalmia periódica, é uma complicação tardia da leptospirose sistêmica em equinos, normalmente associada ao sorogrupo Pomona. A opacidade da córnea e do cristalino resulta da persistência de *Leptospira* no humor

vítreo. Ocorre inflamação crônica subsequente e a reatividade antigênica cruzada dos anticorpos anti-*Leptospira* contra os componentes oculares, levando a episódios recidivantes da oftalmia (BRAGA *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que a leptospirose pode causar síndrome respiratória aguda em equinos (VERMA; STEVENSON; ADLER, 2013). Os sinais respiratórios associados à inflamação intersticial, dano alveolar e hemorragia foram descritos em potros (BROUX *et al.*, 2012) e a hemorragia pulmonar foi relatada em equinos adultos sororeagentes (HAMOND *et al.*, 2011).

Ovinos e Caprinos

A leptospirose em pequenos ruminantes é uma doença crônica que impacta na fertilidade dos rebanhos, com abortos, natimortos e queda na produção leiteira (LILENBAUM *et al.*, 2008a; MARTINS; LILENBAUM, 2014). A infecção em ovinos e caprinos tem sido frequentemente associada ao sorogrupo Sejroe (LILENBAUM *et al.*, 2007; LILENBAUM *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2015).

Sorogrupos não adaptados, como Icterohaemorrhagiae (MARTINS *et al.*, 2012), podem causar surtos nessas espécies. Na forma aguda, pode-se observar febre, depressão, icterícia, anorexia, anemia e hemorragia (ELLIS, 2015). Apesar desses animais não serem considerados importantes reservatórios de *Leptospira*, há evidências de que eles são carreadores e podem albergar essas bactérias no trato reprodutivo e renal (LILENBAUM *et al.*, 2008b; LILENBAUM *et al.*, 2009).

Caninos

Os cães são reconhecidos como hospedeiros de manutenção de *Leptospira interrogans* sorogrupo Canicola, podendo se tornar portadores crônicos e disseminar a bactéria pelo ambiente. Quando infectados por sorogrupos não adaptados, como Icterohaemorrhagiae, podem haver manifestações clínicas agudas, com predominância de alterações hepáticas e renais (PINTO; LIBONATI; LILENBAUM, 2017). Os achados clínicos mais característicos da leptospirose aguda em cães são icterícia generalizada e urina escura. Os sinais clínicos, relacionados ao comprometimento renal, incluem polidipsia e poliúria, com ou sem azotemia. A

falência renal oligúrica ou anúrica pode se desenvolver em aproximadamente 30% dos cães infectados. O envolvimento hepático pode variar de elevação moderada na concentração sérica das enzimas hepáticas, com ou sem hiperbilirrubinemia, até a falência severa do órgão acompanhada de sinais de encefalopatia hepática (SCHULLER *et al.*, 2015). Infecções agudas típicas, com icterícia e infecção renal aguda, também foram descritas para os sorogrupos Pyrogenes, Autumnalis e Grippothyphosa (ANDRÉ-FONTAINE, 2006).

Desordens reprodutivas também podem acontecer na leptospirose canina, portanto, a doença deve ser considerada como diagnóstico diferencial em casos de aborto ou mortalidade perinatal (ANDRÉ-FONTAINE, 2006). A síndrome hemorrágica pulmonar associada a leptospirose pode evoluir para hemorragia pulmonar fulminante com alta mortalidade e já foi descrita em cães (MAJOR; SCHWEIGHAUSER; FRANCEY, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

3.1.6 Epidemiologia da leptospirose em bovinos no Brasil

Estima-se que aproximadamente 30% das fêmeas em rebanhos bovinos brasileiros apresentam falhas na reprodução anualmente (LILENBAUM; MARTINS, 2014). A leptospirose é considerada uma das principais causas infecciosas de perdas econômicas nos rebanhos, principalmente devido as desordens reprodutivas e queda na produção leiteira (ZUERNER, 2015; PIRES *et al.*, 2018). Muitos estudos têm reportado fatores de risco relacionados a alta prevalência da leptospirose bovina em diversos países (SALGADO *et al.*, 2014; ALLAN *et al.*, 2015; ARTEAGA-TRONCOSO *et al.*, 2015; DREYFUS *et al.*, 2018; GUERNIER *et al.*, 2018), assim como em vários estados brasileiros (Tabela 2).

O estabelecimento da infecção no rebanho se deve ao livre acesso à água contaminada em locais onde coabitam distintas espécies domésticas (p. ex: suínos, cães, ovinos) ou silvestres. A doença também está relacionada ao contato de roedores com a comida dos animais e a introdução de animais portadores nos plantéis. A reposição de animais no rebanho pode representar fonte constante de novos suscetíveis (GENOVEZ, 2016). Altos índices pluviométricos e a alta umidade são relacionados com a alta prevalência da doença nos rebanhos (CORREIA; LOUREIRO; LILENBAUM, 2017). Outro fator de risco relacionado é a alta densidade de animais, que pode contribuir para contaminação ambiental e disseminação da doença, uma vez que os bovinos podem ser fontes de infecção para outros animais que vivem no

mesmo ambiente (ELLIS, 2015). Bovinos são considerados reservatórios do sorogrupo Sejroe (PINTO *et al.*, 2016; COSATE *et al.*, 2017; PINTO; LIBONATI; LILENBAUM, 2017) eles normalmente se infectam enquanto ainda jovens, desenvolvem infecção crônica, a qual permanece na vida adulta, e excretam *Leptospira* para o ambiente. Em condições favoráveis de umidade e temperatura, a bactéria pode sobreviver por anos fora dos seus hospedeiros (LEVETT, 2001).

Tabela 2 – Soroprevalência da leptospirose bovina, avaliada nos últimos 12 anos, em rebanhos bovinos de diferentes Estados do Brasil, com o *Microscopic Agglutination Test* (MAT).

Estado	Soroprevalência	Número de bovinos	Grupo de pesquisa
Região Norte			
Pará	65,5%	3.466	CHIEBAO *et al.*, 2015
Rondônia	52,8%	2.109	AGUIAR *et al.*, 2006
Região Nordeste			
Paraíba	61,1%	2.317	PIMENTA *et al.*, 2014
Maranhão	35,9%	4.832	SILVA *et al.*, 2012
Piauí	38,3%	60	MINEIRO *et al.*, 2011
Bahia	77,9%*	10.823	OLIVEIRA *et al.*, 2010
Região Sudeste			
Minas Gerais	20,7%	2.915	NICOLINO *et al.*, 2014
São Paulo	60,43%	1.005	SARMENTO *et al.*, 2012
Rio de Janeiro	36,9%	309	MARTINS; PENNA; LILENBAUM, 2010
Região Centro Oeste			
Mato Grosso do Sul	79,8%	2.766	MIASHIRO *et al.*, 2018
Mato Grosso	65,2%	743	SARMENTO *et al.*, 2012
Goiás	62,2%	4.571	MARQUES *et al.*, 2010
Região Sul			
Santa Catarina	6,44%	1.242	FAVERO *et al.*, 2017
Paraná	35,9%	1.880	HASHIMOTO *et al.*, 2012
Rio Grande do Sul	38,75%	1.360	HERRMANN *et al.*, 2012

*Propriedades com pelo menos um animal reagente. Foram analisadas 1.414 propriedades.

3.1.7 Diagnóstico da leptospirose em animais

O diagnóstico da leptospirose animal é solicitado como diferencial em casos de doença aguda com indícios de comprometimento renal ou hepático, e na suspeita de doenças da reprodução em rebanhos, caracterizadas por repetições de cio, abortos ou natimortos. Além disso, os testes também podem ser utilizados para realização de inquéritos epidemiológicos (ELLIS, 2018).

A infecção inicial por *Leptospira* pode ser dividida em dois estágios. O primeiro estágio é o da septicemia ou fase aguda, a qual pode durar de três a 10 dias. Durante esse estágio, as bactérias são encontradas no sangue e vão decrescendo em número até 15 dias após o início da infecção. O segundo estágio normalmente ocorre duas semanas após o início da infecção e dura até 30 dias. Durante esse estágio, os títulos de anticorpos aumentam e há a eliminação da bactéria da corrente sanguínea (PICARDEAU, 2013).

Os testes laboratoriais diretos, que detectam o agente etiológico ou fragmentos do seu DNA, e os indiretos, que demonstram os anticorpos produzidos pelos mecanismos de defesa dos hospedeiros, são a base do diagnóstico. A seleção dos exames disponíveis deve ser realizada com base nas características do teste, estágio da infecção e recursos disponíveis (PAES, 2016).

Amostras para testes diretos

O uso de métodos diretos para detecção do microrganismo podem ser úteis: (1) em fases iniciais de bacteremia, na qual há a possibilidade de detecção no leite e no sangue; (2) na presença de fetos abortados ou natimortos, com possibilidade de detecção do agente em múltiplos órgãos e (3) para detecção da bactéria na fase crônica da doença nos rins, trato genital, olhos, além de haver também a possibilidade da sua detecção na urina, sêmen, secreção vaginal e humor aquoso (FAINE, 1999; ELLIS, 2015).

A pesquisa positiva por *Leptospira* no sangue e no leite, quando realizada em animais com sinais clínicos de leptospirose, é considerada conclusiva no diagnóstico. Porém, a identificação do microrganismo a partir desses materiais pode não ter sucesso, devido a sua presença transitória no sangue e eliminação intermitente no leite (GENOVEZ, 2016).

A presença de *Leptospira* em múltiplos órgãos no exame pós mortem é considerada confirmatória no diagnóstico (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG,

2007). No entanto, o tratamento prévio do animal com antimicrobianos e um longo tempo entre o processamento da amostra e o óbito podem tornar difícil a identificação da bactéria nesses materiais (ELLIS, 2015). O estágio de portador pode ser confirmado pelo achado da bactéria no trato genital, rins e urina. O insucesso nas tentativas de detecção das bactérias na urina pode ser resultado da leptospirúria intermitente, e não excluem a possibilidade do animal ser um portador renal (FAINE, 1999). A presença de *Leptospira* em fluídos corpóreos ou órgão internos (principalmente rim, fígado, pulmão, cérebro, glândula adrenal e conteúdo estomacal) de fetos abortados ou natimortos é considerada para o diagnóstico e evidencia o estado de portador crônico da mãe (ELLIS, 2015).

Principais testes diretos e suas limitações

As metodologias que podem ser usadas para o diagnóstico direto da leptospirose são: visualização em microscopia de campo escuro, cultura, detecção de DNA, coloração pela prata e técnicas imunoquímicas diretas (ELLIS, 2015).

A microscopia direta em campo escuro é um método rápido para detecção de *Leptospira* nos fluídos corpóreos, porém possui baixa sensibilidade, devido ao baixo número de microrganismos e sua presença transitória nos materiais analisados. Como são bactérias muito delgadas, o limite para sua detecção é de 10^4 *Leptospira* por ml de sangue ou urina (LEVETT, 2001; PICARDEAU, 2013). No sangue de humanos infectados, essa quantidade pode variar de 10^2 a 10^6 na fase de bacteremia (AGAMPODI *et al.*, 2012). A especificidade também é baixa, devido a possibilidade de estarem presentes na amostra fibrilas de colágeno, membranas de eritrócitos, bactérias contaminantes e outros artefatos que podem se assemelhar a *Leptospira* e confundir o observador (VIJAYACHARI *et al.*, 2001).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo usada no diagnóstico por possuir vantagens como precocidade no diagnóstico e por não requerer que o microrganismo esteja viável para ser identificado. A sensibilidade do teste varia de acordo com o tipo de amostra e a metodologia empregada. Como o momento do início da infecção muitas vezes é incerto nos animais, recomenda-se que o teste seja realizado tanto em amostras de sangue quanto de urina em casos de doença clínica (ELLIS, 2015). O método também é útil para identificação de *Leptospira* no sêmen e fluído vaginal (KIM *et al.*, 2006; LILENBAUM *et al.*, 2008b). São relatados problemas

com o uso da PCR para amostras colhidas de fetos abortados, devido a presença de inibidores no tecido autolisado. O conteúdo estomacal do feto pode ser usado para diagnóstico de outras bactérias que causam aborto com menor interferência nos resultados da PCR (HAMOND *et al.*, 2012).

A PCR pode ser utilizada associada a testes sorológicos para melhorar a sensibilidade do diagnóstico. O *real-time* PCR (tecnologia SYBR Green ou Taqman) fornece resultados mais rapidamente que a PCR tradicional, é automatizado e menos sensível a contaminação (PICARDEAU *et al.*, 2014). O teste pode detectar genes universalmente presentes nas bactérias, como *gyrB* (SLACK *et al.*, 2006), *rrs* (gene 16S rRNA) (MÉRIEN *et al.*, 1992; THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2011) e *secY* (AHMED *et al.*, 2009), ou genes restritos às patogênicas, como *lipL32* (THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2011), *ligA* e *ligB* (PALANIAPPAN *et al.*, 2005). A PCR positiva demonstra a presença de *Leptospira* patogênica, porém não identifica a espécie ou o seu genótipo. Para essas análises pode-se realizar a curva de *melting* dos produtos amplificados (MERIEN *et al.*, 2005) ou o sequenciamento do DNA (CERQUEIRA *et al.*, 2010; PEREZ; GOARANT, 2010).

Meios de cultura como EMJH são úteis para as tentativas de isolamento de *Leptospira* presentes no sangue, urina ou nos tecidos do animal suspeito de infecção. Essa técnica é onerosa e a sua sensibilidade é baixa, principalmente devido ao baixo número de *Leptospira* no material colhido e a presença frequente de outros microrganismos indesejáveis. A adição de antimicrobianos (5-fluorouracil, ácido nalidíxico, fosfomicina) pode inibir o crescimento de contaminantes sendo útil para o isolamento (LEVETT, 2001). As culturas devem ser mantidas em estufa entre 28°C e 30º C, por pelo menos dois meses, e examinadas em microscopia de campo escuro semanalmente. O tempo para o crescimento pode variar de acordo com o sorovar e o número de bactérias viáveis na amostra colhida (PICARDEAU *et al.*, 2014).

Como a bactéria demora para crescer no EMJH, esse teste não é útil para rotina de identificação de animais doentes, pois não é possível aguardar os resultados para iniciar o tratamento (MARQUEZ *et al.*, 2017). No entanto, obtendo-se os isolados é possível a realização da sorogrupagem por meio de técnicas de biologia molecular, como a Eletroforese em Campo Pulsado (GALLOWAY; LEVETT, 2010), o sequenciamento do 16S rRNA (MOREY *et al.*, 2006; BACKSTEDT *et al.*, 2015), a análise de múltiplos loci de VNTR (*variable number of tanden repeats*) (MAJED *et al.*, 2005; SALAÜN *et al.*, 2006) e por *multilocus sequencing typing* (MLST) (AHMED *et*

al., 2006; THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2007; BOONSILP *et al.*, 2013). A identificação é útil para avaliação de estirpes que circulam em uma determinada região, realização de estudos epidemiológicos e adoção de medidas de controle (ELLIS, 2015; GURUMURTHY *et al.*, 2018).

No caso de óbito do animal, a coleta de material para preparações fixadas e coradas pela prata podem ser úteis. Os sais de prata impregnam os lipídeos da parede celular, que se coram em negro, possibilitando a visualização da morfologia característica das espiroquetas (PAES, 2016). As técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica também podem ser apropriadas como métodos adicionais para o diagnóstico direto (CHAGAS-JUNIOR *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A reação de imunofluorescência (RIF) faz uso de anticorpos conjugados a um corante fluorescente como reagente de detecção. O método pode detectar anticorpos específicos em fluidos corporais ou antígeno em cortes de tecido, e apresenta sensibilidade e especificidade moderadas para o diagnóstico da doença em fase aguda (APPASSAKIJ *et al*., 1995). No entanto, este teste não está disponível comercialmente e requer um microscópio de fluorescência (PICARDEAU *et al.*, 2014). Pesquisa para o diagnóstico da leptospirose em fetos equinos abortados demonstraram uma menor sensibilidade da RIF quando comparada a *real time* PCR. Os autores verificaram também que nas análises pela RIF, as amostras de rim fetal obtiveram melhores resultados do que as de placenta, indicando que esse teste é prejudicado pela rápida autólise da placenta (EROL *et al*., 2014)

Testes indiretos

Microscopic agglutination test (MAT)

Em virtude das limitações das técnicas diretas para o diagnóstico da leptospirose, o MAT é comumente utilizado, sendo considerado padrão ouro para o diagnóstico da doença. Esse teste detecta tanto anticorpos IgM quanto IgG e utiliza como antígeno uma coleção de culturas vivas de *Leptospira* mantidas em laboratório. Os anticorpos IgM podem ser detectados no soro entre o quinto e o sétimo dias após a infecção e são seguidos pelos anticorpos IgG que persistem no sangue por longos períodos (PICARDEAU, 2013). A coleção de *Leptospira* deve conter sorovares representativos de todos os sorogrupos de ocorrência regional, uma vez que o MAT é

sorogrupo específico e não sorovar específico (SMYTHE *et al.*, 2009; MARQUEZ *et al.*, 2017).

Para a execução do MAT, a amostra de soro do sangue é habitualmente examinada em uma diluição inicial de 1:100 e incubado com os antígenos. Em seguida, a mistura soro do sangue/antígeno é examinada com microscopia de campo escuro, para avaliação da presença de aglutinação igual ou superior a 50% do campo microscópico. Nesse contexto, uma amostra de soro reagente no título 100 será diluída sucessivamente na razão dois (dupla seriada) para a determinação da máxima diluição onde se observe aglutinação. Feito isso, obtêm-se que o título do teste será a recíproca da maior diluição a apresentar 50% de aglutinação do campo microscópico (FAINE, 1999).

Na fase aguda da leptospirose, na qual o MAT carece de sensibilidade, a colheita de amostras pareadas de soro sangue, em intervalos de 10 a 14 dias, permite a confirmação da soroconversão e, desse modo, a presença de infecção ativa. Um animal clinicamente suspeito e MAT negativo pode ser diagnosticado com o procedimento das amostras pareadas. Outra situação é o animal reagente no título 100 e com sinais clínicos sugestivos. Nesse contexto, se ocorrer uma elevação de quatro vezes no título da segunda amostra, também é forte indicativo de infecção ativa. Títulos iguais ou superiores a 800, em amostra única, também são indicativos de doença recente (LEVETT, 2001).

Existem hospedeiros oligosintomáticos, aparentemente saudáveis, portadores renais e/ou genitais que são não-reagentes no MAT. Entretanto, esses animais eliminam *Leptospira* na urina, no sêmen ou nas secreções vaginais (GENOVEZ, 2016). Em rebanhos, a resposta sorológica do conjunto de animais é mais útil do que a individual em casos de infecção crônica. O MAT é apropriado para estudos soroepidemiológicos, nos quais títulos iguais ou superiores a 100 podem indicar uma exposição à *Leptospira*. No entanto, sem o isolamento da bactéria, não é possível a identificação dos sorovares infectantes (LILENBAUM; MARTINS, 2014). Para a definição do “n” amostral em rebanhos com o objetivo de uma investigação epidemiológica, é necessário considerar entre os critérios analíticos o total de propriedades, o número de animais do rebanho, a prevalência estimada e o nível de significância desejado (GENOVEZ, 2016).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A plataforma ELISA é utilizada para o diagnóstico da leptospirose humana e animal. No formato indireto, o ELISA detecta os anticorpos IgG ou IgM e não requer a utilização antígenos vivos (MARQUEZ *et al.*, 2017). Considerando o compartilhamento de proteínas conservadas, para o desenvolvimento do ELISA já foram empregados extratos totais de *Leptospira* patogênica (CANAL *et al.*, 2013), intermediárias (BOURHY; VRAY; PICARDEAU, 2013) ou saprófitas (GARCÍA *et al.*, 2014). O ELISA *in house* pode ser elaborado com o extrato total de *Leptospira* isolada localmente (TAN *et al.*, 2014) ou com proteínas bacterianas recombinantes (KITASHOJI *et al.*, 2015; VELINENI; TIMONEY, 2016; CHANDY *et al.*, 2017).

Na padronização e validação de plataformas ELISA, verifica-se ampla variação na sensibilidade e na especificidade diagnósticas (Quadro 1). Como exemplo, em comparação com o MAT, o kit comercial PANBIO-IgM-ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Austrália), para diagnóstico da leptospirose humana, produziu sensibilidade e especificidade de 96,6 e 93,3%, respectivamente, no Brasil (OOTEMAN; VAGO; KOURY, 2006), e de 76,3% e 82,1%, respectivamente, na Tailândia (DESAKORN *et al.*, 2012). As diferenças reportadas nestes estudos podem ser o resultado da exposição prévia em áreas endêmicas ou das reações cruzadas com anticorpos produzidos contra outras bactérias (MARQUEZ *et al.*, 2017). O ELISA, independentemente de sua performance diagnóstica, apresenta elevada sensibilidade analítica e, por isso, faz a detecção precoce dos anticorpos específicos (CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999; AVIAT *et al.*, 2010; PICARDEAU, 2013). O ELISA não identifica o sorogrupo ou o sorovar infectante, todavia é suficiente para o *screening* de rebanhos (PICARDEAU, 2013).

Tabela 3 – Testes ELISA para diagnóstico da leptospirose desenvolvidos a partir de diferentes antígenos.

AUTORES	ANTÍGENO	ANTICORPO	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE(%)	PAÍS	HOSPEDEIROS
GHOSH *et al.*, 2018	Proteína hipotética recombinante (LIC13341)	IgG	Bovinos: 78 Humanos: 100	Bovinos: 100 Humanos:100	Índia	Bovinos e Humanos
SATHIYAMOORTHY *et al.*, 2017	*L. interrogans* sorovar canicola (Extração de proteína de membrana externa)	IgG	91,54	58,10	Índia	Cães
CHANDY *et al.*, 2017	Polipeptídeo recombinante (LipL32)	IgM	95	90	Índia	Humanos
PENNA *et al.*, 2017	*L. fainei* sorovar Hurstbridge (Tratamento: Formol e água fervente)	IgM	80,8	100	Brasil	Cães
ANDRE-FONTAINE *et al.*, 2015	Peptídeos sintético *(Hap1/LipL32)*	IgM e IgG	IgM: 96,4 IgG: 95,5	NI	França	Cães
KITASHOJI *et al.*, 2015	Proteína recombinante (Lig A)	IgM	69,5	98	Filipinas	Humanos
NILOOFA *et al.*, 2015	Kit ELISA (Institut Virion/Serion GmbH, Warburg, Alemanha)	IgM	Fase aguda: 86 Amostra pareada:80,2	Fase aguda: 84,5 Amostra pareada: 88,5	Sri Lanka	Humanos
SCHLICHTING *et al.*, 2015	*L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa (Tratamento: Nitrogênio líquido/sonificação)	IgM e IgG	IgM:96,2 IgG: 95	IgM: 83,6 IgG: 83,3	Alemanha	Humanos
ALIZADEH *et al.*, 2014	Proteínas recombinantes (Mix de Lsa63 e LipL32)	IgM e IgG	IgM: 96,62 IgG: 92,31	IgM: 83,23 IgG: 83,87	Iran	Humanos
KANAGAVEL *et al.*, 2014	Proteína recombinante (LigA)	IgM	92,1	97,7	Índia	Humanos
TAN *et al.*, 2014	Leptospiral strain IMR/175 (isolado local não patogênico) (Tratamento: Formol/fervura)	IgM	90,38	87,72	Malásia	Humanos
GARCÍA *et al.*, 2014	*L. biflexa* sorogrupo Semaranga, serovar Patoc (Tratamento: formol/sonificação)	IgG	92,8	91,8	Cuba	Cães
DENEKE *et al.*, 2014	Proteína recombinante (LigB)	IgG	96,9	91,08	Índia	Bovinos

OBREGÓN FUENTES *et al.*, 2013	Kit ELISA (SD *Leptospira* ELISA-IgM, SD Bioline, Korea)	IgM	100	85,24	Cuba	Humanos
VEDHAGIRI *et al.*, 2013	Proteína recombinante (LipL32)	IgM	96,4	90,4	Índia	Humanos
BOURHY; VRAY; PICARDEAU, 2013	*L. fainei* (Tratamento: Formol/fervura)	IgM	94	99	França	Humanos
SIVAKOLUNDU *et al.*, 2012	Proteína recombinante (*HbpA)*	IgG (uveíte)	93	58	Índia	Humanos
TANGANUCHITCHARNCHAI *et al.*, 2012	Kit ELISA (Standard Diagnostics, Yongin-si, South Korea)	IgM	95	41	Laos	Humanos
DESAKORN *et al.*, 2012	Kit ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Austrália)	IgM	Uma amostra: 30,8 Amostra pareada: 76,1	Uma amostra: 90,7 Amostra pareada: 82,6	Tailândia	Humanos
CHALAYON *et al.*, 2011	Proteína recombinante (LipL41, LipL32, LipL21 e Loa22)	IgG	56,70 (LipL32) 57,81 (Loa22) 29,85 (LipL41) 41,79 (LipL21)	96,77 (LipL32) 100 (Loa22) 96,77 (LipL41) 98,38 (LipL21)	Tailândia	Humanos
LA-ARD *et al.*, 2011	Proteína recombinante (Região conservada de LigA e LigB)	IgG	84,5	76,9	Tailândia	Cães
AVIAT *et al.*, 2010	Peptídeos sintéticos (Hap1/LipL32)	IgG e IgM	IgM: 44 IgG: 85	NI	França	Humanos
TROMBERT-PAOLANTONI *et al.*, 2010	Kit ELISA (InstitutVirion/Serion GmbH, Warburg, Alemanha)	IgM	90	82	França	Humanos
CÉSPEDES; BALDA; GLENNY, 2008	*Pool* de cepas: Icterohaemorrhagiae cepa Icterohaemorrhagiae, Australis cepa Jez Bratislava, Ballum cepa MUS 127, Canicola cepa Hond Utrecht IV, Cynopteri cepa 3522 C, Grippotyphosa cepa Moskova Vm	IgM	73,7	80	Peru	Humanos

	(Tratamento: nitrogênio líquido/sonificação)					
DEY *et al.*, 2008	Proteína recombinante (LipL32)	IgM	96	91	Índia	Humanos
NATARAJASEENIVASAN *et al.*, 2008	Proteína recombinante (OmpL1 e LipL41)	IgM	91,1 (OmpL1) 89,3 (LipL41)	86,5 (OmpL1) 89,2 (LipL41)	Ilhas Andamã (Índia)	Humanos
DEY *et al.*, 2007	Proteína recombinante (LipL32) (Para dipstick ELISA)	IgG	95,9	93,8	Índia	Cães
TOMICH *et al.*, 2007	Proteína recombinante (LipL32)	IgG	99,33	86,33	Brasil	Bovinos
MARIYA *et al.*, 2006	Proteína recombinante (LipL41)	IgG	100	85,3	Índia	Bovinos
OOTEMAN; VAGO; KOURY, 2006	Kit ELISA (Panbio Pty., Ltd., Queensland, Austrália)	IgM	96,6	93,3	Brasil	Humanos
DEY *et al.*, 2004	Proteína recombinante (LipL32)	IgG	96,9	97,3	Índia	Cães

3.1.8 Uso de antimicrobianos para tratamento em animais

Informações sobre a susceptibilidade de isolados de *Leptospira* a antimicrobianos são escassos. Estudos demonstraram que essas bactérias são resistentes a sulfametoxazol, trimetoprim e neomocina e sensíveis a penicilina, amoxicilina, cefalexina, ceftriaxona, doxiciclina, tetraciclina, estreptomicina, espectinomicina e polimixina (SUEPAUL *et al.*, 2015; BENACER *et al.*, 2017; LIEGEON; DELORY; PICARDEAU, 2018).

Em rebanhos (bovinos, ovinos, suínos, caprinos) têm sido preconizado o uso da estreptomicina, na dose única de 25 mg/kg, por via intramuscular. Com esse procedimento, espera-se eliminar os sinais clínicos e o estado de portador. Esse protocolo e suas variações têm demonstrado diferentes resultados, dependendo da fase da infecção e da estirpe infectante (GENOVEZ, 2016). Em pesquisa recente, com estirpes isoladas de bovinos no Brasil, foi detectada uma redução a susceptibilidade a estreptomicina, demonstrando que protocolos com dose única dessa medicação, comumente utilizados no Brasil, podem não ser eficientes (CORREIA; LOUREIRO; LILENBAUM, 2018).

Em cães, inicialmente deve-se evitar o uso de fármacos nefrotóxicos. Por isso, o tratamento de eleição na fase aguda da doença tem sido realizado com penicilina. No atendimento do animal, recomenda-se o uso de penicilina cristalina na dose de 40.000 UI/Kg, por via endovenosa. Na sequência, aplica-se a mesma dose de penicilina benzatina via subcutânea ou intramuscular. Caso a filtração glomerular esteja normal, a penicilina cristalina será totalmente excretada via renal em seis horas, já a penicilina benzatina manterá níveis terapêuticos por 5 a 7 dias. Após cinco dias, pode-se repetir a aplicação da penicilina benzatina (PAES, 2016).

Com a recuperação da função renal do animal, a estreptomicina (5 a 10 mg/kg, a cada 24 horas, durante três dias) passa a ser o antimicrobiano de eleição para eliminação da *Leptospira* do interior das células tubulares renais, embora a doxiciclina seja usada como alternativa de tratamento (GOLDSTEIN, 2010). No caso de quadros pulmonares, pode haver uma complicação da saúde do animal por bactérias oportunistas. Para evitar esse processo, pode-se utilizar antimicrobianos de amplo espectro, como ceftiofur, que além de combater microrganismos oportunistas é capaz de eliminar a *Leptospira* dos túbulos renais (PAES, 2016).

3.1.9 Vacinas convencionais disponíveis para animais

A vacinação utilizada em animais tem a função de proteger o animal e também evitar o risco de transmissão da bactéria para humanos. As vacinas disponíveis comercialmente são, em sua maioria, produzidas a partir da inativação do cultivo de *Leptospira*, e estão em uso há mais de 100 anos (ELLIS, 2015). Entretanto, efeitos colaterais devido a presença de componentes do meio de cultura, reações locais e sistêmicas aos componentes bacterianos e ausência de proteção contra sorovares do mesmo sorogrupo têm dificultado a sua aplicação. Outros fatores limitantes são a grande variabilidade de cepas de *Leptospira* de região para região, a falta de repetibilidade na produção comercial e ausência de proteção ou memória de curta duração, o que exige doses de reforço (BASHIRU; BAHAMAN, 2018).

O LPS é responsável pela indução da produção de anticorpos. Esse antígeno é timo independente e não induz a produção de células de memória, produzindo assim uma imunidade curta, com necessidade de reforços vacinais anuais (DELLAGOSTIN *et al.*, 2017). A eficácia das vacinas pode ser analisada em laboratório com o uso de animais suscetíveis, e depois nas espécies alvo por testes de imunização e desafio. A soroconversão pode ser um parâmetro para presumir a imunidade, porém testes de desafio são necessários para a confirmação (FAINE, 1999).

Devido à falta de reatividade cruzada entre os diferentes sorovares, vacinas polivalentes tem sido amplamente utilizadas em cães, suínos e bovinos, gerando resposta satisfatória (ELLIS, 2015). As bacterinas utilizadas em cães contêm normalmente quatro sorovares e estão disponíveis em vários países. O Brasil tem produção nacional dessas vacinas e também realiza sua importação; elas contém os sorogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae e frequentemente incluem também os sorovares Pomona e Grippotyphosa (SYKES *et al.*, 2011). As vacinas disponíveis para bovinos podem conter mais que oito sorovares, incluindo Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Canicola Grippotyphosa e Wolffi (ELLIS, 2015). No entanto, há controvérsias com relação a habilidade da vacinação em proteger contra a colonização renal, eliminação bacteriana e transtornos reprodutivos (FAINE, 1999).

Os pontos negativos enfatizam a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para produção de vacinas seguras e eficazes. Novas estratégias como desenvolvimento de vacinas de subunidades (Duramune, Fort Dodge, EUA), compostas apenas de componentes imunogênicos de *Leptospira*, estão disponíveis no mercado (BASHIRU; BAHAMAN, 2018). O crescente número de genomas de

Leptospira sequenciados e disponíveis em bases de dados vem propiciando novas oportunidades para pesquisas de antígenos vacinais com o uso da vacinologia reversa (DELLAGOSTIN *et al.*, 2017). Dados sobre essa ferramenta estão apresentados no item 3.2 dessa revisão.

*3.*2. Identificação *in silico* de proteínas candidatas a diagnóstico da leptospirose e produção de vacinas

3.2.1 Genomas de *Leptospira* disponíveis para estudos na área de bioinformática

As primeiras duas sequências de genomas de *Leptospira* foram publicadas em 2003 e 2004, para *L. interrogans* sorovar Lai e Copenhageni, respectivamente (REN. *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004a). Na sequência foram publicados os genomas da saprófita *L. biflexa* (PICARDEAU *et al.*, 2008), as patogênicas *L. borgpetersenni* (BULACH *et al.*, 2006) e *L. santarosai* (CHOU *et al.*, 2012) e a intermediária *L. licerasiae* (RICALDI *et al.*, 2012).

Atualmente mais de 300 genomas de *L. interrogans* estão acessíveis em bases de dados de acesso público do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) (NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2017). Os genomas de *Leptospira* possuem entre 3.9-4.6 Mbp, na dependência da estirpe e da espécie, e é composto por dois cromossomos circulares. Um terceiro replicon circular, designado como p74, foi encontrado em *L. biflexa* (EVANGELISTA; COBURN, 2010). Estudos também trouxeram contribuição na identificação da diversidade genômica em espécies patogênicas. Recentemente, uma ilha genômica de 54-kb, LaiGI foi confirmada como um replicon extracromossomal estável em *L. interrogans* sorovar Lai (HUANG *et al.*, 2014). Dois plasmídeos, pGui1 e pGui2, foram encontrados em *L. interrogans* patogênica estirpe Gui44 e três plasmídeos, lcp1, lcp2, and lcp3, em *L. interrogans* patogênica estirpe 56609 (ZHU *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015).

3.2.2 O processo da vacinologia reversa

O termo vacinologia reversa foi usado pela primeira vez há aproximadamente duas décadas para referenciar pesquisas de alvos imunogênicos realizadas de maneira inversa, pois elas partiram do genoma de organismos e não de culturas *in*

vitro (RAPPUOLI, 2001). Em comparação aos métodos tradicionais de pesquisa, os quais requerem um processo laborioso de seleção de componentes individuais imunogênicos, a vacinologia reversa oferece a possibilidade de utilizar a informação do genoma a partir de análises computacionais (*in silico*) de organismos sequenciados. Essa técnica pode reduzir significativamente o custo e o tempo necessário para identificação de alvos vacinais, e torna possível a identificação dos potenciais antígenos de todos os patógenos, incluindo aqueles que são difíceis ou impossíveis de serem cultivados (SETTE; RAPPUOLI, 2010). Seguindo o mesmo princípio da vacinologia reversa, é possível também identificar e selecionar antígenos com potencial para comporem kits de diagnóstico, utilizando análises *in silico* (MUSTAFA, 2013).

Todas as fases de leitura abertas (do inglês *open reading frames-ORFs*), que são as regiões codificantes de proteína da sequência genômica, são avaliadas pelos programas computacionais de bioinformática para determinar as potenciais proteínas candidatas, e considera-se que todas elas serão expressas em um determinado momento do ciclo de vida do patógeno. Essa técnica não é capaz de detectar antígenos não proteicos, como polissacarídeos e glicolipídeos (SANTOS *et al.*, 2011). Os primeiros estudos usando essa metodologia identificaram vários candidatos vacinais nas pesquisas com *Neisseria meningitidis* (PIZZA *et al.*, 2000) e *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN *et al.*, 2001). Considerando-se apenas o ano de 2018, vários trabalhos foram publicados utilizando a vacinologia reversa para estudos de importantes doenças em medicina veterinária, tais como campilobacteriose (MEUNIER *et al.*, 2018), leptospirose (VALIDI *et al.*, 2018), circovirose suína (YU *et al.*, 2018), criptosporidiose (TOMAZIC *et al.*, 2018), toxoplasmose (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2018) e leishmaniose (VAKILI *et al.*, 2018).

Para avaliar a viabilidade do uso da proteína como candidata a antígeno, deve-se tentar conhecer sua abundância e localização na célula, além das suas características de imunogenicidade e patogenicidade (DE ALVARENGA MUDADU; CARVALHO; LECLERCQ, 2015). Os projetos iniciais com vacinologia reversa analisavam um único genoma (PIZZA *et al.*, 2000), o que tornou difícil a obtenção de bons resultados para microrganismos com grande variabilidade genética dentro da espécie (DE ALVARENGA MUDADU; CARVALHO; LECLERCQ, 2015). Com o crescente número de genomas disponíveis em bases de dados nas últimas décadas,

novas metodologias surgiram para aprimorar os projetos com vacinologia reversa. As pesquisas evoluíram para incluir a análise de vários genomas de uma mesma espécie (análise *pan* genômica), entre espécies relacionadas evolutivamente (genômica comparativa) ou entre estirpes patogênicas e comensais (genômica comparativa/subtrativa)(SEIB; ZHAO; RAPPUOLI, 2012).

As novas metodologias ajudaram na identificação do chamado *core genome,* o qual corresponde ao *pool* dos genes que são ubiquamente distribuídos em todas as estirpes de uma espécie (MAURY *et al.*, 2016). É possível também a identificação de grupos de genes ortólogos, em genomas de procariotos, o que permite a comparação entre espécies diferentes, facilita a classificação de famílias de proteínas e a identificação de candidatos para a produção de vacinas e/ou diagnóstico (LI; STOECKERT; ROOS, 2003).

Como não é viável fazer a análise de todas as proteínas codificadas em um genoma, softwares foram também desenvolvidos para a predição da localização das proteínas, com o interesse especial por proteínas que sejam exportadas para a superfície do microrganismo alvo ou secretada para o meio externo (BARINOV *et al.*, 2009). Essa análise é baseada na predição de características estruturais da proteína, como: barril beta transmembrana, alfa hélices transmembrana, peptídeo sinal e lipoproteínas. Como consequência, as proteínas citoplasmáticas são descartadas da maioria dos estudos de vacinologia reversa (DELLAGOSTIN *et al.*, 2017).

3.2.3 Imunoinformática

Em geral, apesar dos usos de diversos *softwares* para predição dos melhores alvos antigênicos proteicos, os estudos que utilizam a vacinologia reversa resultam em um grande número de candidatos, o que torna as etapas seguintes de clonagem gênica, expressão de proteínas e testes de caracterização *in vitro* e *in vivo* onerosas e demoradas (SANTOS *et al.*, 2011). Uma solução para minimizar a quantidade de proteínas candidatas está na imunoinformática (BACKERT; KOHLBACHER, 2015).

Os *softwares* utilizados nessa etapa buscam identificar peptídeos candidatos que possuem a maior probabilidade de ligação às moléculas do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I e II (WANG; WANG; LI, 2018). Os peptídeos ligantes ao MHC I possuem uma sequência linear de aminoácidos que varia de oito a 11 resíduos. Os peptídeos ligantes ao MHC II são conformacionais e possuem de 13 a 17 resíduos de aminoácidos (YU *et al.*, 2002). Os epítopos com a maior

probabilidade de se ligarem ao MHC I são relacionados à montagem de uma resposta adaptativa do tipo celular, por meio da ativação de linfócitos T CD8+, enquanto que os epítopos ligados ao MHC II são associados à resposta adaptativa humoral, por meio da ativação de linfócitos T CD4+ (WANG; WANG; LI, 2018). O *software Vaxign* identifica os alvos candidatos, predizendo a probabilidade de interação às moléculas de MHC I e MHC II e segrega as proteínas antigênicas com similaridade às proteínas do hospedeiro (HE; XIANG; MOBLEY, 2010).

Na seleção de alvos antigênicos, deve-se identificar as proteínas que possuem na sua composição sequências peptídicas lineares ou conformacionais para as quais existem as melhores chances de reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (TIZARD, 2014). Nesse contexto, uma única proteína será capaz de gerar uma resposta imunológica, uma vez que tenha em sua composição sequências determinantes de antigenicidade (epítopos), porém, há algumas regiões desnecessárias e que podem até prejudicar a imunogenicidade. Podemos identificar, por meio da imunoinformática, as sequências peptídicas que contêm apenas os epítopos mais imunogênicos (LI *et al.*, 2014). Como eles são os determinantes antigênicos dentro de proteínas maiores, devem ser capazes de gerar resposta imunológica e ao mesmo tempo diminuir as chances de gerar respostas alergênicas. Contudo, devido ao tamanho relativamente pequeno dos peptídeos, muitas vezes eles requerem o uso de adjuvantes para indução de uma boa resposta imune (AGUILAR; RODRIGUEZ, 2007).

Após a identificação da proteína e seleção dos seus melhores epítopos, a síntese química dos peptídeos pode ser realizada (LEE *et al.*, 2016). Os testes imunológicos da composição vacinal resultante podem ser conduzidos *in vitro* e em modelos animais adequados para determinação da segurança e eficácia, seguindo então para ensaios pré-clínicos e clínicos (SETTE; RAPPUOLI, 2010). As vacinas peptídicas são consideradas seguras e econômicas quando comparada às vacinas produzidas com antígenos totais. Esses peptídeos também têm potencial para comporem kits de diagnóstico sorológico, os quais devem passar por etapas de validação (VAN REGENMORTEL, 2001).

3.2.4 Estudos de pan genômica e genômica comparativa/subtrativa em *Leptospira*

O *core* genoma inclui todos os genes responsáveis pelos aspectos básicos da biologia de uma espécie e os seus traços fenotípicos mais importantes. Nos estudos com espécies patogênicas de *Leptospira*, as análises do *core* genoma encontraram importantes informações de candidatos potenciais a vacinas e/ou diagnóstico, incluindo toxinas e fatores de virulência (DELLAGOSTIN *et al.*, 2017).

A comparação de genomas de duas espécies patogênicas (*L. borgpeterseni, L. interrogans)* e uma saprófita (*L. biflexa*) identificou 2.052 proteínas pertencentes ao *core* genoma e 1.431 proteínas específicas de *Leptospira* patogênicas. Entre as proteínas pertencentes as espécies patogênicas, 62,4 % (893/1.431) foram descritas como sem função definida, o que sugere mecanismos únicos na sobrevivência das bactérias patogênicas (PICARDEAU *et al.*, 2008). A análise comparativa das sequências genômicas de dois sorovares patogênicos de *L. interrogans* (Copenhageni e Lai) revelaram diferentes mecanismos envolvidos na fisiologia e patogenicidade, os quais foram associados com a adaptação desses sorovares a diferentes hospedeiros (NASCIMENTO *et al.*, 2004a).

Em outro estudo, foram analisados os genomas de 17 espécies de *Leptospira* e identificados 17.477 genes no *pan* genoma e 1.764 genes no *core* genoma (FOUTS *et al.*, 2016). No mesmo ano, pesquisadores sequenciaram o genoma de 102 *Leptospiras* patogênicas isoladas de treze diferentes países. Esses isolados pertenciam a 18 diferentes espécies, para as quais foram identificados 1.023 genes no *core* genoma e 57.765 genes no *pan* genoma (XU *et al.*, 2016). Na análise do pan genoma de 17 estirpes de *L. interrogans* foram encontradas 633 proteínas preditas como expostas na membrana, das quais 190 pertenciam ao *core* genoma. Os resultados contribuíram para a predição de alvos antigênicos e também forneceram dados sobre mecanismos de patogenicidade do microrganismo (ZENG *et al.*, 2017).

3.2.5 Proteínas hipotéticas (PHs) antigênicas com potencial para uso no diagnóstico da leptospirose

As PHs podem compor quase a metade de muitos genomas procariotos, são codificadas por *open read frames* identificáveis, porém para a qual nenhum produto proteico foi confirmado ou caracterizado. Provavelmente as PHs sejam importantes

na sobrevivência do patógeno e, por isso, sejam promissores como marcadores de infecção (GAZI *et al.*, 2016).

Algumas PHs são conservadas em todos os membros de um gênero taxonômico e tem potencial como fator de virulência .O ELISA indireto (ELISAi), utilizando PHs, é promissor, pois apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, assim como altos valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) (OLIVEIRA *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2017).

A análise do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni por programas de bioinformática identificou várias proteínas hipotéticas (GAMBERINI *et al.*, 2005). Duas proteínas hipotéticas conservadas, denominadas MPL17 e MPL21 e codificadas pelos genes LIC10765 e LIC13131, respectivamente, foram produzidas na forma recombinante e testadas em ELISAi para detecção da leptospirose humana. A especificidade do ensaio foi estimada em 95,5% para MPL17 e 80,6% para MPL21 quando amostras controle negativas de soro de indivíduos com outras doenças febris e também indivíduos saudáveis foram testadas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Anticorpos presentes no soro de pacientes soropositivos para leptospirose também foram capazes de reconhecer as proteínas hipotéticas recombinantes Lsa27 (LIC12895) (LONGHI *et al.*, 2009), Lsa32 (LIC11089) (DOMINGOS *et al.*, 2015), Lsa46 (LIC13479) e Lsa77 (LIC10050) (TEIXEIRA *et al.*, 2015). As proteínas recombinantes Lsa44 (LIC10645) e Lsa45 (LIC10731) foram capazes de eliciar uma resposta imune humoral e celular em hamsters, além de também serem reconhecidas por anticorpos de humanos soropositivos (FERNANDES *et al.*, 2014).

A predição de regiões determinantes de antigenicidade (epítopos) nas PHs é potencialmente importante para melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico (GAZI *et al.*, 2016). Os peptídeos sintéticos podem ser utilizados no ELISAi pois são promissores para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira*, adicionam precocidade ao diagnóstico e é possível que discriminem os animais infectados dos vacinados (ANDRE-FONTAINE *et al.*, 2015). O ELISAi tem potencial para atender à demanda mundial por plataformas de diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade, elevados valores preditivos e acurácia, significativa concordância com o MAT e que diagnostiquem precocemente a infecção por *Leptospira* (SANKAR *et al.*, 2010).

3.3 Produção de anticorpos IgY em modelo aviário

3.3.1 Características gerais dos anticorpos IgY

Desde a década de 1990, o uso de anticorpos da gema do ovo (anticorpos IgY) como método alternativo tem sido recomendado pelo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) para refinar, reduzir e substituir o uso de animais de laboratório (SCHADE *et al.*, 2005). As galinhas possuem três classes de anticorpos: IgM, IgA e IgY, enquanto mamíferos têm cinco classes, IgM, IgA, IgG, IgE e IgD (HE *et al.*, 2014; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2018). A resposta imune primária em mamíferos e aves é caracterizada por maiores títulos de anticorpos IgM. Ao contrário, a resposta imune secundária caracteriza-se pelo significatico aumento de produção dos anticorpos IgY ou IgG (ARNOLD; CHUNG, 2018).

A transferência de anticorpos maternos ajuda na proteção do descendente, até que a resposta imune adaptativa se torne completamente eficaz. Nas galinhas esse fenômeno ocorre pela passagem de anticorpos maternos séricos do sangue para a gema do ovo (SCHADE *et al.*, 2005). Embora IgM e IgA sejam transferidas para a clara do ovo, quando comparadas à IgY armazenada na gema, as concentrações são insignificantes. Considerando a hierarquia folicular na galinha (aproximadamente cinco dias para a formação de ovócito maduro), há uma diferença de tempo entre a detecção dos anticorpos IgY no sangue e sua transferência para a gema (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2012; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2018).

A quantidade de anticorpos IgY/mL de gema independe do tamanho do ovo. A concentração média pode variar de 100 mg a 200 mg/gema, em função do *background* genético da galinha (HE *et al.*, 2014). Combinando a capacidade da indústria avícola de produzir milhares de ovos por dia e uma infra-estrutura para fracionamento e purificação eficientes de proteínas de gema de ovo, há o potencial para a geração de milhares de gramas de anticorpos diariamente (LANZARINI *et al.*, 2018).

O uso de anticorpos IgY policlonais, em substituição aos anticorpos IgG, para aplicações biomédicas possui várias vantagens logistícas, entre elas: não há necessidade de exsanguinação, a purificação de IgY é relativamente rápida e de fácil execução e a manutenção de aves em biotérios tem uma maior relação custo-benefício em comparação com mamíferos (LANZARINI *et al.*, 2018). Como vantagem biológica, a distância filogenética entre galinhas e mamíferos, faz com que as aves apresentem um repertório de especialidades de anticorpos diferente dos mamíferos e

que reconheçam de maneira robusta os alvos antigênicos mamíferos. Além disso, os anticorpos IgY não interagem com receptores para fragmento Fc e nem ativam o Sistema Complemento de mamífero e, também, não sofrem interferência do fator reumatoide (CARLANDER *et al.*, 2000). Dessa forma, a utilização de anticorpos IgY pode evitar a ocorrência dos resultados falso-positivos durante a execução de imunoensaios em protocolos com mamíferos (SCHADE; HLINAK, 1996).

3.3.2 Características dos antígenos e sua aplicação

As vias de administração de antígenos em galinhas são semelhantes às usadas em mamíferos. Foram realizadas imunizações via intradérmica, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa e todas mostraram-se capazes de elicitar resposta imune em galinhas. Para galinhas, a aplicação do antígeno via intramuscular no músculo peitoral é a mais utilizada, com o inóculo dividido em pelo menos dois locais de aplicação (ZHANG *et al.*, 2011). A administração oral do antígeno também pode ser usada (MAYO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2017). A via endovenosa é uma opção de via de aplicação de *booster,* para aumentar o título final de anticorpos, entretanto, a administração deve ser cuidadosa, lenta e sem a adição de adjuvantes (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005).

De acordo com a aplicação do anticorpo, para cada antígeno existe uma concentração ótima e um adjuvante mais indicado. Nesse contexto, não há um único programa para imunização de aves. A concentração de antígenos, por inoculação, possui uma ampla faixa de valores, variando de 10µg a 1 mg (PARMA *et al.*, 2011; QU *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). O número de inoculações depende tanto da imunogenicidade quanto da concentração do antígeno e, também, do adjuvante utilizado. Normalmente é feita uma imunização primária seguida de pelo menos dois *booster* com intervalos mínimos de 14 dias entre cada um (SCHADE; HLINAK, 1996; PARMA *et al.*, 2011; QU *et al.*, 2011). As gemas, já separadas da clara, podem ser reunidas em *pool* e congeladas (-20°C) para posterior purificação de anticorpos (PARMA *et al.*, 2011).

Apesar de diversos trabalhos com adjuvantes já terem sido publicados, as prepações com adjuvantes de Freund e sais de alumínio são as mais frequentemente utilizadas em animais de experimentação (VOGEL; POWELL, 1995; MARCQ *et al.*, 2013). O adjuvante completo de Freund (ACF) contém óleo mineral acrescido de *Mycobacterium* spp. inativado e é usado para estimular inicialmente o sistema

imunológico (BILLIAU; MATTHYS, 2001). O adjuvante incompleto de Freund (AIF) é desprovido de *Mycobacterium* spp., contendo apenas óleo mineral e é usado para potencializar respostas de imunização secundária. Os adjuvantes à base de alumínio consistem principalmente de óxido de alumínio e hidróxido de alumínio (GUVEN *et al.*, 2013). Coletivamente, ACF/AIF e adjuvantes à base de alumínio demonstraram ser os mais bem sucedidos na estimulação de anticorpos de alta afinidade para a geração de anticorpos policlonais e monoclonais em galinhas (LEE *et al.*, 2017).

3.3.3. Purificação e caracterização dos anticorpos

O processo de purificação de anticorpos IgY é iniciado com a separação da gema e da clara do ovo (AMARAL *et al.*, 2002). Em seguida é retirada a membrana vitelínica que circunda a gema e, na sequência, é removida a fração lipídica da gema. Um protocolo acessível e de fácil execução é a precipitação dos lipídeos com água acidificada (pH entre 5,0 e 5,2). A fração solúvel em água, após delipidação, está enriquecida em anticorpos IgY. (SCHADE *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, 2002; PARMA *et al.*, 2011). Alternativas para a delipidação incluem o polietilenoglicol (PEG 6.000), a goma xantana e os solventes orgânicos. A escolha dependerá do objetivo da aplicação do anticorpo (SCHADE *et al.*, 2005). A extração dos anticorpos IgY da fração solúvel em água pode ser realizada por meio de *salting-out* com sulfato de sódio ou de amônio, por gel filtração por meio de exclusão de massa molecular e por cromatografia por afinidade (SUI; CAO; LIN, 2011; REN *et al.*, 2016). O resultado da extração é verificado em gel de poliacrilamida após eletroforese. Normalmente, a caracterização dos IgY é realizada por ELISA e *Western blotting* (SDS-PAGE) (DE PAULA *et al.*, 2011; TONG *et al.*, 2015).

3.3.4 Aplicações dos anticorpos policlonais

A distância filogenética entre as galinhas e os mamíferos aumenta as possibilidades da aplicação dos anticorpos IgY em pesquisas visando a terapêutica e o diagnóstico de doenças infecciosas (TINI *et al.*, 2002).

Os anticorpos IgY podem ser utilizados na imunização passiva contra doenças do trato gastrintestinal, tais como a rotavirose humana ou bovina, a coronavirose bovina, as gastroenterites virais em suínos, a colibacilose e a salmonelose (DIRAVIYAM *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; THU *et al.*, 2017). Os anticorpos IgY desenvolvidos contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus,* causadores de

mastite bovina, também são promissores, pois inibiram o crescimento bacteriano (ZHEN *et al.*, 2008; ZHEN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). De maneira adicional, anticorpos IgY desenvolvidos contra um peptídeo sintético de um agonista do *Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL-2) induziram, *in vitro*, a apoptose de células mamárias tumorais humanas (AMIRIJAVID *et al.*, 2016).

A tecnologia IgY também pode ser aplicada em vários métodos diagnósticos, podendo os anticorpos ser empregados em cromatografia de afinidade (LU *et al.*, 2012), em ELISAi (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2012); acoplados a *beads* imunomagnéticas para detecção de antígenos solúveis (NIE *et al.*, 2014); para imunohistoquímica e imunofluorescência (MIURA *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2018); reconhecimento de antígenos imobilizados em membranas de nitrocelulose por meio de *Western blot* (BRUJENI; GHARIBI, 2012); em ensaios de reconhecimento de antígenos tumorais (GRZYWA *et al.*, 2015); para neutralização de peçonha de serpentes (NAVARRO *et al.*, 2016) e para estudos de proteínas antigênicas em agentes microbianos (TAVARES *et al.*, 2013; MORENO *et al.*, 2016; VILLAGUALA *et al.*, 2016).

4. REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012

AGAMPODI, S. B.; MATTHIAS, M. A.; MORENO, A. C.; VINETZ, J. M. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clinical Infectious Disease**, v. 54, n. 9, p. 1249-1255, 2012. https://doi.org/10.1093/cid/cis035

AGUIAR, D. M.; GENNARI, S. M.; CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B.; VASCONCELLOS, S. A.; RODRIGUES, A. A. R.; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A. Seroprevalence of Leptospira spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon**. Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 102-104, 2006. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200007

AGUILAR, J. C.; RODRIGUEZ, E. G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3752-3762, 2007. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.111

AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic Leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7093, 2009. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093

AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE MDE, L.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG'U, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Annals of Clinical Microbioloy Antimicrobials**, v. 5, n., p. 28, 2006. https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28

ALIZADEH, S. A.; ABDOLAHPOUR, G.; POURMAND, M. R.; NASERPOUR, T.; NAJAFIPOUR, R.; ESHRAGHI, S. S. Evaluation of New ELISA based on rLsa63 - rLipL32 antigens for serodiagnosis of Human Leptospirosis. **Iran Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 184-189, 2014. https://doi.org/10.5812/ircmj.14753

ALLAN, K. J.; BIGGS, H. M.; HALLIDAY, J. E.; KAZWALA, R. R.; MARO, V. P.; CLEAVELAND, S.; CRUMP, J. A. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 9, p. e0003899, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003899

AMARAL, J. A.; TINO DE FRANCO, M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; CARBONARE, S. B. Anti-enteropathogenic Escherichia coli immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n. 3, p. 229-234, 2002. https://doi.org/10.1053/rvsc.2002.0551

AMIRIJAVID, S.; ENTEZARI, M.; MOVAFAGH, A.; HASHEMI, M.; MOSAVI-JARAHI, A.; DEHGHANI, H. Apoptotic Killing of Breast Cancer Cells by IgYs Produced Against a Small 21 Aminoacid Epitope of the Human TRAIL-2 Receptor. **Asian Pacific Jounal os Cancer Prevention**, v. 17, n. S3, p. 293-297, 2016. https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.S3.293

ANDRE-FONTAINE, G.; AVIAT, F.; MARIE, J. L.; CHATRENET, B. Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154-178). **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n., p. 1-8, 2015. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.12.002

ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis--do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 19-24, 2006. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.005

APPASSAKIJ H, SILPAPOJAKUL K, WANSIT R, WOODTAYAKORN J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 52, n. 4, p. 340-343, 1995. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.340

ARNOLD, K. B.; CHUNG, A. W. Prospects from systems serology research. **Immunology**, v. 153, n. 3, p. 279-289, 2018. https://doi.org/10.1111/imm.12861

ARTEAGA-TRONCOSO, G.; JIMÉNEZ-ESTRADA, J. M.; MONTES DE OCA-JIMENEZ, R.; LÓPEZ-HURTADO, M.; LUNA-ALVAREZ, M.; HERNANDEZ-ANDRADE, L.; MORENO-ALFARO, A.; GALAN-HERRERA, J. F.; GUERRA-INFANTE, F. M. Seroprevalence and risk factors associated with within-flock transmission of Leptospira interrogans in transhumant farming systems in Mexico. **Epidemiology and Infection**, v. 10.1017/S0950268814003549, n., p. 1-9, 2015. https://doi.org/10.1017/S0950268814003549

ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; KO, A. I.; REIS, M. G. Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.10.012

AVIAT, F.; ROCHEREAU-ROULET, S.; BRANGER, C.; ESTAVOYER, J. M.; CHATRENET, B.; ORSONNEAU, J. L.; THORIN, C.; ANDRE-FONTAINE, G. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 375-387, 2010. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.01.001

BACKERT, L.; KOHLBACHER, O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. **Genome Medicine**, v. 7, n., p. 119, 2015. http://dx.doi.org/10.1186/s13073-015-0245-0. https://doi.org/10.1186/s13073-015-0245-0

BACKSTEDT, B. T.; BUYUKTANIR, O.; LINDOW, J.; WUNDER, E. A.; REIS, M. G.; USMANI-BROWN, S.; LEDIZET, M.; KO, A.; PAL, U. Efficient Detection of Pathogenic Leptospires Using 16S Ribosomal RNA. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p., 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128913

BARINOV, A.; LOUX, V.; HAMMANI, A.; NICOLAS, P.; LANGELLA, P.; EHRLICH, D.; MAGUIN, E.; VAN DE GUCHTE, M. Prediction of surface exposed proteins in Streptococcus pyogenes, with a potential application to other Gram-positive bacteria. **Proteomics**, v. 9, n. 1, p. 61-73, 2009. https://doi.org/10.1002/pmic.200800195

BARRAGAN, V.; CHIRIBOGA, J.; MILLER, E.; OLIVAS, S.; BIRDSELL, D.; HEPP, C.; HORNSTRA, H.; SCHUPP, J. M.; MORALES, M.; GONZALEZ, M.; REYES, S.; DE LA CRUZ, C.; KEIM, P.; HARTSKEERL, R.; TRUEBA, G.; PEARSON, T. High Leptospira Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. **PLoS Neglected Tropical Disease** , v. 10, n. 9, p., 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004990

BARRAGAN, V.; OLIVAS, S.; KEIM, P.; PEARSON, T. Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of Leptospira spp. **Appl Environmental Microbiology**, v. 83, n. 19, p., 2017. https://doi.org/10.1128/AEM.01190-17

BASHIRU, G.; BAHAMAN, A. R. Advances & challenges in Leptospiral vaccine development. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 147, n. 1, p. 15-22, 2018. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1022_16

BENACER, D.; ZAIN, S. N.; OOI, P. T.; THONG, K. L. Antimicrobial susceptibility of Leptospira spp. isolated from environmental, human and animal sources in Malaysia**. Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 124-128, 2017. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_15_458

BERNHEIMER, A. W.; BEY, R. F. Copurification of Leptospira interrogans serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C**. Infectious and Immunity**, v. 54, n. 1, p. 262-264, 1986.

BESSA, T. A.; SPICHLER, A.; CHAPOLA, E. G.; HUSCH, A. C.; DE ALMEIDA, M. F.; SODRÉ, M. M.; SAVANI, E. S.; SACRAMENTO, D. R.; VINETZ, J. M. The contribution of bats to leptospirosis transmission in Sao Paulo City, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 315-317, 2010. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0227

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M.; CONSORTIUM, P.-U. S. L. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 6, p. 849-860, 2001.

BOONSILP, S.; THAIPADUNGPANIT, J.; AMORNCHAI, P.; WUTHIEKANUN, V.; BAILEY, M. S.; HOLDEN, M. T. G.; ZHANG, C.; JIANG, X.; KOIZUMI, N.; TAYLOR, K.; GALLOWAY, R.; HOFFMASTER, A. R.; CRAIG, S.; SMYTHE, L. D.; HARTSKEERL, R. A.; DAY, N. P.; CHANTRATITA, N.; FEIL, E. J.; AANENSEN, D. M.; SPRATT, B. G.; PEACOCK, S. J. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic Leptospira Species**. PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 1, p., 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954

BOURHY, P.; VRAY, M.; PICARDEAU, M. Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species Leptospira fainei for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 6, p. 822-827, 2013. https://doi.org/10.1099/jmm.0.054304-0

BRAGA, J.; HAMOND, C.; MARTINS, G.; ABREU, R. N.; LILENBAUM, W. Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar Icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 147-150, 2011. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000200009

BROUX, B.; TORFS, S.; WEGGE, B.; DEPREZ, P.; VAN LOON, G. Acute respiratory failure caused by Leptospira spp. in 5 foals. **Jounal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 684-687, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00902.x

BRUJENI, G. N.; GHARIBI, D. Development of DNA-designed avian IgY antibodies for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal cattle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 1, p. 14-23, 2012. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9648-1

BULACH, D.; ADLER, B. Leptospiral Genomics and Pathogenesis. In: ADLER, B. (Ed.). **Spirochete Biology: The Post Genomic Era**. Springer International Publishing, 2018. p. 190-206. https://doi.org/10.1007/82_2018_87

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006. https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103

CABRAL PIRES, B.; BERZIN GRAPIGLIA, J.; MOREIRA, L.; JAEGER, L. H.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LILENBAUM, W. Occurrence of uterine carriers for Leptospira interrogans on slaughtered cows. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n., p. 163-165, 2018. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.056

CANAL, E.; POLLETT, S.; HEITZINGER, K.; GREGORY, M.; KASPER, M.; HALSEY, E.; MEZA, Y.; CAMPOS, K.; PEREZ, J.; MEZA, R.; BERNAL, M.; GUILLEN, A.; KOCHEL, T. J.; ESPINOSA, B.; HALL, E. R.; MAVES, R. C. Detection of human leptospirosis as a cause of acute fever by capture ELISA using a Leptospira interrogans serovar Copenhageni (M20) derived antigen. **BMC Infectious Disiease**, v. 13, n., p. 438, 2013. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-438

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P. E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000. https://doi.org/10.1385/IR:21:1:1

CARVALHO, A. M. R. S.; COSTA, L. E.; SALLES, B. C. S.; SANTOS, T. T. O.; RAMOS, F. F.; LIMA, M. P.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; SILVESTRE, B. T.; PORTELA, Á.; ROATT, B. M.; SILVEIRA, J. A. G.; GONÇALVES, D. U.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; COELHO, E. A. F. An ELISA immunoassay employing a conserved Leishmania hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cellular Immunology**, v. 318, n., p. 42-48, 2017. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.06.001

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; HARTSKEERL, R. A.; AHMED, N.; DELLAGOSTIN, O. A.; ESLABÃO, M. R.; NASCIMENTO, A. L. Bioinformatics describes novel Loci for high resolution discrimination of Leptospira isolates. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e15335, 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015335

CÉSPEDES, M.; BALDA, L.; GLENNY, M. Evaluación de dos ensayos de elisa IgM en la investigación de un brote de Leptospirosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 25, n. 3, p. 333-335, 2008.

CHAGAS-JUNIOR, A. D.; MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; FIGUEIRA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; MCBRIDE, F. W. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. Pt 12, p. 1632-1637, 2009. https://doi.org/10.1099/jmm.0.014050-0

CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.; KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 5, p. 289-297, 2011. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.01.008

CHANDY, S.; KIRUBANANDHAN, L.; HEMAVATHY, P.; KHADEEJA, A. M.; KURIAN, S. J.; VENKATARAMAN, K.; MØRCH, K.; MATHAI, D.; MANOHARAN, A. Serovar prevalence of Leptospira in semirural India and the development of an IgM-based indirect ELISA. **The Journal of Infection in Developing Countries,** v. 11, n. 3, p. 234-241, 2017. https://doi.org/10.3855/jidc.8067

CHASSIN, C.; PICARDEAU, M.; GOUJON, J. M.; BOURHY, P.; QUELLARD, N.; DARCHE, S.; BADELL, E.; D'ANDON, M. F.; WINTER, N.; LACROIX-LAMANDÉ, S.; BUZONI-GATEL, D.; VANDEWALLE, A.; WERTS, C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, Leptospira interrogans. **The Jounal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2669-2677, 2009. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900506

CHEN, X.; LI, S. J.; OJCIUS, D. M.; SUN, A. H.; HU, W. L.; LIN, X.; YAN, J. Mononuclear-macrophages but not neutrophils act as major infiltrating anti-Leptospiral phagocytes during leptospirosis. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181014, 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181014

CHIEBAO, D. P.; VALADAS, S. Y.; MINERVINO, A. H.; CASTRO, V.; ROMALDINI, A. H.; CALHAU, A. S.; DE SOUZA, R. A.; GENNARI, S. M.; KEID, L. B.; SOARES, R. M. Variables Associated with Infections of Cattle by Brucella abortus., Leptospira spp. and Neospora spp. in Amazon Region in Brazil. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 62, n. 5, p. e30-36, 2015: https://doi.org/10.1111/tbed.12201

CHOU, L. F.; CHEN, Y. T.; LU, C. W.; KO, Y. C.; TANG, C. Y.; PAN, M. J.; TIAN, Y. C.; CHIU, C. H.; HUNG, C. C.; YANG, C. W. Sequence of Leptospira santarosai serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 364-370, 2012. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.074

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MØLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007. https://doi.org/10.1128/IAI.01635-06

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CRODA, J.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J. T.; KO, A. I.; PICARDEAU, M.; HAAKE, D. A. The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic Leptospira interrogans**. PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16879, 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016879

CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Effects of rainfall on incidental and host-maintained Leptospiral infections in cattle in a tropical region. **The Veterinary Journal**, v. 220, n., p. 63-64, 2017. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.016

CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Reduced susceptibility in Leptospiral strains of bovine origin might impair antibiotic therapy. **Epidemiology and Infection**, v. 10.1017/S0950268818002510, n., p. 1-6, 2018. https://doi.org/10.1017/S0950268818002510

COSATE, M. R. V.; SAKAMOTO, T.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; MOREIRA, E. C.; REGIS DA SILVA, C. G.; BRASIL, B.; OLIVEIRA, C. S. F.; DE AZEVEDO, V. A.; ORTEGA, J. M.; LEITE, R. C.; HADDAD, J. P. Molecular typing of Leptospira interrogans serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 177, 2017. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 731-734, 1999. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.731

DA SILVA, M. C.; SCHAEFER, R.; GAVA, D.; SOUZA, C. K.; DA SILVA VAZ, I., JR.; BASTOS, A. P.; VENANCIO, E. J. Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. **Journal of Immunological Methods**, v. 461, n., p. 100-105, 2018. https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.06.023

DE ALVARENGA MUDADU, M.; CARVALHO, V.; LECLERCQ, S. Y. Nonclassically secreted proteins as possible antigens for vaccine development: a reverse vaccinology approach. Applied **Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 7, p. 3360-3370, 2015. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1507-4

DE PAULA, V. S.; DA SILVA ADOS, S.; DE VASCONCELOS, G. A.; IFF, E. T.; SILVA, M. E.; KAPPEL, L. A.; CRUZ, P. B.; PINTO, M. A. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 1, p. 102-106, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.008

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; RIZZI, C.; SCHUCH, R. A.; JORGE, S.; OLIVEIRA, T. L.; MCBRIDE, A. J.; HARTWIG, D. D. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 1, p., 2017. https://doi.org/10.3390/ijms18010158

DENEKE, Y.; SABARINATH, T.; GOGIA, N.; LALSIAMTHARA, J.; VISWAS, K. N.; CHAUDHURI, P. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 4, p. 141-146, 2014. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001

DESAKORN, V.; WUTHIEKANUN, V.; THANACHARTWET, V.; SAHASSANANDA, D.; CHIERAKUL, W.; APIWATTANAPORN, A.; DAY, N. P.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; PEACOCK, S. J. Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 524-527, 2012. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0423

DEY, S.; MOHAN, C. M.; KUMAR, T. M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A. M.; NACHIMUTHU, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 1-2, p. 99-106, 2004. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.018

DEY, S.; MOHAN, C. M.; RAMADASS, P.; NACHIMUTHU, K. Recombinant antigen-based dipstick ELISA for the diagnosis of leptospirosis in dogs. **Veterinary Record**, v. 160, n. 6, p. 186-188, 2007. https://doi.org/10.1136/vr.160.6.186

DEY, S.; MOHAN, C. M.; RAMADASS, P.; NACHIMUTHU, K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 2, p. 172-177, 2008.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 173-180, 2010. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011

DIRAVIYAM, T.; ZHAO, B.; WANG, Y.; SCHADE, R.; MICHAEL, A.; ZHANG, X. Effect of Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against Diarrhea in Domesticated Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097716

DOMINGOS, R. F.; FERNANDES, L. G.; ROMERO, E. C.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Novel Leptospira interrogans protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 4, p. 851-864, 2015. https://doi.org/10.1099/mic.0.000041

DRAGHI, M. G.; BRIHUEGA, B.; BENÍTEZ, D.; SALA, J. M.; BIOTTI, G. M.; PEREYRA, M.; HOMSE, A.; GUARINIELLO, L. Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, n. 1, p. 42-44, 2011.

DREYFUS, A.; WILSON, P.; BENSCHOP, J.; COLLINS-EMERSON, J.; VERDUGO, C.; HEUER, C. Seroprevalence and herd-level risk factors for seroprevalence of Leptospira spp. in sheep, beef cattle and deer in New Zealand. **The New Zealand Veterinary Journal**, v. 66, n. 6, p. 302-311, 2018. https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1507770

DU, P.; LI, S. J.; OJCIUS, D. M.; LI, K. X.; HU, W. L.; LIN, X.; SUN, A. H.; YAN, J. A novel Fas-binding outer membrane protein and lipopolysaccharide of Leptospira interrogans induce macrophage apoptosis through the Fas/FasL-caspase-8/-3 pathway. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, p. 135, 2018. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0135-9

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **CurrentTopics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p.99-137, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6

EROL, E. , JACKSON, C. B., STEINMAN, M. , MEARES, K. , DONAHOE, J. , KELLY, N. , LOCKE, S. , SMITH, J. L. AND CARTER, C. N. Diagnosis of equine leptospiral abortions. **Equine Veterinary Journal**, v. 47: p.171-174, 2015. https://doi.org/10.1111/evj.12281

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010. https://doi.org/10.2217/fmb.10.102

EVANGELISTA, K. V.; HAHN, B.; WUNDER, E. A.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; COBURN, J. Identification of cell-binding adhesins of Leptospira interrogans. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 10, p. e3215, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003215

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne: Medisci Press, 1999. 353 p.

FAINE, S., STALLMAN, N.D. Amended descriptions of the genus Leptospira Noguchi, 1917 and the species L. interrogans (Stimson, 1907) Wenyon, 1926 and L. biflexa (Wolbach et Binger, 1914) Noguchi, 1918**. International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 461-463, 1982. https://doi.org/10.1099/00207713-32-4-461

FANG, F.; COLLINS-EMERSON, J. M.; CULLUM, A.; HEUER, C.; WILSON, P. R.; BENSCHOP, J. Shedding and seroprevalence of pathogenic Leptospira spp. in sheep and cattle at a New Zealand Abattoir. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 4, p. 258-268, 2015. https://doi.org/10.1111/zph.12146

FAVERO, J. F.; DE ARAUJO, H. L.; LILENBAUM, W.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; BALDISSERA, M. D.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p.149-154, 2017. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032

FERNANDES, L. G.; VIEIRA, M. L.; KIRCHGATTER, K.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of Leptospira spp. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 10, p. 3679-3692, 2012. https://doi.org/10.1128/IAI.00474-12

FERNANDES, L. G.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of Leptospira spp. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 1, p. 149-164, 2014. https://doi.org/10.1099/mic.0.072074-0

FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R.; SILVA, L. P.; FIGUEREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. Leptospira spp.: Novel insights into host-pathogen interactions**. Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 176, n., p. 50-57, 2016. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.004

FERREIRA JUNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACEDO JUNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A.; CUNHA-

JUNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Production, characterization and applications for Toxoplasma gondii-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40391, 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391

FERREIRA JÚNIOR, Á.; SANTOS, J. P. D.; SOUSA, I. D. O.; MARTIN, I.; ALVES, E. G. L.; ROSADO, I. R. Gallus gallus domesticus: immune system and its potential for generationof immunobiologics. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, p., 2018. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180250

FIGUEIRA, C. P.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte Leptospira biflexa confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiology**, v. 11, n., p. 129, 2011. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-129

FIGUEIREDO, I. L.; ALVES, C. J.; SILVA, L. C. A.; OLIVEIRA, R. M.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose suína: uma importante causa de falhas e perdas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 344-353, 2013.

FLORES-DÍAZ, M.; MONTURIOL-GROSS, L.; NAYLOR, C.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLIEGER, A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 597-628, 2016. https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15

FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; MARSON, P. M.; NOBREGA, D. B.; TEIXEIRA, C. R. Leptospira reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents**. Acta Tropica**, v. 178, n., p. 205-212, 2018. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019

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.; YANG, X. F.; ZHANG, J. J.; VINETZ, J. M. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus Leptospira. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004403, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403

FRAGA, T. R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Complement Evasion by Pathogenic Leptospira. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n., p., 2016. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00623

GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P. N. Application and validation of PFGE for serovar identification of Leptospira clinical isolates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p., 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000824

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-genome analysis of Leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 2, p. 305-313, 2005. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.004

GARCÍA, R. L.; FERAUD, D.; LUGO, S.; MACHADO, H.; ABELEDO, M. A. Comparación entre un ELISA indirecto y la técnica de aglutinación microscópica para la detección de anticuerpos antiLeptospirales en caninos**. Revista de Salud Animal**, v. 36, n. 2, p. 118-123, 2014.

GAZI, M. A.; KIBRIA, M. G.; MAHFUZ, M.; ISLAM, M. R.; GHOSH, P.; AFSAR, M. N.; KHAN, M. A.; AHMED, T. Functional, structural and epitopic prediction of hypothetical proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: An in silico approach for prioritizing the targets. **Gene**, v. 591, n. 2, p. 442-455, 2016. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.057

GENOVEZ, M. E. Leptospirose em animais de produção. In: Mégid, J., Ribeiro, Márcio Garcia, Paes, Antônio Carlos (Ed.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: Roca, 2016, p.356-377.

GHOSH, K. K.; PRAKASH, A.; SHRIVASTAV, P.; BALAMURUGAN, V.; KUMAR, M. Evaluation of a novel outer membrane surface-exposed protein, LIC13341 of Leptospira, as an adhesin and serodiagnostic candidate marker for leptospirosis. **Microbiology**, v. 164, n. 8, p. 1023-1037, 2018. https://doi.org/10.1099/mic.0.000685

GOLDSTEIN, R. E. Canine leptospirosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1091-1101, 2010. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.008

GOMES-SOLECKI, M.; SANTECCHIA, I.; WERTS, C. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n., p., 2017. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00058

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A Gene-Based Positive Selection Detection Approach to Identify Vaccine Candidates Using Toxoplasma gondii as a Test Case Protozoan Pathogen. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n., p. 332, 2018. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00332

GRZYWA, R.; WALCZAK, M.; ŁUPICKA-SŁOWIK, A.; BOBREK, K.; BOIVIN, S.; BROWN, E. L.; GAWEŁ, A.; STEFANIAK, T.; OLEKSYSZYN, J.; SIEŃCZYK, M. Adjuvant-dependent immunogenicity of Staphylococcus aureus Efb and Map proteins in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 166, n. 1-2, p. 50-56, 2015. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.04.009

GUERNIER, V.; GOARANT, C.; BENSCHOP, J.; LAU, C. L. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. **PLoS Neglected Tropical Diseases,** v. 12, n. 5, p., 2018. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006503

GURUMURTHY, K.; NARASIMHA, H. B.; WYAWAHARE, M.; BISWAL, N. Leptospirosis: a diagnostic conundrum. **Tropical Doctor**, v. 48, n. 4, p. 306-309, 2018. https://doi.org/10.1177/0049475518788470

GUVEN, E.; DUUS, K.; LAURSEN, I.; HOJRUP, P.; HOUEN, G. Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways with major involvement of the alternative pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74445, 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074445

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology, v. 146, n. Pt 7, p. 1491-1504, 2000. https://doi.org/10.1099/00221287-146-7-1491

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. 241 - Leptospira Species (Leptospirosis). In: Bennett, J. E., Dolin, R., et al (Ed.). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Content Repository, 2015. p. 2714-2720.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; REIS, J.; KRAUS, E.; PINNA, A.; LILENBAUM, W. Pulmonary hemorrhage in horses seropositive to leptospirosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 413-415, 2011. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000500008

HAMOND, C., MARTINS, G.; LILENBAUM, W, MEDEIROS, M. A. Rapid and efficient diagnosis of leptospirosis in an aborted foal by PCR of gastric juice. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 274-275, 2012. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.030

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 1, p. 81-85, 2014. https://doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x

HARTMANN, K.; EGBERINK, H.; PENNISI, M. G.; LLORET, A.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M. J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Leptospira species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 576-581, 2013. https://doi.org/10.1177/1098612X13489217

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalence and risk factors for Leptospira spp. in cattle herds

in the south central region of Paraná state. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200001

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2642-2650, 2008. https://doi.org/10.1128/IAI.01639-07

HE, J. X.; THIRUMALAI, D.; SCHADE, R.; ZHANG, X. Y. Chronobiological studies of chicken IgY: monitoring of infradian, circadian and ultradian rhythms of IgY in blood and yolk of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 160, n. 3-4, p. 266-272, 2014. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.05.016

HE, Y.; XIANG, Z.; MOBLEY, H. L. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, n., p. 297505, 2010. https://doi.org/10.1155/2010/297505

HERRMANN, G. P.; RODRIGUES, R. O.; MACHADO, G.; MOREIRA, E. C.; LAGE, A.; LEITE, R. C. SEROPREVALENCE OF LEPTOSPIROSIS IN CATTLE IN THE SOUTHEAST AND SOUTHWEST REGIONS OF THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 2012. https://doi.org/10.5216/cab.v13i1.13190

HUANG, L.; ZHU, W.; HE, P.; ZHANG, Y.; ZHUANG, X.; ZHAO, G.; GUO, X.; QIN, J.; ZHU, Y. Re-characterization of an extrachromosomal circular plasmid in the pathogenic Leptospira interrogans serovar Lai strain 56601. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 7, p. 605-611, 2014. https://doi.org/10.1093/abbs/gmu033

IRAOLA, G.; SPANGENBERG, L.; LOPES BASTOS, B.; GRAÑA, M.; VASCONCELOS, L.; ALMEIDA, Á.; GREIF, G.; ROBELLO, C.; RISTOW, P.; NAYA, H. Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in Leptospira biflexa Biofilms. **mSphere**, v. 1, n. 2, p., 2016. https://doi.org/10.1128/mSphere.00042-16

JAEGER, L. H.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. VNTR analysis demonstrates new patterns and high genetic diversity of Leptospira sp. of animal origin in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 183-189, 2018. https://doi.org/10.1111/lam.13008

JAFARI DEHKORDI, A.; SHAHBAZKIA, H.; RONAGH, N. Evaluation of pathogenic serovars of Leptospira interrogans in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR**. Iranian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 135-139, 2011.

KANAGAVEL, M.; SHANMUGHAPRIYA, S.; ANBARASU, K.; NATARAJASEENIVASAN, K. B-cell-specific peptides of Leptospira interrogans LigA for diagnosis of patients with acute

leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 3, p. 354-359, 2014. https://doi.org/10.1128/CVI.00456-13

KIM, S.; LEE, D. S.; SUZUKI, H.; WATARAI, M. Detection of Brucella canis and Leptospira interrogans in canine semen by multiplex nested PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 6, p. 615-618, 2006. https://doi.org/10.1292/jvms.68.615

KITASHOJI, E.; KOIZUMI, N.; LACUESTA, T. L.; USUDA, D.; RIBO, M. R.; TRIA, E. S.; GO, W. S.; KOJIRO, M.; PARRY, C. M.; DIMAANO, E. M.; VILLARAMA, J. B.; OHNISHI, M.; SUZUKI, M.; ARIYOSHI, K. Diagnostic Accuracy of Recombinant Immunoglobulin-like Protein A-Based IgM ELISA for the Early Diagnosis of Leptospirosis in the Philippines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003879, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003879

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009. https://doi.org/10.1038/nrmicro2208

LA-ARD, A.; AMAVISIT, P.; SUKPUARAM, T.; WAJJWALKU, W. Evaluation of recombinant Lig antigen-based ELISA for detection of Leptospiral antibodies in canine sera. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 1, p. 128-137, 2011

LANZARINI, N. M.; BENTES, G. A.; VOLOTAO, E. M.; PINTO, M. A. Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 39, n. 3, p. 235-248, 2018. https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1500375

LEE, B. S.; HUANG, J. S.; JAYATHILAKA, L. P.; LEE, J.; GUPTA, S. Antibody Production with Synthetic Peptides. **Methods in Molecular Biology**, v. 1474, n., p. 25-47, 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2_2

LEE, W.; SYED ATIF, A.; TAN, S. C.; LEOW, C. H. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, n., p. 71-85, 2017. https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.001

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **Ilar Journal**, v. 46, n. 3, p. 269-279, 2005. https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001. https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001

LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 9, p. 2178-2189, 2003. https://doi.org/10.1101/gr.1224503

LI, W.; JOSHI, M. D.; SINGHANIA, S.; RAMSEY, K. H.; MURTHY, A. K. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515-536, 2014. https://doi.org/10.3390/vaccines2030515

LI, X.; WANG, L.; ZHEN, Y.; LI, S.; XU, Y. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 40, 2015. https://doi.org/10.1186/s40104-015-0038-8

LIBONATI, H. A.; SANTOS, G. B.; SOUZA, G. N.; BRANDAO, F. Z.; LILENBAUM, W. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 7, p. 1625-1629, 2018. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1604-9

LIEGEON, G.; DELORY, T.; PICARDEAU, M. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of Leptospira. International **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 5, p. 693-699, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.12.024

LILENBAUM, W.; DE SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M. C.; FRÁGUAS, S.; CARDOSO, V. A. S.; OELEMANN, W. M. A serological study on Brucella abortus, caprine arthritis-encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 2, p. 408-412, 2007. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.12.003

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; CORDEIRO, A. G.; CAVALCANTI, A.; SOUZA, G. N.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. A. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 1, p. 14-17, 2008a. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.03.011

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDAO, F. Z.; CORTEZ, A.; DE SOUZA, S. O.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 837-842, 2008b. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.027

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of Leptospira spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 16-19, 2009. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.014

LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61 Suppl 1, n., p. 63-68, 2014. https://doi.org/10.1111/tbed.12233

LONGHI, M. T.; OLIVEIRA, T. R.; ROMERO, E. C.; GONCALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified protein of Leptospira interrogans mediates binding to laminin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. Pt 10, p. 1275-1282, 2009. https://doi.org/10.1099/jmm.0.011916-0

LU, Y.; XU, B.; JU, C.; MO, X.; CHEN, S.; FENG, Z.; WANG, X.; HU, W. Identification and profiling of circulating antigens by screening with the sera from schistosomiasis japonica patients. **Parasits and Vectors**, v. 5, n., p. 115, 2012. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-115

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in Leptospira interrogans Sensu Stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005. https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.539-545.2005

MAJOR, A.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. International **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 7, p. 7242-7260, 2014. https://doi.org/10.3390/ijerph110707242

MARCQ, C.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Refinement of the production of antigen-specific hen egg yolk antibodies (IgY) intended for passive dietary immunization in animals. A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 17, n. 3, p., 2013.

MARIYA, R.; CHAUDHARY, P.; KUMAR, A. A.; THANGAPANDIAN, E.; AMUTHA, R.; SRIVASTAVA, S. K. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of Leptospira interrogans serovar canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 5-6, p. 269-277, 2006. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.007

MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; DE BRITO, W. M. E. D.; FIORAVANTI, M. A. C. S.; PARREIRA, I. V. M.; JAYME, V. A. D. S. PREVALENCIA DE ANTUCUERPOS ANTI-Leptospira spp.Y ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN EN EL GANADO VACUNO DE GOIÁS. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. p. 2010. https://doi.org/10.5216/cab.v11i3.5460

MARQUEZ, A.; DJELOUADJI, Z.; LATTARD, V.; KODJO, A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. **International Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 184-193, 2017.

MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Maintenance of Leptospira infection in cattle under tropical conditions. **Veterinary Record**, v. 167, n. 16, p. 629-630, 2010. https://doi.org/10.1136/vr.c5695

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R. C.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012. https://doi.org/10.1007/s11250-011-9964-4

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 11-17, 2014. https://doi.org/10.1007/s11250-013-0480-6

MAURY, M. M.; TSAI, Y. H.; CHARLIER, C.; TOUCHON, M.; CHENAL-FRANCISQUE, V.; LECLERCQ, A.; CRISCUOLO, A.; GAULTIER, C.; ROUSSEL, S.; BRISABOIS, A.; DISSON, O.; ROCHA, E. P. C.; BRISSE, S.; LECUIT, M. Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 308-313, 2016. https://doi.org/10.1038/ng.3501

MAYO, S.; CARLSSON, H. E.; ZAGON, A.; ROYO, F.; HAU, J. Enhancement of anamnestic immunospecific antibody response in orally immunized chickens. **Journal of Immunological Methods**, v. 342, n. 1-2, p. 58-63, 2009. https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.017

MERIEN, F.; PORTNOI, D.; BOURHY, P.; CHARAVAY, F.; BERLIOZ-ARTHAUD, A.; BARANTON, G. A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 1, p. 139-147, 2005. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MEUNIER, M.; GUYARD-NICODEME, M.; VIGOUROUX, E.; POEZEVARA, T.; BEVEN, V.; QUESNE, S.; AMELOT, M.; PARRA, A.; CHEMALY, M.; DORY, D. A DNA prime/protein boost vaccine protocol developed against Campylobacter jejuni for poultry**. Vaccine**, v. 36, n. 16, p. 2119-2125, 2018. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.004

MIASHIRO, A. F.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M. D.; SOUZA, G. O. D.; LEAL FILHO, J. M.; FIGUEIREDO, A. D. O.; PELLEGRIN, A. O. Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 41-47, 2018. https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4992

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, R. J.; COSTA, É. A.; SANTOS, R. L.; GONÇALVES, L. M. F.; CARVALHO, S. M.; BOMFIM, M. R. Q.; COSTA, F. A. L. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaiba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 859-866, 2011. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011001000005

MIRAGLIA, F.; MORENO, L. Z.; MORAIS, Z. M.; LANGONI, H.; SHIMABUKURO, F. H.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTSKEERL, R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Characterization of Leptospira interrogans serovar Pomona isolated from swine in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 10, p. 1054-1061, 2015. https://doi.org/10.3855/jidc.5507

MIURA, V. C.; AOKI, S. M.; PEITL, P. J.; PIRES, L. C.; DALMAGRO, P.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Evaluation of recombinant Cryptosporidium hominis GP60 protein and anti-GP60 chicken polyclonal IgY for research and diagnostic purposes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 2, p. 205-210, 2017. https://doi.org/10.1590/s1984-29612017032

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Proteomic Analysis of Leptospira interrogans Shed in Urine of Chronically Infected Hosts, **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4952-4958, 2008. https://doi.org/10.1128/IAI.00511-08

MONAHAN, A. M.; MILLER, I. S.; NALLY, J. E. Leptospirosis: risks during recreational activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 707-716, 2009. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04220.x

MORENO, C.; ZERPA, N.; MALAVÉ, C.; BERMÚDEZ, H.; DEMEY, J.; FERNANDEZ-GOMEZ, R.; ILZINS, O. Development and characterization of IgY antibodies against synthetic peptides from Brucella abortus OMP25 and BP26 proteins. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 56, n. 2, p. 192-201, 2016.

MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; BRAGG, S. L.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L. W.; LEVETT, P. N. Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3510-3516, 2006. https://doi.org/10.1128/JCM.00670-06

MURRAY, G. L. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In: Ben, A. (Ed.). Leptospira and leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.139-186. 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_7

MUSTAFA, A. S. In silico Analysis and Experimental Validation of Mycobacterium tuberculosis-Specific Proteins and Peptides of Mycobacterium tuberculosis for Immunological Diagnosis and Vaccine Development. **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. Suppl 1, p. 43-51, 2013. https://doi.org/10.1159/000354206

NARAYANAVARI, S. A.; SRITHARAN, M.; HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Multiple Leptospiral sphingomyelinases (or are there?). **Microbiology**, v. 158, n. Pt 5, p. 1137-1146, 2012. https://doi.org/10.1099/mic.0.057737-0

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004a. https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004b. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400003

NATARAJASEENIVASAN, K.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SUGUNAN, A. P.; SELVIN, J.; SEHGAL, S. C. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of Leptospira interrogans serovar autumnalis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 8, p. 699-708, 2008. https://doi.org/10.1179/136485908X355229

NAVARRO, D.; VARGAS, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; GOMEZ, A.; VILLALTA, M.; RAMIREZ, N.; WILLIAMS, D.; GUTIERREZ, J. M.; LEON, G. Development of a chicken-derived antivenom against the taipan snake (Oxyuranus scutellatus) venom and comparison with an equine antivenom. **Toxicon**, v. 120, n., p. 1-8, 2016. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.018

NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D12-D17, 2017. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071

NICOLINO, R. R.; LOPES, L. B.; RODRIGUES, R. O.; TEIXEIRA, J. F. B.; HADDAD, J. P. A. Prevalence and spatial analysis of antiLeptospiral agglutinins in dairy cattle - Microregion of Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009/2010. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 648-654, 2014. https://doi.org/10.1590/1678-41626216

NIE, G.; WANG, T.; LU, S.; LIU, W.; LI, Y.; LEI, J. Detection of Clonorchis sinensis Circulating Antigen in Sera from Chinese Patients by Immunomagnetic Bead ELISA Based on IgY. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p., 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113208

NILOOFA, R.; FERNANDO, N.; DE SILVA, N. L.; KARUNANAYAKE, L.; WICKRAMASINGHE, H.; DIKMADUGODA, N.; PREMAWANSA, G.; WICKRAMASINGHE, R.; DE SILVA, H. J.; PREMAWANSA, S.; RAJAPAKSE, S.; HANDUNNETTI, S. Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129236, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129236

NORMAN, S. A.; DIGIACOMO, R. F.; GULLAND, F. M.; MESCHKE, J. S.; LOWRY, M. S. Risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (Zalophus californianus) in California, 2004. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 4, p. 837-844, 2008. https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.4.837

OBREGÓN FUENTES, A. M.; FERNÁNDEZ MOLINA, C.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, I.; RODRÍGUEZ OLIVERA, Y.; ECHEVARRIA PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ SILVEIRA, J.; BAÑOS MORALES, Y. Detección de anticuerpos IgM contra Leptospira por un sistema comercial ELISA-IgM. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 65, n. 2, p. 202-210, 2013.

OLIVEIRA D, D. E.; FIGUEIRA, C. P.; ZHAN, L.; PERTILE, A. C.; PEDRA, G. G.; GUSMAO, I. M.; WUNDER, E. A.; RODRIGUES, G.; RAMOS, E. A.; KO, A. I.; CHILDS, J. E.; REIS, M. G.; COSTA, F. Leptospira in breast tissue and milk of urban Norway rats (Rattus norvegicus). **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 11, p. 2420-2429, 2016. https://doi.org/10.1017/S0950268816000637

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500004

OLIVEIRA, T. R.; LONGHI, M. T.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C.; BLANCO, R. M.; KIRCHGATTER, K.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Evaluation of Leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1715-1722, 2008. https://doi.org/10.1128/CVI.00214-08

OOTEMAN, M. C.; VAGO, A. R.; KOURY, M. C. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 2, p. 247-257, 2006. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.015

PAES, A. C. Leptospirose canina. In: Megid, J., Ribeiro, M. G., et al (Ed.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p.378-387.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 2, p. 111-117, 2005. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.10.002

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32814a5729

PARMA, Y. R.; CHACANA, P. A.; ROGE, A.; KAHL, A.; CANGELOSI, A.; GEOGHEGAN, P.; LUCCHESI, P. M.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E. Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 58, n. 4, p. 380-388, 2011. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.009

PEARSON, J. K.; MACKIE, D. P.; ELLIS, W. A. Milk drop syndrome resulting from Leptospira hardjo. **Veterinary Record**, v. 106, n. 6, p. 135-136, 1980. https://doi.org/10.1136/vr.106.6.135

PENNA, B.; MARASSI, C. D.; LIBONATI, H.; NARDUCHE, L.; LILENBAUM, W.; BOURHY, P. Diagnostic accuracy of an in-house ELISA using the intermediate species Leptospira fainei as antigen for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 50, n., p. 13-15, 2017. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.004

PEREZ, J.; GOARANT, C. Rapid Leptospira identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. **BMC Microbiology**, v. 10, n., p. 325, 2010. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULOUDIS, A. N.; DURSKI, K.; HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2014. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297-307, 2017. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5

PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; FERNANDES, L. G.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 332-336,2014. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400006

PINTO, P. A. S.; LIBONATI, H.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 2, p. 239-248, 2016. https://doi.org/10.1007/s11250-015-0954-9

PINTO, P. S.; LIBONATI, H.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 231-238, 2017. https://doi.org/10.1007/s11250-016-1201-8

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M. M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M.; JENNINGS, G. T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C. L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D. W.; JEFFRIES, A. C.; SAUNDERS, N. J.; GRANOFF, D. M.; VENTER, J. C.; MOXON, E. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-1820, 2000. https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1816

QU, J. X.; LIN, Y. H.; MA, R. S.; WANG, H. Immunoaffinity purification of polyepitope proteins against Plasmodium falciparum with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. **Protein Expression and Purification**, v. 75, n. 2, p. 225-229, 2011. https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.003

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2688-2691, 2001. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00554-5

REN, H.; YANG, W.; THIRUMALAI, D.; ZHANG, X.; SCHADE, R. A comparative evaluation of six principal IgY antibody extraction methods. **Alternative to Laboratory Animals**, v. 44, n. 1, p. 11-20, 2016. https://doi.org/10.1177/026119291604400111

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L. F.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. J.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003. https://doi.org/10.1038/nature01597

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; LEHMANN, J. S.; PURUSHE, J.; SANKA, R.; TORRES, M.; WEBSTER, N. J.; VINETZ, J. M.; MATTHIAS, M. A. Whole genome analysis of Leptospira licerasiae provides insight into Leptospiral evolution and pathogenicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1853, 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 5, p. 1309-1317, 2008. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014746-0

ROBBINS, G. T.; HAHN, B. L.; EVANGELISTA, K. V.; PADMORE, L.; ARANDA, P. S.; COBURN, J. Evaluation of Cell Binding Activities of Leptospira ECM Adhesins. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p., 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003712

SALAÜN, L.; MÉRIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3954-3962, 2006. https://doi.org/10.1128/JCM.00336-06

SALGADO, M.; OTTO, B.; SANDOVAL, E.; REINHARDT, G.; BOQVIST, S. A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for Leptospira spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n., p. 126, 2014. https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-126

SANKAR, S.; HARSHAN, H. M.; SOMARAJAN, S. R.; SRIVASTAVA, S. K. Evaluation of a recombinant LigB protein of Leptospira interrogans serovar Canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 3, p. 375-378, 2010. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.11.004

SANTOS, A.; ALI, A.; BARBOSA, E.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; BARH, D. The reverse vaccinology - a contextual overview. **The IIOAB Journal**, v. 2, n. 4, p. 8-15, 2011.

SARMENTO, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; OLIVEIRA, F. C. S.; GONÇALES, A. P.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Emprego de estirpes Leptospira spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601-606, 2012. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700003

SATHIYAMOORTHY, A.; SELVARAJU, G.; PALANIVEL, K. M.; SRINIVASAN, A. P. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine leptospirosis. **Veterinary World**, v. 10, n. 5, p. 530-535, 2017. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.530-535

SCHADE, R.; HLINAK, A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. **Altex**, v. 13, n. 5, p. 5-9, 1996.

SCHADE, R.; BEHN, I.; EHRHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology**. Germany: Springer, 2001, 255 p. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Lab Animals**, v. 33, n. 2, p. 129-154, 2005. https://doi.org/10.1177/026119290503300208

SCHLICHTING, D.; NÖCKLER, K.; BAHN, P.; LUGE, E.; GREINER, M.; MÜLLER-GRAF, C.; MAYER-SCHOLL, A. Estimation of the sensitivity and specificity of a Leptospira spp. in-house ELISA through Bayesian modelling. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 7, p. 756-761, 2015. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.029

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159-179, 2015. https://doi.org/10.1111/jsap.12328

SEIB, K. L.; ZHAO, X.; RAPPUOLI, R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18 Suppl 5, n., p. 109-116, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03939.x

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 530-541, 2010. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.017

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; FAGLIARI, J. J.; GIRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R.; MATHIAS, L. A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do

Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000400006

SILVA, V. B. C.; STEDILE, S. T. O.; SOUSA, R. S.; SOUSA, M. G. Síndrome hemorrágica pulmonar em cão associada à leptospirose. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 45 (Suppl 1), n. 240, p. 2017.

SIVAKOLUNDU, S.; SIVAKUMAR, R. R.; CHIDAMBARANATHAN, G. P.; SRITHARAN, M. Serological diagnosis of Leptospiral uveitis by HbpA IgG ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. Pt 12, p. 1681-1687, 2012. https://doi.org/10.1099/jmm.0.046870-0

SLACK, A. T.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F.; SMYTHE, L. D. Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. **BMC Microbiology**, v. 6, n., p. 95, 2006. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-95

SMYTHE, L. D.; WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; TIENGRIM, S.; DOHNT, M. F.; SYMONDS, M. L.; SLACK, A. T.; APIWATTANAPORN, A.; CHUEASUWANCHAI, S.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J.. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting Leptospira serovar in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 695-697, 2009. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0252

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. Leptospira interrogans Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p., 2007. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001188

SUEPAUL, S. M.; CARRINGTON, C.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A. A. Antimicrobial susceptibility of Leptospira isolates from dogs and rats to 12 antimicrobial agents. **Tropical Biomedicine**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2015.

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against Listeria monocytogenes and preliminary evaluation of its potential for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 11, p. 1946-1950, 2011. https://doi.org/10.1002/jsfa.4381

SYKES, J. E.; HARTMANN, K.; LUNN, K. F.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A.; GOLDSTEIN, R. E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x

TAKABE, K.; TAHARA, H.; ISLAM, M. S.; AFFROZE, S.; KUDO, S.; NAKAMURA, S. Viscosity-dependent variations in the cell shape and swimming manner of Leptospira. **Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 153-160, 2017. https://doi.org/10.1099/mic.0.000420

TAN, X. T.; AMRAN, F.; CHEE CHEONG, K.; AHMAD, N. In-house ELISA screening using a locally-isolated Leptospira in Malaysia: determination of its cut-off points. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n., p. 563, 2014. https://doi.org/10.1186/s12879-014-0563-7

TANGANUCHITCHARNCHAI, A.; SMYTHE, L.; DOHNT, M.; HARTSKEERL, R.; VONGSOUVATH, M.; DAVONG, V.; LATTANA, O.; NEWTON, P. N.; BLACKSELL, S. D. Evaluation of the Standard Diagnostics Leptospira IgM ELISA for diagnosis of acute leptospirosis in Lao PDR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 9, p. 563-566, 2012. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.06.002

TAVARES, T. C. F.; SOARES, P. M.; NEVES, J. H. F. F.; SOARES, M. M.; F. JUNIOR, Á.; SOUZA, D. L. N. D.; ÁVILA, V. M. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-Leptospira spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1097-1102, 2013. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000900008

TEIXEIRA, A. F.; DE MORAIS, Z. M.; KIRCHGATTER, K.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. Features of Two New Proteins with OmpA-Like Domains Identified in the Genome Sequences of Leptospira interrogans. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p., 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122762

THAIPADUNGPANIT, J.; WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L. D.; PETKANCHANAPONG, W.; LIMPAIBOON, R.; APIWATANAPORN, A.; SLACK, A. T.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WHITE, N. J.; FEIL, E. J.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J. A dominant clone of Leptospira interrogans associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 1, p. e56, 2007. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056

THAIPADUNGPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; SMYTHE, L. D.; LIMPAIBOON, R.; HOFFMASTER, A. R.; DAY, N. P.; PEACOCK, S. J. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16236, 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016236

THIBEAUX, R.; IRAOLA, G.; FERRÉS, I.; BIERQUE, E.; GIRAULT, D.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Deciphering the unexplored Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 1, p., 2018a. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144

THIBEAUX, R.; GIRAULT, D.; BIERQUE, E.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; RETTINGER, A.; DOUYÈRE, A.; MEYER, M.; IRAOLA, G.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Biodiversity of

Environmental Leptospira: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n., p., 2018b. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816

THU, H. M.; MYAT, T. W.; WIN, M. M.; THANT, K. Z.; RAHMAN, S.; UMEDA, K.; NGUYEN, S. V.; ICATLO, F. C., JR.; HIGO-MORIGUCHI, K.; TANIGUCHI, K.; TSUJI, T.; OGUMA, K.; KIM, S. J.; BAE, H. S.; CHOI, H. J. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) for Prophylaxis and Treatment of Rotavirus Diarrhea in Human and Animal Neonates: A Concise Review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2017. https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.1

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, n. 3, p. 569-574, 2002. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 551 p.

TOMAZIC, M. L.; RODRIGUEZ, A. E.; LOMBARDELLI, J.; POKLEPOVICH, T.; GARRO, C.; GALARZA, R.; TIRANTI, K.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. Identification of novel vaccine candidates against cryptosporidiosis of neonatal bovines by reverse vaccinology. **Veterinary Parasitology**, v. 264, n., p. 74-78, 2018. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.11.007

TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from Brazilian Pantanal using IGG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 674-680, 2007. https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400017

TONG, C.; GENG, F.; HE, Z.; CAI, Z.; MA, M. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. **Poultry Science**, v. 94, n. 1, p. 104-110, 2015. https://doi.org/10.3382/ps/peu005

TROMBERT-PAOLANTONI, S.; THOMAS, P.; HERMET, F.; CLAIRET, V.; LITOU, N.; MAURY, L. Leptospirosis screening: performance of the Serion Elisa Classic Leptospira IgM KIT. **Pathologie Biologie**, v. 58, n. 1, p. 95-99, 2010. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.06.008

VAKILI, B.; ESLAMI, M.; HATAM, G. R.; ZARE, B.; ERFANI, N.; NEZAFAT, N.; GHASEMI, Y. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against Leishmania infantum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, n. Pt A, p. 1127-1139, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.125

VALIDI, M.; KARKHAH, A.; PRAJAPATI, V. K.; NOURI, H. R. Immuno-informatics based approaches to design a novel multi epitope-based vaccine for immune response reinforcement

against Leptospirosis. **Molecular Immunology**, v. 104, n., p. 128-138, 2018. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.11.005

VAN REGENMORTEL, M. H. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. **Biologicals**, v. 29, n. 3-4, p. 209-213, 2001. https://doi.org/10.1006/biol.2001.0308

VEDHAGIRI, K.; VELINENI, S.; TIMONEY, J. F.; SHANMUGHAPRIYA, S.; VIJAYACHARI, P.; NARAYANAN, R.; NATARAJASEENIVASAN, K. Detection of LipL32-specific IgM by ELISA in sera of patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 3, p. 130-135, 2013. https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000088

VELINENI, S.; TIMONEY, J. F. Preliminary evaluation of a dual antigen ELISA to distinguish vaccinated from Leptospira infected horses. **Veterinary Record**, v. 179, n. 22, p. 574, 2016. https://doi.org/10.1136/vr.103686

VERMA, A.; STEVENSON, B.; ADLER, B. Leptospirosis in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1-2, p. 61-66, 2013. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012

VIEIRA, M. L.; FERNANDES, L. G.; DOMINGOS, R. F.; OLIVEIRA, R.; SIQUEIRA, G. H.; SOUZA, N. M.; TEIXEIRA, A. R.; ATZINGEN, M. V.; NASCIMENTO, A. L. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 352, n. 2, p. 129-139, 2014. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12349

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; UMAPATHI, T.; SEHGAL, S. C. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 114, n., p. 54-58, 2001.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 557-569, 2008. https://doi.org/10.1007/s12038-008-0074-z

VILLAGUALA, C.; GONZÁLEZ, C.; PASTENE, E.; FARÍAS, C.; SÁEZ, K.; RETAMAL-DÍAZ, A.; GARCÍA, A. Obtención de inmunoglobulinas de yema de huevo contra Helicobacter pylori producidos en gallinas araucanas. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 48, n. 1, p. 79-88, 2016. https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000100010

VOGEL, F. R.; POWELL, M. F. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n., p. 141-228, 1995. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5_7

WANG, L. H.; LI, X. Y.; JIN, L. J.; YOU, J. S.; ZHOU, Y.; LI, S. Y.; XU, Y. P. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes

of mastitis-causing Staphylococcus aureus. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 415-421, 2011. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.029

WANG, Y. B.; WANG, L. P.; LI, P. Perspectives on novel vaccine development. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 21, n. 3, p. 643-649, 2018.

WIZEMANN, T. M.; HEINRICHS, J. H.; ADAMOU, J. E.; ERWIN, A. L.; KUNSCH, C.; CHOI, G. H.; BARASH, S. C.; ROSEN, C. A.; MASURE, H. R.; TUOMANEN, E.; GAYLE, A.; BREWAH, Y. A.; WALSH, W.; BARREN, P.; LATHIGRA, R.; HANSON, M.; LANGERMANN, S.; JOHNSON, S.; KOENIG, S. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against Streptococcus pneumoniae infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1593-1598, 2001. https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1593-1598.2001

XU, Y.; LI, X.; JIN, L.; ZHEN, Y.; LU, Y.; LI, S.; YOU, J.; WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 860-868, 2011. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003

XU, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y.; CHANG, Y. F.; ZHANG, Y.; JIANG, X.; ZHUANG, X.; ZHANG, J.; ZENG, L.; YANG, M.; LI, S.; WANG, S.; YE, Q.; XIN, X.; ZHAO, G.; ZHENG, H.; GUO, X.; WANG, J. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic Leptospira. **Scientific Reports**, v. 6, n., p. 20020, 2016. https://doi.org/10.1038/srep20020

YAMAGUCHI, T.; HIGA, N.; OKURA, N.; MATSUMOTO, A.; HERMAWAN, I.; YAMASHIRO, T.; SUZUKI, T.; TOMA, C. Characterizing interactions of Leptospira interrogans with proximal renal tubule epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 64, 2018. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1206-8

YU, K.; PETROVSKY, N.; SCHONBACH, C.; KOH, J. Y.; BRUSIC, V. Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 137-148, 2002. https://doi.org/10.1007/BF03402006

YU, W.; ZHAN, Y.; XUE, B.; DONG, Y.; WANG, Y.; JIANG, P.; WANG, A.; SUN, Y.; YANG, Y. Highly efficient cellular uptake of a cell-penetrating peptide (CPP) derived from the capsid protein of porcine circovirus type 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 39, p. 15221-15232, 2018. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004823

ZENG, L.; WANG, D.; HU, N.; ZHU, Q.; CHEN, K.; DONG, K.; ZHANG, Y.; YAO, Y.; GUO, X.; CHANG, Y. F.; ZHU, Y. A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n., p. 396, 2017. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00396

ZHANG, M. J.; YANG, J.; ZHU, C. Z.; DUAN, Z. M.; NIU, X. L. Generation and application of anti-ouabain IgY antibodies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1-2, p. 241-247, 2011. https://doi.org/10.1007/s11010-011-0974-3

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; GUO, J.; LI, X. Y.; LU, Y. N.; CHEN, J.; XU, Y. P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 1-2, p. 126-133, 2008. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.014

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; LI, X. Y.; GUO, J.; LI, Z.; ZHANG, B. J.; FANG, R.; XU, Y. P. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 4, p. 317-322, 2009. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.016

ZHU, W.; WANG, J.; ZHU, Y.; TANG, B.; ZHANG, Y.; HE, P.; LIU, B.; GUO, X.; ZHAO, G.; QIN, J. Identification of three extra-chromosomal replicons in Leptospira pathogenic strain and development of new shuttle vectors. **BMC Genomics**, v. 16, n., p. 90, 2015. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1321-y

ZHU, W. N.; HUANG, L. L.; ZENG, L. B.; ZHUANG, X. R.; CHEN, C. Y.; WANG, Y. Z.; QIN, J. H.; ZHU, Y. Z.; GUO, X. K. Isolation and Characterization of Two Novel Plasmids from Pathogenic Leptospira interrogans Serogroup Canicola Serovar Canicola Strain Gui44. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003103

ZUERNER, R. L. Laboratory maintenance of pathogenic Leptospira. **Current Protocols in Microbiology**, v. 387, Chapter 12, p. Unit 12E.11, 2005. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc12e01s00

ZUERNER, R. L. Host response to Leptospira infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 223-250, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_9

CAPÍTULO 2

Reverse vaccinology against *Leptospira*: *In silico* identification of potential candidates for antigens and vaccine targets

Artigo a ser submetido no periódico

Biomed Research International

Reverse vaccinology against *Leptospira*: *In silico* identification of potential candidates for antigens and vaccine targets

Jandra P. Santos[1], Siomar C. Soares[2], Álvaro Ferreira Júnior[3], Letícia C. Oliveira[4], Arun K. Jaiswal[4], Anna M. C. Lima[5]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

[2] Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas e Ciências Naturais, Universidade Federal do Trângulo Mineiro(UFTM), Uberaba, MG, Brasil.

[3] Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Goiás(UFG), Goiânia, Goiás, Brasil..

[4] Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

[5] Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

Correspondence author: Jandra Pacheco dos Santos. Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Av. Ceará s/n, Bloco 2D, Sala 33, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. jandra.santos@yahoo.com.br

Abstract

The high antigenic diversity of the bacterial genus *Leptospira* is a great challenge for vaccine production and for the development of accurate diagnostic methods. Antigenic targets for immunization and/or diagnosis of*Leptospira* can be selected using bioinformatics and genomic technologies. However, to date, no large-scale search for antigenic targets *in silico* using the genomes of *Leptospira* species, their hosts, and an experimental aviary model has been performed. Therefore, the objective of this study was to achieve the *in silico* identification of targets with potential application in the diagnosis of leptospirosis and development of vaccines, using reverse vaccinology techniques. We compared 80 strains of *Leptospira interrogans* using *Leptospira interrogans* serovar Lai as the reference genome. A total of 1096 conserved proteins with no homologous in host were identified, including 212 gene products predicted as putative surface-exposed proteins, 87 secreted proteins, 138 membrane proteins, and 659 cytoplasmic proteins. We identified 37 proteins as promising candidates for the production of vaccines and as diagnostic markers. Sixteen of these proteins (43.2%) do not have a family or domain predicted by the InterProScan program. This group of gene products with no known function is promising candidate and represent an untapped pool of targets for future research. The next challenge will be the development of *in vitro* and *in vivo* assays to validate the immunogenicity of these candidate proteins for biological production.

Keywords: bioinformatics, epitopes, genomics, leptospirosis, proteins

1. Introduction

Leptospirosis is a zoonosis of global importance commonly found in countries with a tropical climate caused by pathogenic spirochetes belonging to the genus *Leptospira*, [1, 2]. These bacteria are maintained in the environment by wild and domestic reservoirs such as rodents, cattle, swine, and dogs, in which they are lodged in the kidneys and are eliminated intermittently in the urine. Outside their hosts*, Leptospira* may persist for a longer time in moist soil and water. Thus, transmission occurs through direct contact with the urine of animals that eliminate the microorganism, or indirectly via contaminated water [3]. Potential portals of entry include the *skin via* a cut or *abrasion,* and the mucous membranes of the eyes, nose, or throat [4]. Leptospirosis may present a broad variety of clinical manifestations in humans, ranging from a mild, influenza-like illness to a severe infection with renal and hepatic failure, pulmonary distress, and ultimately death [3]. A total of 63,302 cases of human leptospirosis causing 6,520 deaths were reported in Brazil between January 2010 and August 2018 [5] . Leptospirosis is also a major cause of economic losses due to the occurrence of abortion in production animals, and is also one of the most common infectious diseases of canine species worldwide [6]. Inactivated and attenuated vaccines have been used in animals or even in humans in some countries [7]. However, currently available vaccines are characterized by a short duration of immunity and by serovar specificity, and may not protect against kidney colonization [8].

At the ionset of infection, the host reacts with an immune response for which the typical agglutinating antibodies are specific to the antigenic pattern shared by the infecting strain. These agglutinating antibodies are typically detected *in vitro* by the gold-standard microscopic agglutination test (MAT), which has to be performed in specialized laboratories [6]. However, the MAT has disadvantages such as: (i) not being able to distinguish the class of antibodies;

(ii)cannot differentiate whether the infection is acute or chronic, and uses live antigens. Thus, public health authorities; and (iii) clinicians have pointed to the urgent need for developing more effective technologies for improving case detection and diagnosis [9]. The publication of genomic sequences of several *Leptospira* species [10-13] has opened the door for the application of systematic methods for the identification of protein antigens that can induce protection and serve as candidates for the production of new diagnostic tests [14]. The first step in this discovery is the prediction of antigenic targets, and therefore, computational methods (i.e., subtractive genomics) are broadly used in this process [15].

Recently, a comparative analysis of genome sequences from different *Leptospira* spp. was conducted using *in silico* technology, which identified a large number of potential targets as antigens for vaccine production and for the development of new drugs for treatment [6, 16-21]. In general, these studies are based on a strategy assuming that a target will be a gene that is essential for survival of the pathogen, which is non-homologous to its hosts [22]. However, there has yet to be a broad search for antigenic targets *in silico* using the available genomes of *Leptospira* species, their hosts, and an experimental avian model. The objective of the present study was the *in silico* identification of targets with potential for application in the diagnosis of leptospirosis and development of vaccines, using reverse vaccinology techniques.

2. Materials and Methods

2.1. Data selection

The genome sequences of all 80 strains of *L. interrogans* (Table 1) were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server [23].

2.2. Identification of intra-species conserved non-host homologous proteins

We compared the sequences of the 80 strains of *L. interrogans* using the *L. interrogans* serovar Lai (chromosome I: NC_004342, chromosome II: NC_004343) as the reference genome, using orthoMCL software [24]. The core genome corresponds to the pool of genes ubiquitously found in all strains of the species [25]. Coding DNA sequences (CDSs) shared by all strains were considered a part of the core genome.

The possible candidates for drugs and/or vaccines should be non-homologues to host proteins. Accordingly, these core genes were subjected to an orthoMCL search against the genomes of the following potential host animals: *Bos taurus, Bos indicus, Bubalus bubalis, Canis familiaris, Capra hircus, Equus caballus, Felis catus, Gallus gallus, Homo sapiens, Ovis aries, Rattus norvegicus, Sus scrofa, Mesocricetus auratus*, and *Mus musculus.*

2.3. Characterization of *Leptospira* proteins

Determination of the possible location (secreted, transmembrane, or cytoplasmic) of a candidate for diagnosis and/or generation of a vaccine is very important [22, 26]. Sub-cellular localization prediction of *L. interrogans* putative proteins was conducted by *in silico* analysis using SurfG+ 1.0 software [27]. SurfG+ is a pipeline for protein sub-cellular prediction that incorporates common software programs such as SignalP, LipoP, and TMHMM to search for motifs [28]. We also predicted the presence of functional domains with InterProScan [29]. The dataset was screened by Vaxign [30] by searching for proteins with the following features: major histocompatibility complex (MHC) I and MHC II binding properties, an adhesion probability greater than 0.51, and no similarity to host proteins.

3. Results

3.1. Experimental design

The experimental design, summarizing the results obtained in the prediction of candidate genes for use in diagnostic and/or biological development technologies for the production of vaccines against leptospirosis, is detailed in Figure 1.1.

3.2. Prediction of the *Leptospira* "core genome" and identification of intra-species conserved non-host homologous proteins

From the total 80 genomes of *L. interrogans* used for the study of ortology, with *L. interrogans* serovar Lai (chromosome I: NC_004342, chromosome II: NC_004343) as the reference, a set of 1655 CDSs shared by all species were considered the core genome. Considering the host genomes, 1096 conserved non-homologous proteins to the host were identified.

3.3 Prediction of candidate vaccine and antigen targets for *L. interrogans*

Among the 1096 non-homologous genes SurfG+ software predicted gene products as putative surface-exposed (PSE) proteins, secreted proteins, membrane proteins, or cytoplasmic proteins (Table 2). The predicted proteins were further analyzed for their antigenic properties selecting those with adhesion probabilities greater than 0.51, resulting in the detection of 37 proteins with potential for biological research in the development of diagnostics and/or vaccines (Table 3). Among these, there were 22 PSE proteins, 14 were secreted, and one was a membrane protein.

4. Discussion

We have described *in silico* detection of *L. interrogans* antigens with prediction of their potential use in indirect diagnostic technologies and/or development of subunit vaccines. We also evaluated the non-orthology against the genus *Gallus gallus*, since hens are classic models

for the production of biological antibodies of veterinary and medical interest [31, 32]. The availability of the complete genomic sequences of different leptospires and the development of increasingly modern computational programs have introduced new possibilities for identifying novel diagnostic targets for specific antigen or nucleic acid detection [9], besides enabling the development of vaccines against leptospirosis [33-36].

Gram-negative bacteria have five major protein subcellular localizations: cytoplasmic, inner membrane, periplasmic, outer membrane, and extracellular [37]. In this study, 1096 conserved proteins with no homologous in host were detected, 212 of which were predicted as putative membrane-exposed proteins, 87 were secreted antigens, 138 were membrane proteins, and 659 were cytoplasmic proteins. Putative proteins exposed on the surface of the bacterium are promising vaccine antigens because they are both immunogenic and antigenic, although the humoral response is not necessarily protective [21, 26].

These proteins were subsequently analyzed by Vaxign software, resulting in 37 candidates with an adhesion probability greater than 0.51. Of this total, 22 proteins were PSE proteins, 14 were secreted, and one was a membrane protein. More detailed analysis of the characteristics of these 37 proteins revealed that 21 (56.8%, 21/37) had similarities to other described proteins. One candidate, LA_3778 (AAN50976.2) with 1889 amino acids, was described as *Leptospira* immunoglobulin-like B (LigB-like), which contains 11 domains, including bacterial-Ig like domain (group 2), and is grouped in the superfamily of invasin/intimin cell-adhesion fragments.

Lig proteins were identified as important virulence factors because they have only been found in pathogenic *Leptospira* [33, 38], are not detected in attenuated cultures, and are surface-expressed during infections, such as the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin and *Escherichia coli* intimin [39]. These proteins have also been described as extracellular matrix ligands with the ability to interact with fibrinogen, fibronectin, laminin, collagen, and elastin [40-42]. Other

studies suggest that LigB-binding homeostatic proteins found in cutaneous wounds inhibit fibrin formation, which can facilitate leptospirosis transmission and infection [42]. In addition, antigens that are only expressed during infection can differentiate between vaccinated and naturally infected animals [38].

Two loci, noted as putative lipoproteins LA_4135 (AAN 51333.2) and LA_0563A (AAN 47762.1), have a domain of unknown function (DUF1554). DUF1554-containing proteins are found exclusively among pathogenic *Leptospira* spp., and resemble protein motifs within the c-type lectin-like domains (CTLDs) [43], belonging to the leptospiral-endostatine-like lipoproteins (Len) family. The CTLD of bacteria is found in proteins involved in the pathogen–host interaction with an obscure evolutionary relationship. These domains might have been acquired by horizontal transfer or could have arisen by convergent evolution as mimicry of host proteins [44]. These proteins may have an important role in adhesion to the extracellular matrix [43] or human factor H [45]. The locus LA_1159 (AAN48358.1) has the domain DUF1516, also with unknown function.

The InterproScan program found an alginate export domain (AlgE) (pfam PF13372) on the LA_4272 protein (AAN51470.1), despite its identification as a hypothetical protein. *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by the ability to secrete copious amounts of the exopolysaccharide alginate [46], which contributes to the production of biofilms. *L. interrogans* and *Leptospira biflexa* also have genes for the synthesis and export of alginate [47], but the LA_4272 locus has no similarity with non-pathogenic *Leptospira* proteins. The expression of genes involved in the biosynthesis and transport of alginate was reported to be downregulated in the mature biofilm of *L. biflexa*, indicating that some biofilm components may be produced in the early stages of biofilm formation [48]. Despite these findings, there is still a lack of experimental confirmation for the presence and role of alginate exporters in *L. interrogans* [49].

Both eukaryotes and prokaryotes use members of the nitrilase superfamily of enzymes for a wide variety of non-peptide carbon-nitrogen hydrolysis reactions [50]. These bacterial enzymes are exploited in industrial applications for biochemical synthesis and environmental bioremediation [51]. In *Leptospira*, the protein LA_0117 (AAN 47316.1) was classified with a molecular function of hydrolase activity. Another study demonstrated that the expression of proteins LA_0587 (AAN47786.1) and LA_0100 (AAN47299.2), also characterized as hydrolases, was downregulated in *L. interrogans* upon interaction with hosts, suggesting an immune evasion mechanism [52].

These proteins are promising as candidate antigenic targets for the development of subunit vaccines. In addition to these three proteins, a fourth hydrolase (LA_4227-AAN 51425.1) was identified using *in silico* analysis as a potential candidate for biological generation for the active immunization of *L. interrogans* hosts [53]. In diderm bacteria (i.e., bacteria with two membranes) such as *Leptospira* spp., outer membrane proteins (OMPs) such as beta barrel (βb)-OMPs and other lipid-anchored OMPs are located on the surface of the cell membrane [54]. Pathogenic *Leptospira* have a low amount of transmembrane OMP, and OmpL1, a trimeric porin, was the first to be described and characterized [55]. The protein encoded by the LA_3138 gene (AAN50336.2) belongs to the OmpL1 family and was characterized as an adhesin in the serovar Copenhageni (LIC10973), which has the ability to bind to plasminogen and generate plasmin, and interacts with laminin and fibronectin. OmpL1 is recognized by serum-specific antibodies from infected humans, suggesting that they are expressed during an active infection [56]. A second predicted βb-OMP is encoded by the LA_2617 gene (AAN49817.1). Proteins AAN50336.2 e AAN49817.1 are grouped in the outer membrane protein/outer membrane enzyme PapP, beta-barrel (OMP/PapP_b-bl) superfamily. The outer membrane enzyme PagP helps pathogenic bacteria to evade the host immune response by catalyzing palmitate transfer from a phospholipid to a glucosamine unit of lipid A. In *Salmonella,* palmytoylation by PAgP

reduces the activity of lipid A in inducing cellular signaling through Toll-like receptor-4 (TLR4) [57, 58].

The proteins LA_0568 (AAN47767.1) and LA_1161 (AAN48360.2) are grouped in the OMP transport protein (OMPP1/FadL/TodX) family (Pfam PF03349). These OMPs are important for maintenance of membrane integrity and the production of fatty acids, and therefore have potential as antigenic targets for vaccines [59, 60]. In *Pseudomonas putida*, two OMPs, TodX and TbuX, have structures that support the transport of hydrophobic substrates from the extracellular space to the periplasm [61]. However, to date, the function of OMPP1/FadL/TodX in *Leptospira* spp. is based only on assumption and needs confirmation.

The gene LA_1968 encodes a protein (AAN49167.2, putative beta-barrel porin-2, OMPL-like.bbp2) that is part of the Bbp2 family comprising putative porin proteins (Pfam PF07642). Among the possible functions attributed to OMP-beta-barrel is the import of vitamin B12. Interestingly, *L. interrogans* is dependent on B12 supplementation when growing on EMJH culture medium [10, 62]. There is also robust evidence for the involvement of OMP-beta-barrel in the virulence, pathogenesis, and biology of *Leptospira*, representing a promising target for the development of vaccines [49].

During the mining of *L. interrogans* serovar Lai genes, LA_1136 (AAN 48335.1) and LA_2407 (AAN 49606.1) were predicted as encoders of proteins involved in the transport of lipoproteins. Leptospiral lipoproteins transit across the periplasm to the outer membrane via the Lol lipoprotein sorting machinery [63]. The *L. interrogans* sorovar Copenhageni genome appears to contain genes encoding LolA, LolC, and LolD [11]. Several proteins have been reported to function in processes involving the crossing of lipopolysaccharide to the periplasmic space to reach the outer surface of the outer membrane, including LptA (periplasmic), LptB (cytosolic), Lptc, LptF, and LptG (inner membrane), along with LptD and LptE (outer

membrane) [64]. The protein AAN 48335.1 was described as a LolA-like protein and AAN49606.1 was described as an Lptc-like protein.

The LA_4291 (AAN 51489.1) protein was predicted as a member of the superfamily of metallopeptidase proteins, named pregnancy-associated plasma-A (PAPP-A), which has a peptidase M43 domain and is included into the metalloprotease family Merops M43. The PAPP-A enzyme cleaves insulin-growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and causes a dramatic reduction in the affinity of IGFBP-4 for its ligands insulin growth factor 1 (IGF-1) and IGF. In this context, the PAPP-A enzyme regulates the action of IGF in different tissues, including the ovaries [65] and cardiovascular tissue [66]. In an experimental mouse model, the macrophage-derived IGF-1 was demonstrated to regulate the homeostasis of immune cells [67]. The leptospiral extracellular metalloproteases known as thermolisins act as virulence factors for these bacteria by inhibiting complement pathways and by interaction with components related to the coagulation cascade and platelets aggregation [68, 69].

The protein LA_3469 (AAN 50667.1) was predicted as a metallopeptidase of the peptidase M75 family (imelysin). The main amino acids recognized as metal binders in metallopeptidases are histidine (His, H), glutamate (Glu, E), aspartate (Asp, D), and lysine (Lys, K). Imelysin-like proteins define a superfamily of bacterial proteins that are likely involved in iron uptake [70].

LA_2973 (AAN 50171.1) is a member of a rare protein family located near the di-heme cytochrome C peroxidase/MauG family. MauG is a monomeric enzyme that exhibits amino acid sequence similarity to the cytochrome C peroxidases, which are involved in defense against hydrogen peroxide [71]. Although most c-type cytochromes function simply as electron transfer mediators, MauG catalyzes the completion of tryptophan tryptophylquinone biosynthesis within a precursor protein of methylamine dehydrogenase (MADH) [72]. MADH is required for the use of methylamine as a carbon source in *Paracoccus denitrificans* [73].

L. interrogans also contains respiratory electron transport chain components, in agreement with the bacterium's oxygen requirements as an obligate aerobe. Four copies of genes encoding cytochrome c peroxidase were described in *L. interrogans*, which reduce hydrogen peroxide to water by using the c-type heme as an oxidizable substrate. *L. interrogans* is able to use hydrogen peroxide as an alternative final acceptor of reducing power for respiration; in addition, this pathway may contribute to peroxide detoxification [11, 71]. LA_3571 (AAN 50769.1) protein was described as a hypothetical conserved lipoprotein with a cytochrome c-like domain, with a molecular function of heme binding and electron carrier activity. The transmembrane protein LA_3862 (AAN 51060.1) has a sporulation-like domain (SPOR-like_dom), which is about 70 amino acids long. Although the name originates from the involvement of these proteins in sporulation, SPOR domain proteins are quite diverse and contribute to a variety of processes that involve remodeling of the peptidoglycan, and especially cell division [74]. SPOR-like domain proteins are promising for the search for new molecules with therapeutic potential.

The discovery of proteins or secretion systems is supported by the comparative analysis of coding genes, assuming that the observation of homologous components in one secretion system is a good indicator of the appearance of a corresponding secretion system [75]. Among the proteins of interest predicted from the genome of *L. interrogans* serovar Lai, 43.2% (16/37) do not yet have a description of grouping in superfamilies or families of proteins. To date, there is no determination of functional domains or similar active sites in proteins that are already characterized and deposited in databases, so that InterProScan software was not able to obtain such information. This group of gene products, still without known function, represent a potentially vast field of discovery for the prediction of antigenic targets as candidates for the development of vaccines and/or innovative diagnostic technologies.

5. Conclusion

The core genome of *L. interrogans* contains a set of genes that are non-homologous to the set of genes present in its main hosts as well as to *G. gallus*, a typical avian experimental model of infection or vaccine development. A total of 37 proteins were predicted as potential factors of bacterial virulence. Many of the predictions refer to protein or lipoprotein targets located on the outer membrane of the bacterium. These outer membrane molecules, selected by *in silico* analysis, have potential for adhesion to the extracellular matrix, participation in metabolic pathways of *L. interrogans*, and regulation of the host immune response. We further predicted unpublished proteins, and as yet uncharacterized, proteins of *L. interrogans*. Our study demonstrates the robustness of the tools available for *in silico* studies toward elucidating the proteome and metabolome of *L. interrogans* as well as for the selection of promising antigenic targets for vaccine development or diagnostic technologies. The next challenge will be the development of *in vitro* and *in vivo* assays to validate the immunogenicity of these candidate proteins in biological production.

Data Availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Project Number: APQ-00937-15) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

1. Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE: **Leptospiral pathogenomics**. *Pathogens* 2014, **3**(2):280-308. https://doi.org/10.3390/pathogens3020280
2. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E *et al*: **Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance**. *Lancet Infect Dis* 2003, **3**(12):757-771. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2
3. Adler B, de la Peña Moctezuma A: **Leptospira and leptospirosis**. *Vet Microbiol* 2010, **140**(3-4):287-296. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012
4. Evangelista KV, Coburn J: **Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses**. *Future Microbiol* 2010, **5**(9):1413-1425. https://doi.org/10.2217/fmb.10.102
5. **Situação Epidemiológica / Dados** [http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose/9805-situacao-epidemiologica-dados]
6. Andre-Fontaine G, Aviat F, Marie JL, Chatrenet B: **Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154-178)**. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2015, **39**:1-8. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.12.002
7. Lin X, Xiao G, Luo D, Kong L, Chen X, Sun D, Yan J: **Chimeric epitope vaccine against Leptospira interrogans infection and induced specific immunity in guinea pigs**. *BMC Microbiol* 2016, **16**(1):241. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0852-y
8. Faine S, Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P.: **Leptospira and Leptospirosis**, 2 edn. Melbourne: Medisci Press; 1999.
9. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA: **Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies**. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014, **78**(1):1-8. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012
10. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF *et al*: **Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing**. *Nature* 2003, **422**(6934):888-893. https://doi.org/10.1038/nature01597
11. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC *et al*: **Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis**. *J Bacteriol* 2004, **186**(7):2164-2172. https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004
12. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP *et al*: **Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(39):14560-14565. https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103
13. Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC, Yang CW: **Sequence of Leptospira santarosai serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes**. *Gene* 2012, **511**(2):364-370. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.074
14. Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, McBride AJ, Hartwig DD: **Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates**. *Int J Mol Sci* 2017, **18**(1). https://doi.org/10.3390/ijms18010158
15. Kumar Jaiswal A, Tiwari S, Jamal SB, Barh D, Azevedo V, Soares SC: **An In Silico Identification of Common Putative Vaccine Candidates against Treponema pallidum: A Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Based Approach**. *Int J Mol Sci* 2017, **18**(2). https://doi.org/10.3390/ijms18020402
16. Murray GL, Lo M, Bulach DM, Srikram A, Seemann T, Quinsey NS, Sermswan RW, Allen A, Adler B: **Evaluation of 238 antigens of Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo for protection against kidney colonisation**. *Vaccine* 2013, **31**(3):495-499. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.028
17. Umamaheswari A, Pradhan D, Hemanthkumar M: **Computer aided subunit vaccine design against pathogenic Leptospira serovars**. *Interdiscip Sci* 2012, **4**(1):38-45. https://doi.org/10.1007/s12539-012-0118-9

18. Hartwig DD, Forster KM, Oliveira TL, Amaral M, McBride AJ, Dellagostin OA: **A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis**. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2013, **20**(5):747-752. https://doi.org/10.1128/CVI.00034-13
19. de Alvarenga Mudadu M, Carvalho V, Leclercq SY: **Nonclassically secreted proteins as possible antigens for vaccine development: a reverse vaccinology approach**. *Appl Biochem Biotechnol* 2015, **175**(7):3360-3370. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1507-4
20. Pradhan D, Priyadarshini V, Munikumar M, Swargam S, Umamaheswari A, Bitla A: **Para-(benzoyl)-phenylalanine as a potential inhibitor against LpxC of Leptospira spp.: homology modeling, docking, and molecular dynamics study**. *J Biomol Struct Dyn* 2014, **32**(2):171-185. https://doi.org/10.1080/07391102.2012.758056
21. Oliveira TL, Grassmann AA, Schuch RA, Seixas Neto AC, Mendonça M, Hartwig DD, McBride AJ, Dellagostin OA: **Evaluation of the Leptospira interrogans Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate**. *PLoS One* 2015, **10**(11):e0142821. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142821
22. Barh D, Jain N, Tiwari S, Parida BP, D'Afonseca V, Li L, Ali A, Santos AR, Guimarães LC, de Castro Soares S *et al*: **A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in Corynebacterium pseudotuberculosis and other CMN group of human pathogens**. *Chem Biol Drug Des* 2011, **78**(1):73-84. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01118.x
23. NCBI Resource Coordinators: **Database Resources of the National Center for Biotechnology Information**. *Nucleic Acids Res* 2017, **45**(D1):D12-D17. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071
24. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS: **OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes**. *Genome Res* 2003, **13**(9):2178-2189. https://doi.org/10.1101/gr.1224503
25. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A *et al*: **Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity**. *Nat Genet* 2016, **48**(3):308-313. https://doi.org/10.1038/ng.3501
26. Rappuoli R: **Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development**. *Vaccine* 2001, **19**(17-19):2688-2691. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00554-5
27. Barinov A, Loux V, Hammani A, Nicolas P, Langella P, Ehrlich D, Maguin E, van de Guchte M: **Prediction of surface exposed proteins in Streptococcus pyogenes, with a potential application to other Gram-positive bacteria**. *Proteomics* 2009, **9**(1):61-73. https://doi.org/10.1002/pmic.200800195
28. Santos AR, Carneiro A, Gala-García A, Pinto A, Barh D, Barbosa E, Aburjaile F, Dorella F, Rocha F, Guimarães L *et al*: **The Corynebacterium pseudotuberculosis in silico predicted pan-exoproteome**. *BMC Genomics* 2012, **13 Suppl 5**:S6. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S5-S6
29. Mitchell A, Chang HY, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, Lopez R, McAnulla C, McMenamin C, Nuka G, Pesseat S *et al*: **The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years**. *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(Database issue):D213-221. https://doi.org/10.1093/nar/gku1243
30. He Y, Xiang Z, Mobley HL: **Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development**. *J Biomed Biotechnol* 2010, **2010**:297505. https://doi.org/10.1155/2010/297505
31. Walczak M, Grzywa R, Łupicka-Słowik A, Skoreński M, Bobrek K, Nowak D, Boivin S, Brown EL, Oleksyszyn J, Sieńczyk M: **Method for generation of peptide-specific IgY antibodies directed to Staphylococcus aureus extracellular fibrinogen binding protein epitope**. *Biopolymers* 2015, **104**(5):552-559. https://doi.org/10.1002/bip.22695
32. Vasconcellos FA, Coutinho ML, da Silva EF, Fernandes CP, Monte LG, Seyffert N, Dellagostin OA, Aleixo JA: **Testing different antigen capture ELISA formats for detection of Leptospira spp. in human blood serum**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010, **104**(4):259-264. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.10.005

33. Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Divers TJ, Barr SC, Chang CF, Pan MJ, Chang YF: **Immunogenicity and protective efficacy of recombinant Leptospira immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model**. *Microbes Infect* 2009, **11**(2):230-237. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.11.008
34. Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Chang CF, Pan MJ, Akey B, Chang YF: **Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis**. *Vaccine* 2010, **28**(11):2277-2283. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.071
35. Félix SR, Hartwig DD, Argondizzo AP, Silva É, Seixas FK, Neto AC, Medeiros MA, Lilenbaum W, Dellagostin OA: **Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens**. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2011, **18**(12):2026-2030. https://doi.org/10.1128/CVI.05297-11
36. Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG, Santos CS, Croda J, Homma A, Dellagostin OA *et al*: **The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis**. *Vaccine* 2007, **25**(33):6277-6286. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.053
37. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ *et al*: **PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes**. *Bioinformatics* 2010, **26**(13):1608-1615. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249
38. Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P *et al*: **Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by Leptospira interrogans and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA**. *Journal of medical microbiology* 2004, **53**(Pt 10):975-984. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45568-0
39. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA *et al*: **Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily**. *Mol Microbiol* 2003, **49**(4):929-945. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x
40. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA: **Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen**. *Infect Immun* 2007, **75**(5):2441-2450. https://doi.org/10.1128/IAI.01635-06
41. Lin YP, Greenwood A, Nicholson LK, Sharma Y, McDonough SP, Chang YF: **Fibronectin binds to and induces conformational change in a disordered region of leptospiral immunoglobulin-like protein B**. *J Biol Chem* 2009, **284**(35):23547-23557. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031369
42. Choy HA, Kelley MM, Croda J, Matsunaga J, Babbitt JT, Ko AI, Picardeau M, Haake DA: **The multifunctional LigB adhesin binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic Leptospira interrogans**. *PLoS One* 2011, **6**(2):e16879. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016879
43. Toot AL: **Localizationand caracterization of C-typelectin-like family of proteins in Leptospira interrogans**. Iowa State University; 2007.
44. Zelensky AN, Gready JE: **The C-type lectin-like domain superfamily**. *FEBS J* 2005, **272**(24):6179-6217. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x
45. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin**. *Infect Immun* 2006, **74**(11):6356-6364. https://doi.org/10.1128/IAI.00460-06
46. Whitney JC, Hay ID, Li C, Eckford PD, Robinson H, Amaya MF, Wood LF, Ohman DE, Bear CE, Rehm BH *et al*: **Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(32):13083-13088. https://doi.org/10.1073/pnas.1104984108
47. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC *et al*: **Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa**

provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 2008, **3**(2):e1607. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607

48. Iraola G, Spangenberg L, Lopes Bastos B, Graña M, Vasconcelos L, Almeida Á, Greif G, Robello C, Ristow P, Naya H: **Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in Leptospira biflexa Biofilms**. *mSphere* 2016, **1**(2). https://doi.org/10.1128/mSphere.00042-16
49. Grassmann AA, Kremer FS, Dos Santos JC, Souza JD, Pinto LDS, McBride AJA: **Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology**. *Front Immunol* 2017, **8**:463. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00463
50. Pace HC, Brenner C: **The nitrilase superfamily: classification, structure and function**. *Genome Biol* 2001, **2**(1):REVIEWS0001. https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001
51. Cowan D, Cramp R, Pereira R, Graham D, Almatawah Q: **Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes**. *Extremophiles* 1998, **2**(3):207-216. https://doi.org/10.1007/s007920050062
52. Xue F, Dong H, Wu J, Wu Z, Hu W, Sun A, Troxell B, Yang XF, Yan J: **Transcriptional responses of Leptospira interrogans to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane**. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, **4**(10):e857. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000857
53. Yang HL, Zhu YZ, Qin JH, He P, Jiang XC, Zhao GP, Guo XK: **In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against Leptospira interrogans**. *BMC Genomics* 2006, **7**:293. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-293
54. Wilson MM, Bernstein HD: **Surface-Exposed Lipoproteins: An Emerging Secretion Phenomenon in Gram-Negative Bacteria**. *Trends Microbiol* 2016, **24**(3):198-208. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.11.006
55. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA: **Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic Leptospira spp**. *J Bacteriol* 1993, **175**(13):4225-4234. https://doi.org/10.1128/jb.175.13.4225-4234.1993
56. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL: **OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of Leptospira spp**. *Infect Immun* 2012, **80**(10):3679-3692. https://doi.org/10.1128/IAI.00474-12
57. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI: **3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of Salmonella typhimurium, modulates signaling through Toll-like receptor 4**. *J Biol Chem* 2004, **279**(19):20044-20048. https://doi.org/10.1074/jbc.M401275200
58. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV: **Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis**. *J Endotoxin Res* 2006, **12**(4):205-223. https://doi.org/10.1179/096805106X118825
59. van den Berg B, Black PN, Clemons WM, Rapoport TA: **Crystal structure of the long-chain fatty acid transporter FadL**. *Science* 2004, **304**(5676):1506-1509. https://doi.org/10.1126/science.1097524
60. Tan Z, Black W, Yoon JM, Shanks JV, Jarboe LR: **Improving Escherichia coli membrane integrity and fatty acid production by expression tuning of FadL and OmpF**. *Microb Cell Fact* 2017, **16**(1):38. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0650-8
61. Hearn EM, Patel DR, van den Berg B: **Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(25):8601-8606. https://doi.org/10.1073/pnas.0801264105
62. Haake DA, Zückert WR: **The leptospiral outer membrane**. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015, **387**:187-221. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_8
63. Haake DA, Matsunaga J: **Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane**. *Mol Microbiol* 2010, **77**(4):805-814. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x
64. Wang X, Quinn PJ: **Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification**. *Prog Lipid Res* 2010, **49**(2):97-107. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002
65. Rodríguez FM, Gareis NC, Hein GJ, Salvetti NR, Amweg AN, Huber E, Stassi AF, Ortega HH, Rey F: **Role of Components of the Insulin-like Growth Factor System in the Early Stages**

of Ovarian Follicular Persistence in Cattle. *J Comp Pathol* 2017, **157**(2-3):201-214. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.07.010

66. Ziviello F, Conte S, Cimmino G, Sasso FC, Trimarco B, Cirillo P: **Pregnancy-Associated Plasma Protein-A and its Role in Cardiovascular Disease. Biology, Experimental/Clinical Evidences and Potential Therapeutic Approaches**. *Curr Vasc Pharmacol* 2017, **15**(3):197-206. https://doi.org/10.2174/1570161114666161230112126
67. Yoon IS, Park H, Kwak HW, Woo Jung Y, Nam JH: **Macrophage-derived insulin-like growth factor-1 affects influenza vaccine efficacy through the regulation of immune cell homeostasis**. *Vaccine* 2017, **35**(36):4687-4694. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.037
68. Fraga TR, Courrol DoS, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, Juliano L, Barbosa AS, Isaac L: **Immune evasion by pathogenic Leptospira strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins**. *J Infect Dis* 2014, **209**(6):876-886. https://doi.org/10.1093/infdis/jit569
69. Amamura TA, Fraga TR, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Isaac L: **Pathogenic Leptospira Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition**. *Front Microbiol* 2017, **8**:958. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00958
70. Xu Q, Rawlings ND, Farr CL, Chiu HJ, Grant JC, Jaroszewski L, Klock HE, Knuth MW, Miller MD, Weekes D *et al*: **Structural and sequence analysis of imelysin-like proteins implicated in bacterial iron uptake**. *PLoS One* 2011, **6**(7):e21875. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021875
71. Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC *et al*: **Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni**. *Braz J Med Biol Res* 2004, **37**(4):459-477. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400003
72. Shin S, Davidson VL: **MauG, a diheme enzyme that catalyzes tryptophan tryptophylquinone biosynthesis by remote catalysis**. *Arch Biochem Biophys* 2014, **544**:112-118. https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.004
73. Wang Y, Graichen ME, Liu A, Pearson AR, Wilmot CM, Davidson VL: **MauG, a novel diheme protein required for tryptophan tryptophylquinone biogenesis**. *Biochemistry* 2003, **42**(24):7318-7325. https://doi.org/10.1021/bi034243q
74. Yahashiri A, Jorgenson MA, Weiss DS: **The SPOR Domain, a Widely Conserved Peptidoglycan Binding Domain That Targets Proteins to the Site of Cell Division**. *J Bacteriol* 2017, **199**(14). https://doi.org/10.1128/JB.00118-17
75. Zeng C, Zou L: **An account of in silico identification tools of secreted effector proteins in bacteria and future challenges**. *Brief Bioinform* 2017. https://doi.org/10.1093/bib/bbx078

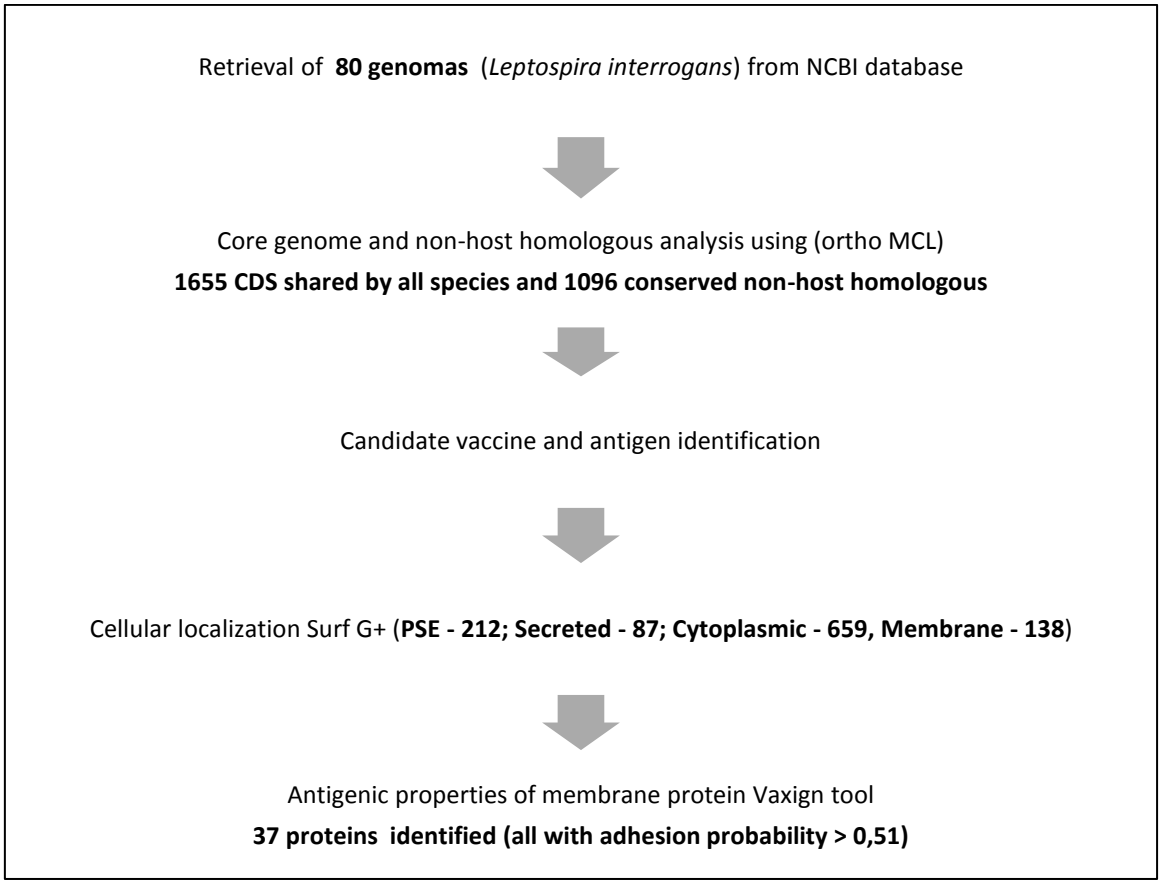


Figure 1. Experimental design summarizing the results obtained by means of in silico methodology in the prediction of candidate genes for use in diagnostic technologies or with potential for biological generation, with a view to the production of vaccines.

Table 1. Genomic features of all *L. interrogans* strains.

Microrganism /Name	Tamanho (Mb)	GC%	Gene	Protein
Leptospira interrogans serovar Bataviae str. 2006006959	4.70945	35.00	4269	3876
Leptospira interrogans serovar Bataviae str. 2006006976	4.70883	35.00	4279	3868
Leptospira interrogans serovar Bataviae str. Kariadi-Satu	4.68185	35.00	4230	3843
Leptospira interrogans serovar Bataviae str. Swart	4.72188	35.00	4277	3883
Leptospira interrogans serovar Bataviae str. UT234	4.83017	35.10	4438	4038
Leptospira interrogans serovar Bim str. P2529	4.83788	35.00	4550	4051
Leptospira interrogans serovar Bratislava	4.72158	35.00	4226	3832
Leptospira interrogans serovar Bratislava str. Brem 137	4.62908	35.00	4132	3762
Leptospira interrogans serovar Canicola str. HAI0024	4.71096	35.00	4273	3876
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. 2001025091	4.52668	35.00	4031	3707
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. 2006007831	4.54968	35.00	4069	3733
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130	4.62737	35.00	4092	3753
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV192	4.54966	35.00	4074	3738
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV199	4.55209	35.00	4063	3741
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV204	4.54561	35.00	4099	3727
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV212	4.54751	35.00	4097	3727
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV239	4.54899	35.00	4056	3731
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2752	4.54823	35.00	4056	3729
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2756C6	4.55022	35.00	4056	3734
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2759	4.55422	35.00	4048	3734
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2763	4.5537	35.00	4064	3739
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2767	4.55242	35.00	4047	3720
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2769	4.24304	35.00	-	-
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2772	4.55275	35.00	4050	3731
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2776	4.55288	35.00	4060	3736
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2787	4.555	35.00	4059	3743
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2790	4.55279	35.00	4056	3731
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2791	4.55366	35.00	4049	3734
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2799	4.55121	35.00	4108	3719
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2804	4.55106	35.00	4093	3726
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2805	4.54918	35.00	4077	3724
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2806	4.54416	35.00	4094	3718

Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2811	4.55172	35.00	4051	3736
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2812	4.55452	35.00	4054	3736
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2825	4.55135	35.00	4071	3723
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2832	4.54482	35.00	4087	3727
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2840	4.54509	35.00	4134	3716
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2897	4.54733	35.00	4069	3736
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2908	4.53477	35.00	4166	3699
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2933	4.54575	35.00	4143	3712
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2948	4.5404	35.00	4084	3713
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2953	4.54391	35.00	4093	3727
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2958	4.53606	35.00	4042	3722
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2959	4.55177	35.00	4049	3723
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV2973	4.54907	35.00	4050	3735
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3086	4.54863	35.00	4046	3722
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3094	4.5469	35.00	4056	3713
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3096	4.55438	35.00	4062	3736
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3244	4.51405	35.00	4338	3616
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3323	4.55395	35.00	4054	3740
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3373	4.54728	35.00	4070	3729
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3737	4.54904	35.00	4079	3734
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3738	4.54632	35.00	4104	3729
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3834	4.54473	35.00	4069	3730
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV3879	4.55223	35.00	4054	3737
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz LV999	4.54317	35.00	4225	3698
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz R154	4.54824	35.00	4131	3723
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz R83	4.55172	35.00	4063	3738
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. HAI0156	4.62738	34.90	4183	3762
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. MMD1562	4.53604	35.00	4147	3693
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. P2518	4.54502	35.00	4089	3729
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. R066	4.54993	35.00	4050	3733
Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. R103	4.55732	35.00	4062	3738
Leptospira interrogans serovar Grippotyphosa str. 2006006971	4.80597	35.00	4585	3933

Leptospira interrogans serovar Hardjo str. Norma	4.76215	35.00	4322	3893
Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae str. P2422	4.53002	35.00	4054	3701
Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae str. P2547	4.54726	35.00	4060	3726
Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae str. P2554	4.54709	35.00	4103	3714
Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601	4.69813	35.01	3741	3683
Leptospira interrogans serovar Lai str. IPAV	4.70853	35.01	4210	3901
Leptospira interrogans serovar Lai str. Lai	4.60031	34.90	4139	3812
Leptospira interrogans serovar Lai str. Langkawi	4.77168	35.10	4367	4001
Leptospira interrogans serovar Linhai str. 56609	4.91565	35.07	4466	4057
Leptospira interrogans serovar Manilae	4.6674	34.98	4203	3800
Leptospira interrogans serovar Manilae	4.66735	34.98	4205	3793
Leptospira interrogans serovar Medanensis str. L0887	4.76042	35.10	4360	3951
Leptospira interrogans serovar Muenchen	4.64771	35.10	4241	3774
Leptospira interrogans serovar Pyrogenes str. 2006006956	4.77279	34.90	4292	3901
Leptospira interrogans serovar Pyrogenes str. SriLanka1	4.83713	35.00	4509	4024
Leptospira interrogans serovar Pyrogenes str. SriLanka2	4.90216	35.10	4654	4116

Table 2. Subcellular location of *Leptospira interrogans* strain proteins

Localization	Number of proteins
Cytoplasmic protein	659
Membrane protein	138
PSE*	212
Secreted Protein	87

*Putative Surface Exposed.

Table 3. Antigenic proteins of *Leptospira interrogans* identified using software Vaxign.

Protein Accession	Lai Locus	Localization	Adhesion Probability	TMHMM	Protein Length	Signal P Result	InterProScan (Domain)	Gene product	Molecular function
AAN50408.1	LA_3210	PSE	0.729	0	251	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN50976.2	LA_3778	PSE	0.719	0	1889	Yes (between 20 and 21)	Bacterial Ig-like group 2-IPR003343(52-1117, 137-221, 226-307,312-397, 402-487, 491-576, 582-667, 673-755, 760-845, 851-936, 942-1027, 1032-1118) Invasin/intimin cell-adhesion fragments-IPR008964 (157-214, 227-308)	LigB-like protein	No
AAN48366.2	LA_1167	PSE	0.708	0	138	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN50191.2	LA_2993	PSE	0.699	0	246	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN51470.1	LA_4272	SEC	0.693	1	650	Yes (between 26 and 27)	Alginate export domain-IPR 025388(98-612)	Uncharacterized protein	**No**
AAN51333.2	LA_4135	PSE	0.688	0	842	No	C-type lecitin fold-IPR 016187(73-234) Domain of unknow function DUF1554-IPR011448(77-219)	Putative lipoprotein	No

AAN47767.1	LA_0568	SEC	0.681	1	473	No	Outer membrane protein transport protein (OMPP1/FadL/Todx)-IPR005017(36-380)	Fatty acid transport protein	No
AAN50336.2	LA_3138	SEC	0.674	1	320	Yes (between 24 and 25)	Porin OmpL1-IPR021058(45-311) Outer membrane protein/outer membrane enzyme PagP, beta barrel – IPR011250 (45-275)	OmpL1	Porin activity
AAN48358.1	LA_1159	PSE	0.671	0	402	No	Protein of unknown function DUF 1516 – IPR 011460(120-257/273-399)	Putative lipoprotein	No
AAN47762.1	LA_0563	PSE	0.648	0	462	No	C type lectin fold - IPR016187(72-263/276-424) Domain of unknow function DUF1554– IPR011448 (85-226/280-424)	LenC	No
AAN48360.2	LA_1161	PSE	0.638	1	468	No	Outer membrane protein transport protein (OMPP1/FadL/TodX)-IPR005017(55-429)	Fatty acid transport protein	No
AAN49817.1	LA_2617	SEC	0.628	1	288	No	Outer membrane protein/outer membrane enzyme PagP, beta-	Uncharacterized protein	No

							barrel -IPR011250(30-269)		
AAN51425.1	LA_4227	PSE	0.627	1	373	No	AttH-like domain - IPR023374 (40-220/230-371)	Hydrolase	No
AAN50667.1	**irpA** LA_3469	PSE	0.623	0	440	No	Peptidase M75, imelysin - IPR 018976 (59-349)	Putative lipoprotein	No
AAN47816.2	LA_0617	MEM	0.620	1	170	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN50171.1	LA_2973	PSE	0.614	0	315	Yes (between 21 and 22)	Conserved hypothetical protein CHP04052 - IPR023977 (92-296)	Putative lipoprotein	No
AAN50979.1	LA_3781	PSE	0.608	0	112	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN47316.1	LA_0117	PSE	0.597	1	340	No	Carbon-nitrogen hydrolase - IPR003010(56-323)	Uncharacterized protein	Hydrolase activity
AAN51489.1	LA_4291	PSE	0.596	0	480	Yes (between 22 and 23)	Metallopeptidase, catalytic domain- IPR024079(243-466)	Hypothetical lipoprotein	Metallopeptidase activity
AAN47786.1	LA_0587	SEC	0.596	0	306	Yes (between 22 and 23)	Alpha/Beta hydrolase fold- IPR029058(35-268)	Lipase	Hydrolase activity acting on ester bonds

AAN50769.1	LA_3571	PSE	0.595	1	139	No	Cytochrome c-like domain – IPR 009056(9-138)	Conserved hypothetical lipoprotein	Heme biding Electron carrier activity
AAN51306.1	LA_4108	PSE	0.561	1	228	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN47299.2	LA_0100	SEC	0.558	0	424	Yes (between 28 and 29)	SGNH hydrolase-type esterase domain – IPR013830 (19-388)	Uncharacterized protein	No
AAN48335.1	LA_1136	SEC	0.556	0	257	No	Lipoprotein localisation LolA/LolB/LppX - IPR029046(54-251)	Outer membrane lipoprotein-sorting protein	No
AAN48104.2	LA_0905	PSE	0.551	0	244	No	No	Hypothetical lipoprotein	No
ADE44219.1	LA_3472a	PSE	0.540	0	210	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN51461.1	LA_4263	PSE	0.536	1	262	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN48367.1	LA_1168	SEC	0.532	1	139	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN50190.1	LA_2992	SEC	0.529	1	232	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN49167.2	LA_1968	SEC	0.525	0	550	Yes (between 23 and 24)	Putative beta-barrel porin-2, OmpL-like. Bbp2 – IPR011486(54-550)	Uncharacterized protein	No

AAN47567.2	LA_0368	SEC	0.521	1	199	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN51401.1	LA_4203	PSE	0.520	0	279	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN50173.1	LA_2975	SEC	0.518	1	292	No	No	Hypothetical lipoprotein	No
AAN50266.2	LA_3068	PSE	0.515	1	198	No	No	Putative lipoprotein	No
AAN51060.1	LA_3862	SEC	0.513	1	247	No	Sporulation-like domain -IPR007730 (169-247)	Uncharacterized protein	Peptidoglycan biding
AAN51268.1	LA_4070	SEC	0.509	1	371	No	No	Uncharacterized protein	No
AAN49606.1	LA_2407	PSE	0.506	1	194	No	Lipopolysaccharide assembly, LptC-related -IPR010664(1-176)	Uncharacterized protein	Lipopolissacharide transmembrane transporter activity

SEC = secreted; PSE = putative surface exposed; MEM = membrane, TMH = Transmembrane Helix, TMHMM = Transmembrane Helix prediction server, based on a hidden Markov model.

CAPÍTULO 3

Utilização de peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* na produção e caracterização de anticorpos IgY e IgG policlonais

Artigo a ser submetido no periódico

Journal of Immunological Methods

Utilização de peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* na produção e caracterização de anticorpos IgY e IgG policlonais

Jandra Pacheco dos Santos[1], Álvaro Ferreira Júnior[2], Ricardo Toshio Fujiwara[3], Daniella Castanheira Bartholomeu[3], Anna Monteiro Correia Lima[4]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

[2] Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

[3] Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4] Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

Autor para correspondência: jandra.santos@yahoo.com.br

Resumo

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa causada por *Leptospira interrogans* que acomete humanos e animais. O diagnóstico indireto da infecção é realizado por meio do *Microscopic Agglutination Test* (MAT). Entretanto, o MAT utiliza antígenos vivos, apresenta baixa sensibilidade e não identifica a classe de anticorpos. O desenvolvimento de antígenos seguros e de novos imunobiológicos para aplicação no diagnóstico da leptospirose são necessários. O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de anticorpos policlonais IgY e IgG a partir da inoculação de galinhas e coelhos, respectivamente, com epítopos quimicamente sintetizados e preditos a partir da proteína hipotética (AAN50190-1) de *Leptospira interrogans.* Foram selecionados três epítopos de células B (P127, P128 e P129). Foram obtidos 8,05 ± 0,55 mg/mL de anticorpos IgY totais extraídos da gema, por meio de precipitação em H_2O pH 5,0 a 5,2 e Na_2SO_4 19%. A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou um perfil de bandas de proteínas compatível com as cadeias pesadas e leves do IgY. O Dot-blot demonstrou a presença de IgY na fração final da extração. Foram padronizadas plataformas de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para realização de experimentos de caracterização dos anticorpos. Os IgY_{gema} foram detectados sete dias após a primeira inoculação, o pico foi após a terceira inoculação, na 6ª semana e em seguida um aparente declínio na reatividade. O peptídeo com maior indução de resposta humoral foi o P127. Na titulação o máximo obtido para IgY sérica e da gema foi 1.600 e 200, respectivamente,. ambos para a galinha inoculada com o *pool* de peptídeos. Para os coelhos o título máximo foi 800 obtido com o animal também inoculado com os três peptídeos (*pool*). O índice Avidez da 6ª semana, para IgY sérica e da gema, contra P127, foi 88% e 95%, respectivamente, e para o $Coelho_{P127}$ foi 67%. Na otimização de uma plataforma de imunofluorescência indireta (RIFI), os anticorpos IgY se ligaram às bactérias fixadas na lâmina. Na presente pesquisa, os peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* induziram a produção de anticorpos IgY específicos e são promissores para a sua utilização em plataformas ELISA e RIFI destinadas ao estudo da leptospirose.

Palavras-chave: anticorpos da gema do ovo, bioinformática, ELISA, imunoglobulinas aviárias.

1. Introdução

A leptospirose é uma doença tropical negligenciada causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A doença constitui um sério problema mundial de saúde pública, e causa uma enfermidade com sinais clínicos e gravidade variável tanto em humanos quanto em animais (1). No Brasil, entre os anos de 2010 e 2018, um total de 68.445 casos de leptospirose humana com 6.520 óbitos foram notificados (2).

Os animais cronicamente infectados são considerados uma importante fonte de infecção, pois eliminam a bactéria pela urina e podem contaminar o ambiente. A leptospirose é um exemplo para aplicação do enfoque de “Saúde Única”, pois permite abordar, de forma integrada, a complexidade das interações entre a saúde humana, animal e ambiental (3). No controle da leptospirose humana, essa abordagem é essencial, pois a infecção quase invariavelmente resulta de exposição direta a animais infectados ou ambientes contaminados por eles (4).

O diagnóstico laboratorial envolve testes diretos (cultura, PCR) e testes sorológicos indiretos como *Microscopic Agglutination Test* (MAT) e o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). O MAT, apesar de considerado o teste de referência para diagnóstico, tem como desvantagens o fato de não distinguir a classe de anticorpos, não poder diferenciar se a infecção é aguda ou crônica e usar antígenos vivos. Uma alternativa ao MAT é o ELISA, o qual já foi desenvolvido para o diagnóstico de leptospirose humana, canina e bovina (5-7). A utilização de métodos rápidos e de fácil execução, e que possam diferenciar animais vacinados dos verdadeiramente infectados, são importantes para auxiliar na identificação e melhor prognóstico da doença (8).

Pesquisas com leptospiras, usando tecnologia *in silico*, identificaram um grande número de candidatos potenciais como antígenos a produção de vacinas e novos testes para diagnóstico (9-12). Proteínas anotadas como hipotéticas e de função desconhecida são provavelmente polivalentes e podem participar em diferentes vias durante os processos de invasão, ajudando a bactéria a se estabelecer. Essas proteínas de leptospiras patogênicas têm surgido como alvos antigênicos promissores para o desenvolvimento e/ou inovação das plataformas de diagnóstico indireto e/ou direto da leptospirose em animais e humanos (13). Uma alternativa sustentável e inovadora para a geração de biológicos, para uso em diagnóstico, são os anticorpos IgY. Esses anticorpos são produzidos a partir de

galinhas inoculadas com o alvo de interesse, e que, posteriormente, são purificados da gema do ovo (14).

Anticorpos IgY possuem alta especificidade para se ligarem e inativarem substâncias estranhas, como moléculas antigênicas de patógenos que podem invadir um organismo. Por essa razão, a IgY é usada para diagnóstico e terapia (15). Entre as vantagens do desenvolvimento do IgY estão a redução dos procedimentos dolorosos durante a produção destes anticorpos, a ausência de procedimentos invasivos no transcorrer da purificação, a sua semelhança funcional com o IgG dos mamíferos e a sua elevada concentração no purificado da gema (16).

Anticorpos policlonais específicos produzidos em mamíferos contra *Leptospira* tem se mostrado úteis para estudos de aspectos relacionados à invasão da bactéria, detecção de epítopos candidatos a diagnóstico e proteínas candidatas a imunoprofilaxia (17-21). Porém, as pesquisas utilizando a tecnologia IgY para o diagnóstico e controle da leptospirose são escassas (22, 23), assim como a utilização de peptídeos como antígenos em plataformas de diagnóstico.

O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar anticorpos policlonais IgY e IgG a partir da inoculação de galinhas e coelhos, respectivamente, com sequências peptídicas sintéticas extraídas de proteína hipotética de *Leptospira interrogans.* Além disso, foi demonstrada a aplicação dos anticorpos IgY na plataforma de reação de imunofluorescência indireta.

2. Material e Métodos

O *design* e a metodologia envolvendo galinhas e coelhos foram realizados de acordo como o guia do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), seguindo as leis brasileiras para “Procedimentos para uso científico de animais” (11794/2008). Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (UNIUBE), sob o número CEEA–047/2017.

2.1. Predição *in silico* da proteína e dos peptídeos e síntese química

2.1.1. Predição *in silico* de proteínas imunogênicas e seus peptídeos

As sequências de aminoácidos correspondentes a proteína hipotética (AAN50190-1) de *Leptospira interrogans* sorovar Lai strain 56601 foram embasadas na sequência depositada no GenBank (24), sob número de acesso NC_004342.2. Posteriormente, essa sequência foi analisada para predição de epítopos lineares de células B pelo programa BepiPred 1.0 com *cut-off* de 1.3 (25).

2.1.2. Síntese dos peptídeos usados como antígenos

Os peptídeos selecionados foram quimicamente sintetizados pela empresa Aminotech® (Diadema, São Paulo, Brasil) e sua pureza verificada (≥95%) em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A massa relativa foi obtida por espectrometria de massas.

2.2. Produção de anticorpos e purificação de IgY

2.2.1. Galinhas e coelhos

Os animais utilizados no experimento foram mantidos individualmente em gaiolas e receberam água e ração *ad libitum.* Foram utilizadas oito galinhas de postura da linhagem *Isa Brown,* com 25 semanas de idade e cinco coelhos brancos da raça Nova Zelândia, 60 dias de idade, para a obtenção de anticorpos policlonais IgY e IgG, respectivamente. As identificações de galinhas e coelhos utilizados neste estudo estão descritas em detalhes na Tabela 1.

2.2.2. Inoculação dos peptídeos

Os peptídeos sintéticos liofilizados foram ressuspendidos em água deionizada ultrapura na concentração final de 1000µg/ml, armazenados a -20ºC e foram inoculados em duas condições distintas: individualmente ou em *pool* dos peptídeos. Uma galinha e um coelho utilizados como controles negativos foram inoculados com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M, pH 7,2.

As galinhas e os coelhos foram inoculados de acordo com o protocolo de adjuvantes de Freund (AF, Sigma-Adrich, EUA) (26). Foram realizadas três inoculações com intervalo de 15 dias, sendo duas intramusculares com adjuvante e uma endovenosa sem adjuvante.

Foram utilizados 25 µg de antígeno na inoculação primária e 50 µg nos *booster.* Para as aplicações intramusculares, utilizou-se volumes iguais da solução de peptídeos em PBS (200 µl) e de AF (200 µl do completo [ACF] na primária e 200 µl do incompleto [AIF] nos *booster*). Pela via endovenosa foram inoculados 200 µl de solução de peptídeos (50 µg) em PBS diretamente na veia ulnar ou marginal da orelha, para as galinhas e os coelhos, respectivamente. Durante o protocolo de inoculações, os ovos foram recolhidos diariamente. As gemas foram separadas da clara, homogeneizadas em um *pool* semanal e armazenadas a -20°C até o seu uso. Amostras de sangue das galinhas e dos coelhos foram colhidas na sexta semana por meio de exsanguínação. O sangue foi centrifugado a 5000×g, 15 minutos e o soro obtido foi armazenado a -20°C.

2.2.3. Extração dos anticorpos da gema do ovo

O protocolo de extração das IgY totais da gema foi executado com deslipidização em água acidificada seguida de precipitação dos anticorpos com Na_2SO_4 (Sigma-Aldrich, EUA) (27). A primeira etapa da extração foi a remoção da fração lipídica do *pool* semanal de gemas dos ovos por meio de sua diluição (1:10) em água ultrafiltrada acidificada (pH 5,0 a 5,2) ajustada com ácido clorídrico (HCl) 0,1N. Após vigorosa homogeneização, a mistura foi mantida a -20°C, *overnight*, depois descongelada a 4°C e centrifugada por 25 minutos, 10.000xg a 4°C. O sobrenadante (S1), livre de lipídeos, foi reservado e precipitado com Na_2SO_4 19% (p/v), para obtenção de fração enriquecida em IgY total. O *pellet* (P2) foi obtido após centrifugação por 25 minutos, 10.000×g a 4°C. P2 foi ressuspendido em PBS 0,01M, pH 7,2 e dialisado contra PBS, durante 48 horas a 4°C. A concentração proteica final foi quantificada utilizando o método de Bradford com leitura a 595 nm. A qualidade do protocolo de extração foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) (28), sob condições redutoras e corado com Coomassie Brillant Blue R250 (Sigma-Aldrich, EUA). A análise da migração relativa das bandas proteicas foi realizada no software LabImage ID L360. A presença de anticorpos IgY na fração P2 foi determinada em ensaio Dot-Blot utilizando albumina sérica bovina (BSA) 5% como solução de bloqueio e o anticorpo secundário na diluição 1:20.000 (IgG de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase, Sigma-Aldrich, EUA). O BSA 5% foi utilizado como controle negativo. Amostras

reagentes foram confirmadas pela deposição do precipitado de diaminobenzidino (cor marrom) [29]. As alíquotas de P2 foram armazenadas a -20°C.

2.3. Caracterização dos anticorpos IgY

2.3.1. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto

2.3.2. Reagentes

Foram testadas microplacas rígidas de poliestireno (Corning-Costar, EUA) ou flexíveis de vinil (*high binding*, Corning-Costar, EUA). Os peptídeos sintéticos foram testados nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 µg/ml. A solução de bloqueio das ligações inespecíficas utilizou BSA 1% ou 5% diluídos em PBS 0,01M, pH 7,2, com ou sem ciclos de lavadas pós-incubação. Os anticorpos primários IgY e IgG foram avaliados em diluição dupla seriada (1:25 até 1:800 [gema], 1:50 a 1:1600 [soro]). A fração P2 foi testada nas concentrações 1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/poço da microplaca. Os anticorpos secundários (IgG de coelho anti-IgY-peroxidase, Sigma-Aldrich® e IgG de cabra anti-IgG de Coelho-peroxidase, Sigma-Aldrich®) foram testados nas diluições 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000. As temperaturas de incubação foram de 26°C ou 37°C. As lavadas foram realizadas em lavadora automatizada com solução PBS-T 0,05% (150 µL/poço). As condições ótimas foram utilizadas para a padronização do ELISA indireto.

2.3.3. Padronização

As concentrações ótimas de todos os reagentes (sumarizados na Tabela 2) foram as que apresentaram a maior razão sinal/ruído por meio do método de *checkerboard*. As microplacas de vinil (Corning ® 96-Well Flexible Vinyl) foram sensibilizadas com 50 µL da solução de peptídeos em tampão carbonato/bicarbonato (0,06M, pH 9,6) *overnight*, a 4º C. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS-T 0,05%. O bloqueio foi realizado com PBS-BSA 5%, a 37ºC, por 60 minutos, sem ciclo de lavadas pós-bloqueio. Os anticorpos IgY e IgG foram diluídos em PBS-BSA 5%, incubados em duplicata a 37°C, por 60 minutos e lavados cinco vezes. Os anticorpos secundários diluídos em PBS-BSA 5%, foram incubados a 37°C, por 60 minutos e lavados cinco vezes. A revelação foi realizada com 50 µL de *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Slow Kinetic Form, for* ELISA (SIGMA, USA)

contendo 0,1 mM/L de tampão fosfato citrato 1 µl/ml de peróxido de hidrogênio. A reação de parada foi realizada com 50 µL de H_2SO_4 2N. A leitura da densidade óptica (D.O.) foi obtida em 450 nm (ThermoPlate Reader).

As amostras de soro e gema da galinha e do coelho inoculados com PBS foram utilizados como controle negativo. O *cut-off* foi calculado de acordo com a fórmula: D.O. média dos controles negativos acrescidos de dois desvios padrão (DP).

2.3.4. Teste de avidez

Para mensurar a reatividade residual dos anticorpos IgY e IgG, as microplacas placas foram sensibilizadas e bloqueadas conforme descrito no item 2.3.3. Após a incubação dos anticorpos primários, uma duplicata foi tratada com ureia 6M e outra duplicata, do mesmo anticorpo, com PBS 0,01M, por cinco minutos, temperatura ambiente e lavada três vezes. As etapas de revelação, parada e leitura foram realizadas de acordo com o descrito no item 2.3.3. O cálculo do índice de avidez (IA) foi realizado por meio da determinação da razão entre a D.O. dos anticorpos tratados com ureia 6M e a D.O. dos tratados com PBS 0,01M, sendo o resultado expresso na forma de porcentagem (27).

2.3.5. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

Para investigar a reatividade dos anticorpos IgY anti-peptídeo 127 contra *Leptospira interrogans* fixada em lâmina, foi otimizado um ensaio de imunofluorescência indireta. Uma suspensão de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, mantida em meio de cultura EMJH durante sete dias, foi centrifugada a 2.000 rpm em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em PBS 0,01M, 10 µl foram depositados sobre lâmina de microscopia e deixada para secar a 37°C. Em seguida foram fixadas com acetona, conforme protocolo previamente descrito (28). Após bloqueio da lâmina com PBS-BSA 3%, as bactérias foram incubadas com IgY anti-P127 da 6ª semana, na concentração de 8 µg/ml, diluída em BSA 3%, por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após três imersões em PBS 0,01M, por cinco minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas com anticorpos anti-IgY marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:320 em BSA 3%, por 60 minutos a 37°C, protegido da luz. Após lavadas e secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato (pH 9,5). A leitura foi feita em sistema de microscopia de fluorescência (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Alemanha). BSA

3% e IgY da galinha controle foram utilizadas como controle negativo do teste. Como critérios para possíveis leptospiras marcadas com IgY anti-peptídeos utilizou-se marcadores morfológicos característicos destas bactérias, ou seja, a emissão de fluorescência em estruturas de extremidades curvadas e de comprimento compatível com a espiroqueta estudada.

2.3.6. Análise estatística

A verificação de normalidade foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação da média entre dois grupos utilizou o teste exato de Fischer, assumindo como significância estatística $P<0,05$. As análises de estatística descritivas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California).

3. Resultados

3.1 Peptídeos selecionados

Neste estudo, o programa BepiPred foi utilizado para predição de epítopos lineares de células B localizados em uma proteína hipotética de *L. interrogans* sorovar Lai. Os resultados da predição, apresentados na Tabela 3, apontaram sequências peptídicas dotadas de imunogenicidade. Para a síntese, foram escolhidas três sequências (Tabela 4), sendo duas confluências dos epítopos mais imunogênicos (P127 e P128) e uma sequência consenso (P129).

3.2. Purificação e concentração de anticorpos IgY policlonais

Os anticorpos foram separados dos outros constituintes da gema pela adição de água acidificada e precipitação com sulfato de sódio a 19% (Figura 1). A quantificação de proteínas na fração P2 (enriquecida em IgY) das gemas da primeira semana até a sexta semana pós-imunização primária foi de 8,05 ± 0,55 mg/mL.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Dot Blot

No SDS-PAGE sob condições redutoras, corado com Coomassie Blue R-250, foi possível a visualização de proteínas de 75 kDa que correspondem à cadeia pesada de IgY, e de 37 kDa que correspondem à cadeia leve de IgY (Figura 2A). O ensaio de Dot Blot com P2 demonstrou a presença de anticorpos IgY (Figura 2B).

3.4. Testes ELISA indireto

3.4.1. Transferência de anticorpos IgY para gema

Houve uma variação significativa entre a transferência de anticorpos para a gema entra a Ga1 e Ga2, para os três peptídeos (Figura 3). Verificou-se que a detecção de anticorpos IgY específicos na gema variou entre a primeira e a terceira semana pós-imunização primária, com o pico na quinta e sexta semanas. No ensaio de titulação da fração P2, o título máximo (800) foi obtido com o peptídeo 127. Para os peptídeos 128 e 129, o título alcançado foi 200 (Figura 4).

3.4.2. Análise de soroconversão das galinhas e coelhos

O título máximo do IgY e IgG sérico, para galinhas (Figura 5) e coelhos (Figura 6), respectivamente, foi 1600 para os três peptídeos inoculados.

3.4.3. Avidez de IgY e IgG

Na avaliação da avidez dos anticorpos séricos e da fração P2, verificou-se que os anticorpos IgY anti-peptídeo 127 são de alta avidez (>70% de atividade residual) e com valores superiores aos anticorpos IgG (Tabela 6).

3.4.4 Teste de imunofluorescência

No ensaio de imunofluorescência com culturas puras de leptospira, após incubação com IgY anti-peptídeo 127 foram visualizadas estruturas marcadas com FITC, de aproximadamente 20 µm de extensão e com extremidades curvas (Figura 7).

4. Discussão

A produção de anticorpos IgY policlonais contra peptídeos de proteína hipotética de *Leptospira interrogans* foi realizada pela primeira vez no presente

estudo. Utilizando metodologia previamente descrita (29), a qual demonstrou ser eficiente, as galinhas foram imunizadas e os anticorpos puderam ser detectados no soro e na gema dos ovos. Coelhos imunizados com os mesmos peptídeos também demonstraram soroconversão. Isso reforça a eficiência do modelo *Gallus gallus domesticus* para a produção alternativa de anticorpos.

A quantificação de proteína na fração P2 demonstrou a extração satisfatória de anticorpos IgY da gema do ovo (8 mg/ml). Shin e colaboradores obtiveram resultados que variaram de 2 a 10 mg de IgY/ml inoculando galinhas com 100 µg/ml de peptídeos sintéticos de *Helicobacter pylori* (30). O rendimento da extração de anticorpos da gema é influenciado pela metodologia utilizada, embora a que foi utilizada nesse estudo está entre as que apresentam os melhores resultados de quantificação e pureza. Há variações nas concentrações de antígenos usadas para produção de anticorpos IgY, embora quantidades de 25 -100 µg/ml sejam usualmente descritas (31). Em outra pesquisa, na realização de imunização de aves com BSA, não houve diferença significativa com o uso de 100 µg, 10 µg ou 1 µg do antígeno nos títulos de anticorpos detectáveis no plasma e na gema (32). Para determinação das doses ótimas de cada antígeno para uma eficiente imunização, há a necessidade de testes experimentais (33). Diferenças na produção de IgY podem ser relacionadas a outros fatores como protocolos de imunização (15) e linhagem das aves (34).

A eletroforese da fração P2 demonstrou que o processo de purificação com foi eficiente. Diferentes metodologias são descritas na literatura para purificação de IgY da gema do ovo (35). Essas técnicas incluem precipitação com sal, cromatografia e ultrafiltração (31). Nesse trabalho, foi escolhida a técnica de precipitação com sulfato de sódio, conforme já descrito (26). Pesquisas anteriores demonstram que a precipitação com sal é um método de fácil realização e efetivo, com altas taxas de recuperação dos anticorpos IgY (22, 27), corroborando com o nosso estudo. A revelação da eletroforese mostrou bandas com aproximadamente 66 kDa para cadeia pesada de IgY e 36 kDa para cadeia leve, assemelhando-se a resultados de outra pesquisa (15). Diferentes massas moleculares foram caracterizados em pesquisas anteriores, com cadeia leve variando entre 15-35 kDa e cadeia pesada entre 55-70 kDa (36), demonstrando haver certa variabilidade na IgY produzida.

As galinhas inoculadas apresentaram níveis de anticorpos IgY anti-peptídeos detectáveis e com transferência para gema variável a partir da primeira semana após a primeira imunização. O perfil cinético observado diferiu entre as aves, porém as

maiores reatividades no ELISA foram observadas principalmente após a inoculação desses animais via endovenosa, realizada na quarta semana. Pesquisas mostram que essa é uma via útil para aplicação de *booster,* contribuindo para aumentar o título final de anticorpos (37),o que foi observado neste trabalho.

Ao final do protocolo de inoculações, galinhas e coelhos soroconverteram. Verificou-se variação nos títulos de anticorpos IgY para os diferentes peptídeos. Os resultados do ensaio de titulação assemelham-se aos de outras pesquisas que utilizaram proteínas de membrana externa de leptospira (22). Os quatro coelhos inoculados também apresentaram reatividade contra os peptídeos sintéticos. Houve diferença estatística entre o coelho inoculado com o P129 e o animal inoculado com o *pool* de peptídeos. Esse fato pode ser explicado pelo tamanho das cadeias de aminoácidos. O P129 é uma sequência curta de aminoácidos, com menos antígenos tendo tido chance de serem reconhecidos como estranhos pelo organismo do animal, o que consequentemente pode ter gerado menor quantidade de anticorpos (33).

Nessa pesquisa, demonstramos que os anticorpos IgY foram de alta avidez e superiores aos anticorpos IgG. Essa é uma característica importante em um anticorpo candidato ao uso como reagente em imunoensaios (27).

Os anticorpos IgY foram aplicados em ensaio de imunofluorescência utilizando cultura pura de leptospiras. A imunofluorescência têm sido usada com resultados satisfatórios no diagnóstico de leptospirose em tecidos (38). Os anticorpos IgY mostraram ser capazes de reconhecer epítopos expostos na superfície da bactéria, sugerindo a localização da proteína hipotética e, também, o seu potencial em técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica.

5. Conclusão

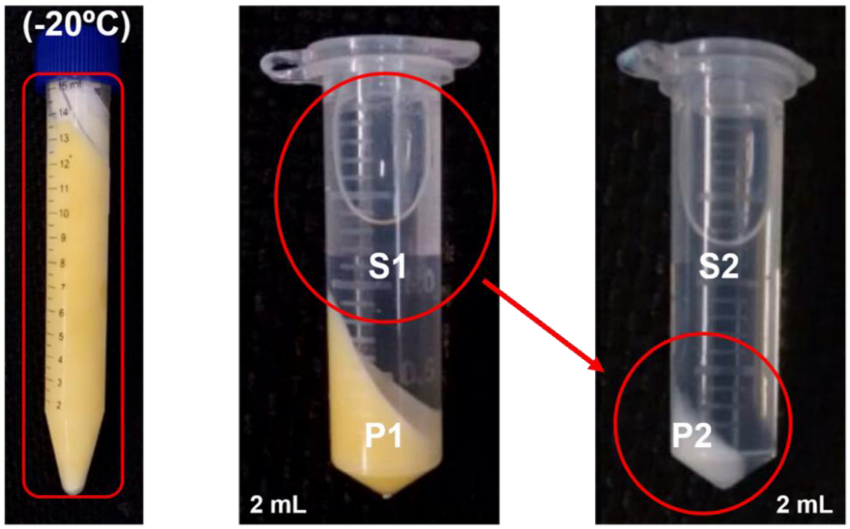
Os peptídeos selecionados a partir de uma proteína hipotética de *Leptospira interrogans* induziram a produção de anticorpos em galinhas e coelhos inoculados, com a produção de anticorpos IgY e IgG de alta avidez. Esses anticorpos tem potencial para serem utilizados como antígenos em diferentes imunoensaios, contribuindo para o diagnóstico da leptospirose.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Project Number: APQ-00937-15) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro.



(A) (B) (C)

Figura 1 – Obtenção da fração enriquecida em anticorpos IgY (P2). A gemas dos ovos obtidos de galinhas experimentalmente inoculadas com os peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* foram armazenadas a -20°C (A). Separação da fração solúvel em água (S1) do precipitado rico em lipídeos (P1), após a incubação com água acidificada (pH 5.0-5.2) (B). Produto da precipitação do sobrenadante (S1) com sulfato de sódio 19%, o *pellet* (P2) representa a fração enriquecida em anticorpos IgY e o sobrenadante (S2) contém os contaminantes (C).

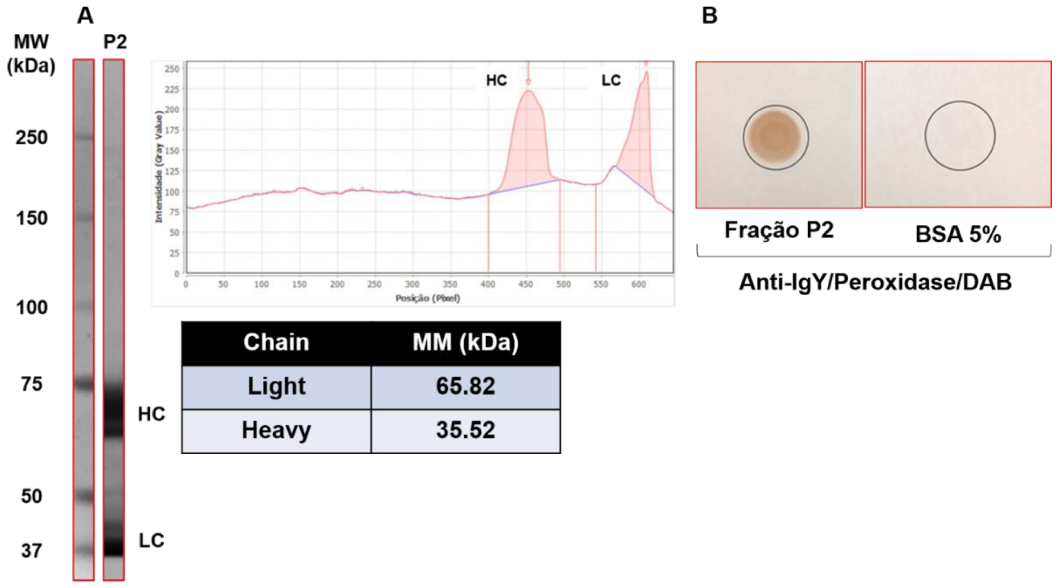


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida e Dot-Blot da fração P2 da extração de IgY da gema do ovo. (A) SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, da fração P2 da gema do ovo de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans.* MW – *molecular weigth;* kDa – kilodalton; HC – *heavy chain;* LC – *Light chain.* Coloração com Coomassie Blue 250R. Análise – Software LabImage 1D L360. (B) Dot Blot da fração P2. BSA – *Bovine Serum Albumin*

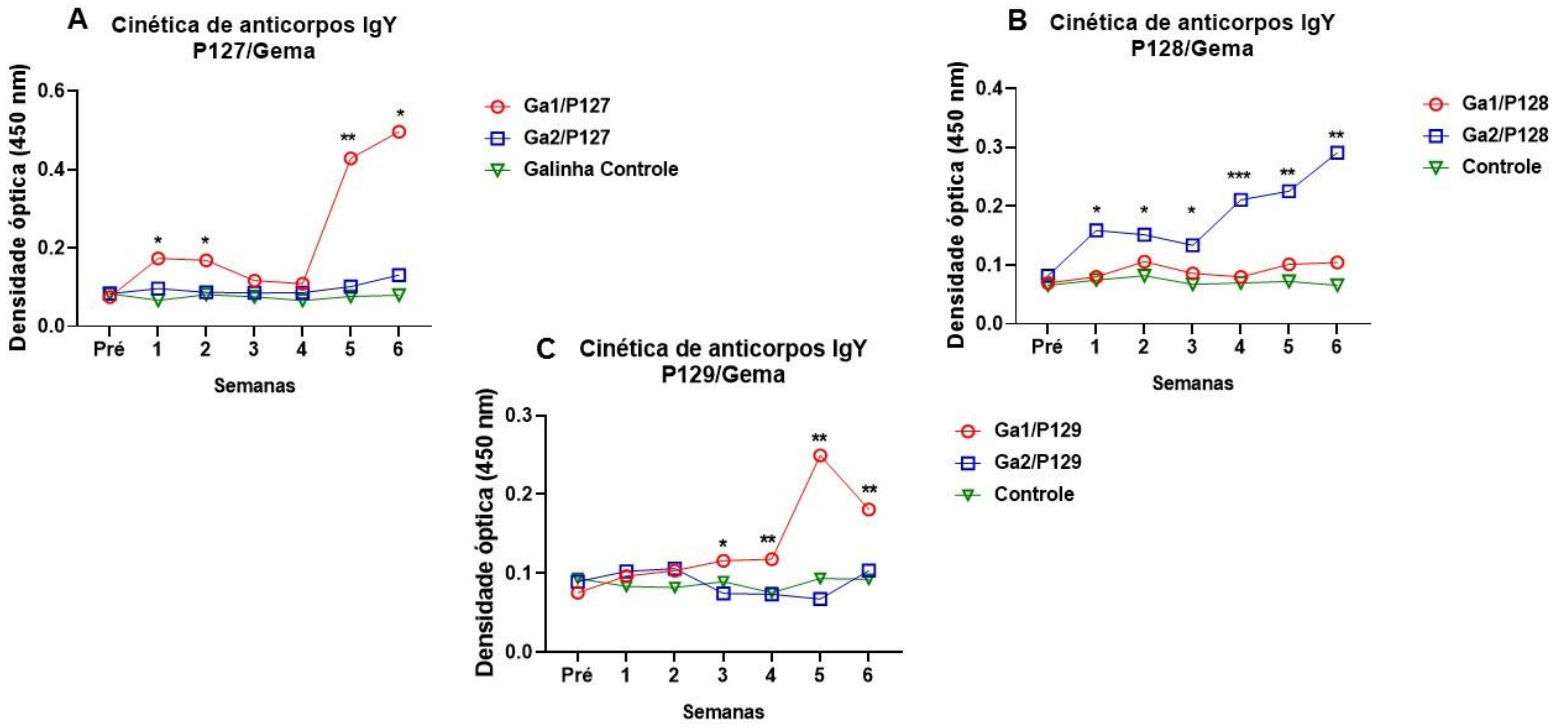


Figura 3 - ***Enzyme-linked immunosorbent assay*** **(ELISA) indireto para a cinética dos anticorpos IgY na fração P2 da gema dos ovos de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de** ***Leptospira interrogans*** **sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund.** Ga1, Ga2 e Controle: galinhas inocludas com P127 (A), P128(B) ou P129 (C) e BSA, respectivamente. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**) e P<0,001 (***)

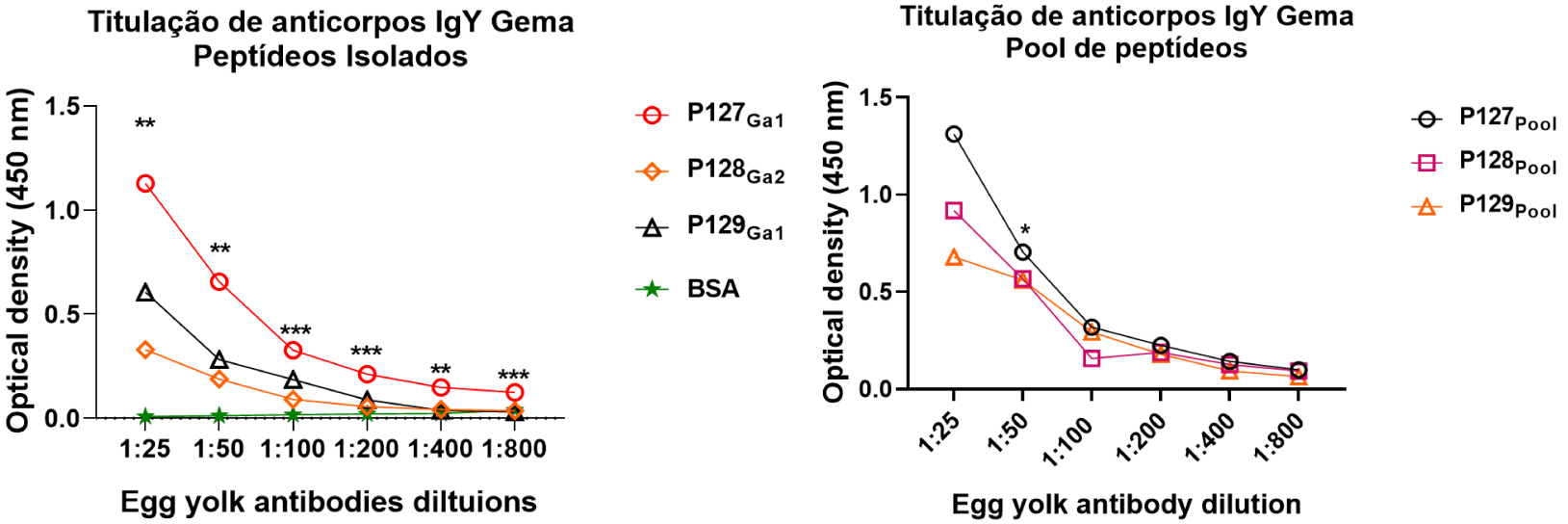


Figura 4 - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto para a titulação dos anticorpos IgY na fração P2 da gema dos ovos de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund. P127, P128 e P129: peptídeos sintéticos. Ga1, Ga2 e Pool: galinhas mais reativas aos peptídeos isoladamente ou inoculados na forma de pool. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**); P<0,001 (***).

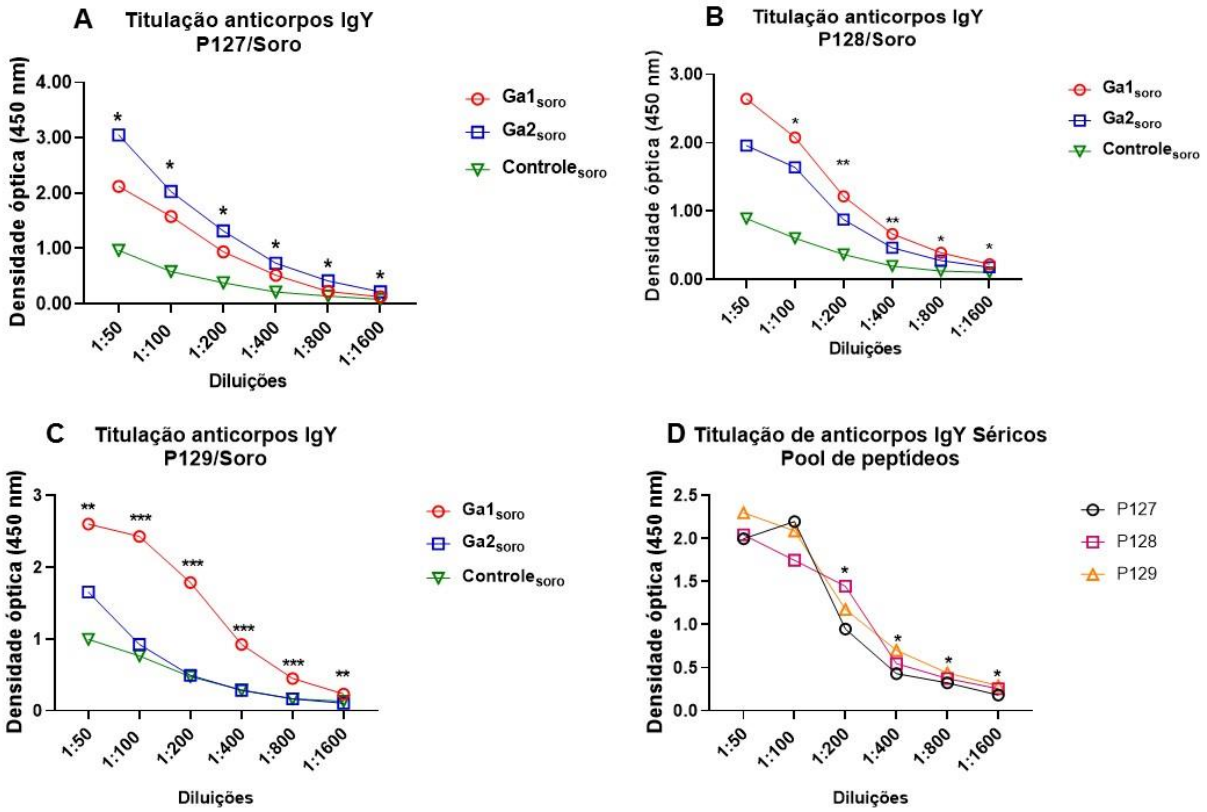


Figura 5 - ***Enzyme-linked immunosorbent assay*** **(ELISA) indireto para a titulação dos anticorpos IgY séricos de galinhas inoculadas com peptídeos sintéticos de** ***Leptospira interrogans*** **sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund. Ga1, Ga2: duplicata de galinhas inoculadas com peptídeos individuais.** Pool: galinhas inoculadas com os três peptídeos; Controle: galinha inoculada com BSA. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**); P<0,001 (***) entre $P127_{Ga1}$ e $P128_{Ga2}$; $P127_{Ga1}$ e $P129_{Ga1}$.

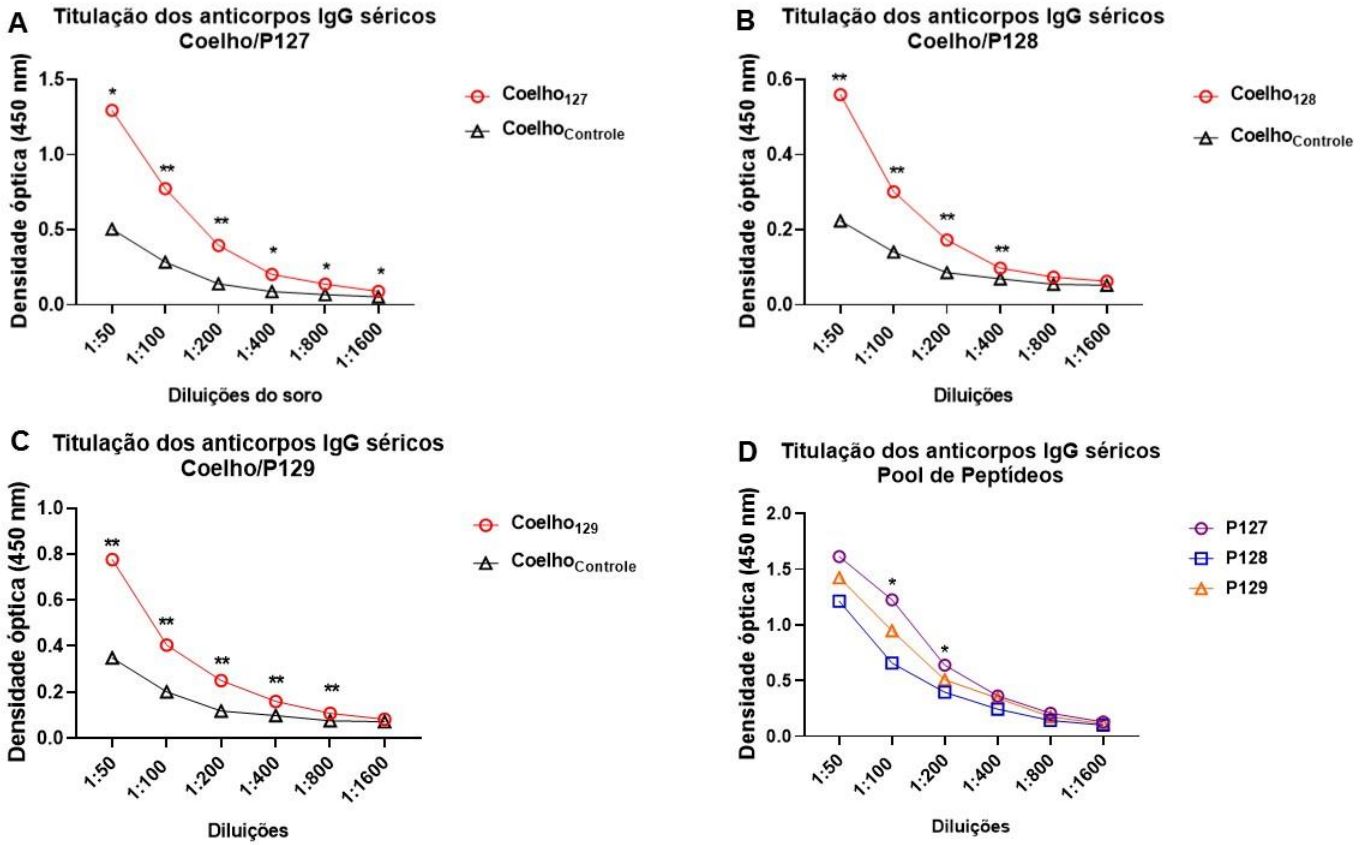


Figura 6 - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto para a titulação dos anticorpos IgG séricos de coelhos inoculados com peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorovar Lai utilizando adjuvantes de Freund. Pool: coelhos inoculados com os três peptídeos; Controle: coelho inoculado com BSA. Nível de significância estatística: P<0,05 (*); P<0,01(**).

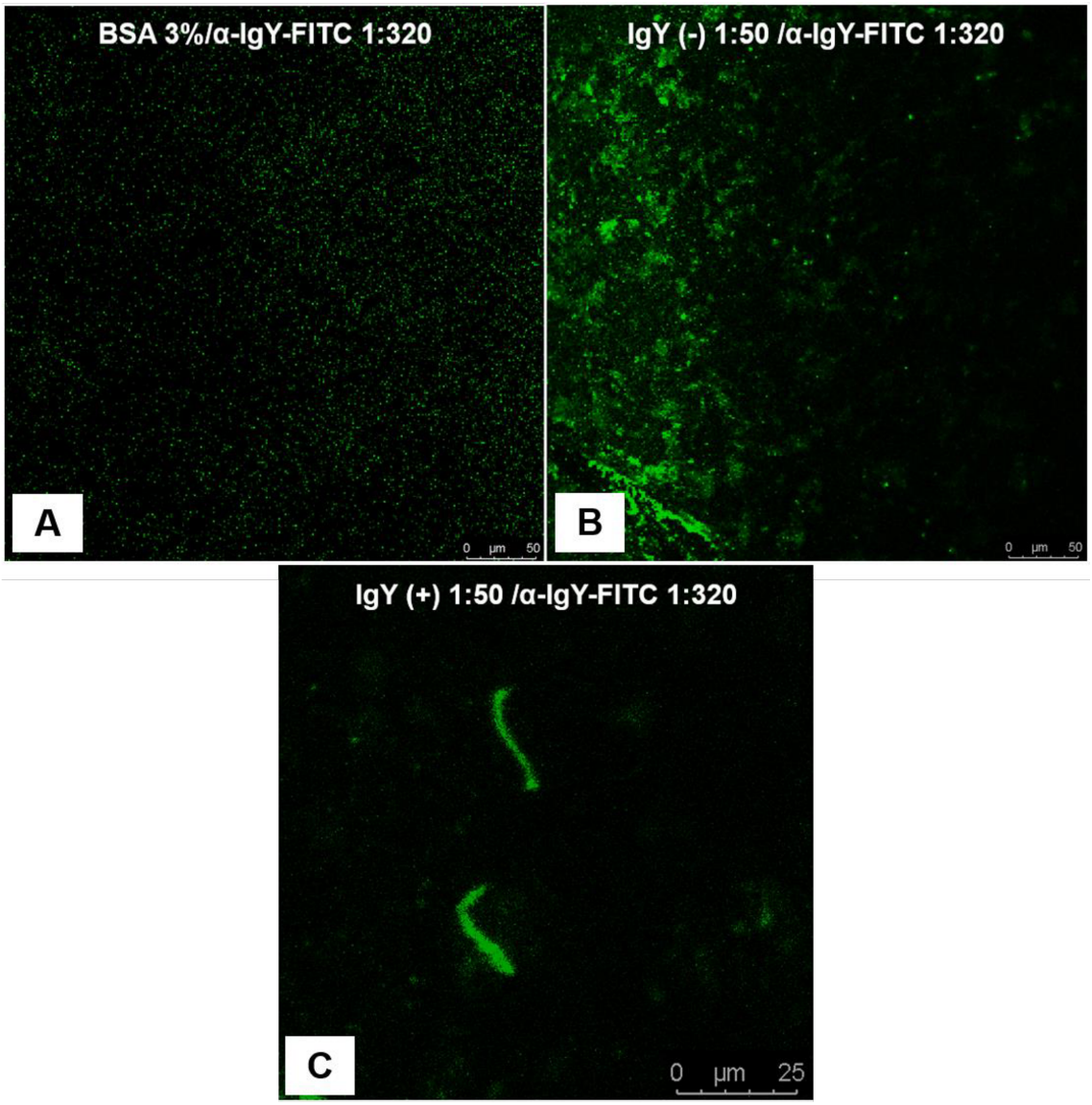


Figura 7 - Imunofluorescência indireta para IgY anti-peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae. (A) albumina sérica bovina 3%; (B) $IgY_{(-)}$ - 1:50; (C) $IgY_{(+)}$ - 1:50. α-IgY-FITC: anti-IgY marcado com isotiocianato de fluoresceína (1:320).

Tabela 1 - Descrição do número de animais, inóculos e identificação utilizada no texto para as galinhas e os coelhos utilizados no estudo

Animais	inóculos	Identificação
Galinhas (n=8)		**Ga1/Ga2**
	Peptídeo 127 (n=2)	$Ga_{Soro/P127}$ $Ga_{Gema/P127}$
	Peptídeo 128 (n=2)	$Ga_{Soro/P128}$ $Ga_{Gema/P128}$
	Peptídeo 129 (n=2)	$Ga_{Soro/P129}$ $Ga_{Gema/P129}$
	Pool dos três peptídeos (n=1)	$Ga_{Soro/Pool}$ $Ga_{Gema/Pool}$
	PBS 0,01M (n=1)	$Ga_{Soro/Controle}$ $Ga_{Gema/Controle}$
Coelhos (n=5)		
	Peptídeo 127 (n=1)	$Coelho_{P127}$
	Peptídeo 128 (n=1)	$Coelho_{P128}$
	Peptídeo 129 (n=1)	$Coelho_{P129}$
	Pool dos três peptídeos (n=1)	$Coelho_{Pool}$
	PBS 0,01M (n=1)	$Coelho_{Controle}$

Tabela 2 – Concentração ótima de reagentes utilizados no teste ELISA indireto para detecção de anticorpos IgY da gema e amostras de soro de galinhas e IgG nas amostras de soro de coelhos inoculados com peptídeos.

REAGENTES	$ELISA_{Peptídeos}$ IgY gema	$ELISA_{Peptídeos}$ IgY soro	$ELISA_{Peptídeos}$ IgG
Peptídeos sintéticos	10 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
Anticorpo Primário (soro)	--	1:200	1:100
Anticorpo Primário (Gema)	4 µg/poço	--	--
Anticorpo secundário	1:5.000	1:5.000	1:5.000

Tabela 3 – Identificação dos peptídeos selecionados pelo programa BepiPred, sequência de aminoácidos, localização na proteína, índice de imunogenicidade e número de acesso da proteína hipotética de *Leptospira interrogans* sorovar Lai.

Identificação do peptídeo	Sequência	Localização	Índice de Imunogenicidade	Número de acesso	Lai locus
EP1	KEADPNAADADNPVN	89-103	0,8289	AAN50190.1	LA_2992
EP2	GEPKEADPNAADADN	86-100	0,8235	AAN50190.1	LA_2992
EP3	DPNAADADNPVNPQT	92-106	0,8218	AAN50190.1	LA_2992
EP4	AADADNPVNPQTNKP	95-109	0,8052	AAN50190.1	LA_2992

Tabela 4 – Lista com a identificação de peptídeos sintetizados e utilizados para testes $ELISA_{Peptídeo}$, sequência de aminoácidos e sua localização na proteína.

Identificação do peptídeo	Abreviatura	Sequência	Localização
LEP-127	P127	GEPKEADPNAADADNPVN (confluência EP1 e EP2)	86-103
LEP-128	P128	DPNAADADNPVNPQTNKP (confluência EP3 e EP4)	92-109
LEP-129	P129	DPNAADADNPVN (sequência consenso)	92-103

Tabela 5 - Índice Avidez para IgG e IgY de animais inoculados com o peptídeo 127 após o tratamento com ureia 6M ou PBS 0,01M.

Animais Inoculados[1]	D.O. PBS 0,01 M	D.O. Ureia 6M	Índice Avidez
$Ga1_{Gema/P127}$	0,523	0,497	95%
$Ga_{Pool/Gema/P127}$	0,358	0,275	77%
$Ga1_{Soro/P127}$	0,563	0,425	88%
$Ga_{Pool/Soro/P127}$	0,256	0,244	96%
$Coelho_{Soro/P127}$	0,221	0,147	67%
Coelho $Pool_{Soro/P127}$	0,382	0,244	64%

D.O. – Densidade óptica; [1]Foram utilizadas amostras de soro ou de gema correspondentes à sexta semana experimental.

6. Referências bibliográficas

1. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat Rev Microbiol. 2017;15(5):297-307. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5
2. Saúde Md. Situação Epidemiológica / Dados 2018 [Available from: http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose/9805-situacao-epidemiologica-dados.
3. Cleaveland S, Sharp J, Abela-Ridder B, Allan KJ, Buza J, Crump JA, et al. One Health contributions towards more effective and equitable approaches to health in low- and middle-income countries. Philosophical transahttps://doi.org/10.1098/rstb.2016.0168ctions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 2017;372(1725).
4. Rajala EL, Sattorov N, Boqvist S, Magnusson U. Bovine leptospirosis in urban and peri-urban dairy farming in low-income countries: a “One Health” issue? Acta Veterinaria Scandinavica. 2017;59. https://doi.org/10.1186/s13028-017-0352-6
5. Chandy S, Kirubanandhan L, Hemavathy P, Khadeeja AM, Kurian SJ, Venkataraman K, et al. Serovar prevalence of Leptospira in semirural India and the development of an IgM-based indirect ELISA. J Infect Dev Ctries. 2017;11(3):234-41. https://doi.org/10.3855/jidc.8067
6. Deneke Y, Sabarinath T, Gogia N, Lalsiamthara J, Viswas KN, Chaudhuri P. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. Mol Cell Probes. 2014;28(4):141-6. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001
7. Sathiyamoorthy A, Selvaraju G, Palanivel KM, Srinivasan AP. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine leptospirosis. Vet World. 2017;10(5):530-5. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.530-535
8. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78(1):1-8. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012
9. Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL, et al. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010;33(5):375-87. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.01.001
10. Andre-Fontaine G, Aviat F, Marie JL, Chatrenet B. Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154-178). Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2015;39:1.https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.12.002
11. Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. Int J Mol Sci. 2017;18(1). https://doi.org/10.3390/ijms18010158
12. de Alvarenga Mudadu M, Carvalho V, Leclercq SY. Nonclassically secreted proteins as possible antigens for vaccine development: a reverse vaccinology approach. Appl Biochem Biotechnol. 2015;175(7):3360-70. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1507-4
13. Fernandes LG, Siqueira GH, Teixeira AR, Silva LP, Figueredo JM, Cosate MR, et al. Leptospira spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. Vet Immunol Immunopathol. 2016;176:50-7. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.004
14. Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. Biotechnol Adv. 2011;29(6):860-8. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003
15. Grando TH, Baldissera MD, de Sá MF, do Carmo GM, Porto BCZ, Aguirre GSV, et al. Avian antibodies (IgY) against Trypanosoma cruzi: Purification and characterization studies. J Immunol Methods. 2017;449:56-61. https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002
16. Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Vet Immunol Immunopathol. 2010;135(3-4):173-80. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011
17. Richer L, Potula HH, Melo R, Vieira A, Gomes-Solecki M. Mouse model for sublethal Leptospira interrogans infection. Infect Immun. 2015;83(12):4693-700. https://doi.org/10.1128/IAI.01115-15

18. Seenichamy A, Bahaman AR, Mutalib AR, Khairani-Bejo S. Production and characterization of a polyclonal antibody of anti-rLipL21-IgG against leptospira for early detection of acute leptospirosis. Biomed Res Int. 2014;2014:592858. https://doi.org/10.1155/2014/592858
19. Oliveira TL, Grassmann AA, Schuch RA, Seixas Neto AC, Mendonça M, Hartwig DD, et al. Evaluation of the Leptospira interrogans Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. PLoS One. 2015;10(11):e0142821. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142821
20. Oliveira TL, Bacelo KL, Schuch RA, Seixas FK, Collares T, Rodrigues OE, et al. Immune response in hamsters immunised with a recombinant fragment of LigA from Leptospira interrogans, associated with carrier molecules. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(11):712-6. https://doi.org/10.1590/0074-02760160214
21. Monaris D, Sbrogio-Almeida ME, Dib CC, Canhamero TA, Souza GO, Vasconcellos SA, et al. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant Leptospira interrogans Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2015;22(8):965-73. https://doi.org/10.1128/CVI.00285-15
22. Tavares TCF, Soares PM, Neves JHFF, Soares MM, F. Junior Á, Souza DLNd, et al. Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-Leptospira spp. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2013;33(9):1097-102. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000900008
23. Vasconcellos FA, Coutinho ML, da Silva EF, Fernandes CP, Monte LG, Seyffert N, et al. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of Leptospira spp. in human blood serum. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104(4):259-64. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.10.005
24. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D12-D7. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071
25. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res. 2006;2:2. https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2
26. Akita EM, Nakai S. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). J Immunol Methods. 1993;162(2):155-64. https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90380-P
27. Ferreira Junior A, Santiago FM, Silva MV, Ferreira FB, Macedo Junior AG, Mota CM, et al. Production, characterization and applications for Toxoplasma gondii-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. PLoS One. 2012;7(7):e40391. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391
28. Pinne M, Haake D. Immuno-fluorescence Assay of Leptospiral Surface-exposed Proteins. J Vis Exp [Internet]. 2011; (53). Available from: http://dx.doi.org/10.3791/2805.
29. Schade R, Behn I, Ehrhard M, Hlinak A, Staak C. Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology (Springer Lab Manuals). First ed. Germany: Springer; 2001. 255 p. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9
30. Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-Helicobacter pylori urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of H. pylori urease. Journal of medical microbiology. 2004;53(Pt 1):31-4. https://doi.org/10.1099/jmm.0.05327-0
31. Munhoz LS, Vargas GDÁ, Fischer G, Lima Md, Esteves PA, Hübner SdO. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. Ciência Rural. 2014;44:153-https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025
32. Larsson A, Carlander D, Wilhelmsson M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. Food and Agricultural Immunology. 2008;10(1):8. https://doi.org/10.1080/09540109809354966
33. Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern Lab Anim. 2005;33(2):129-54. https://doi.org/10.1177/026119290503300208

34. Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. J Genet Eng Biotechnol [Internet]. 2018; 16(1):[99-103 pp.]. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003.
35. Ren H, Yang W, Thirumalai D, Zhang X, Schade R. A comparative evaluation of six principal IgY antibody extraction methods. Alternatives to laboratory animals : ATLA. 2016;44(1):11-20. https://doi.org/10.1177/026119291604400111
36. Reddy PK, Shekar A, Kingston JJ, Sripathy MH, Batra H. Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of alpha hemolysin of Staphylococcus aureus without staphylococcal protein A interference. J Immunol Methods. 2013;391(1-2):31-8. https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.02.004
37. Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. Ilar j. 2005;46(3):269-79. https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269
38. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(4):245-52. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.001

CAPÍTULO 4

Diagnóstico de leptospirose bovina utilizando peptídeo sintético de proteína hipotética de *Leptospira interrogans*

Artigo a ser submetido no periódico

Journal of Immunology Research

Diagnóstico de leptospirose bovina utilizando peptídeo sintético de proteína hipotética de *Leptospira interrogans*

Jandra Pacheco dos Santos[1], Álvaro Ferreira Júnior[2], Ricardo Toshio Fujiwara[3], Daniella Castanheira Bartholomeu[3], Anna Monteiro Correia Lima[4]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

[2] Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

[3] Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4] Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

Autor para correspondência: jandra.santos@yahoo.com.br

Resumo

A leptospirose é uma zoonose causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira* spp. Nos bovinos, essa bactéria provoca transtornos reprodutivos e acarreta perdas econômicas à pecuária. *O* diagnóstico da infecção bovina é realizado por meio *do microscopic agglutination test* (MAT), porém são necessários antígenos vivos, é laborioso e não discrimina a classe de anticorpos. O desenvolvimento de plataformas de diagnóstico mais rápidas e com antígenos seguros é uma necessidade para a rotina de diagnóstico da leptospirose bovina. O objetivo deste estudo foi a padronização de uma plataforma *enzyme-linked immunosorbent assay* indireto com o uso de peptídeos sintéticos ($ELISA_{peptídeo}$) de *Leptospira interrogans* para o diagnóstico da leptospirose bovina. Foram preditas e sintetizadas três sequências peptídicas (P127, P128 e P129) da proteína hipotética (AAN50190.1). As condições ótimas para o $ELISA_{peptídeo}$ foram: microplacas de polivinil *high-biding*, peptídeo na concentração final de 5µg/mL, bloqueio com PBS-BSA 5%, anticorpo primário e conjugado nas diluições 1:200 e 1:20.000, respectivamente. P127 demonstrou a maior reatividade e foi selecionado para os testes de padronização utilizando amostras de soro de bovinos provenientes de dois diferentes rebanhos (RB1, n=80; RB2, n=100), não vacinados, com histórico de problemas reprodutivos e testados pelo MAT. A comparação dos valores de densidade óptica entre RB1 e RB2 não revelou diferença estatisticamente significativa. Quanto à performance do $ELISA_{Peptídeo,}$ a sensibilidade e a especificidade relativas (ELISA *versus* MAT), para RB1 e RB2 foram 85% - 93% e 78% - 80%, respectivamente. Os índices *Kappa* para RB1 e RB2 foram 78% (bom) e 58% (regular), respectivamente. Peptídeos sintéticos de proteína hipotética de *L. interrogans* ligam anticorpos IgG sérico de bovinos naturalmente expostos à bactéria. Esses peptídeos são promissores para aplicação em plataformas ELISA para o diagnóstico da leptospirose bovina.

Palavras chave: antígenos, diagnóstico indireto, ELISA, imunoinformática

1. Introdução

A Leptospirose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (1). É considerada uma zoonose negligenciada, de regiões tropicais, cuja dispersão ambiental pode ocorrer por meio da eliminação na urina de diferentes mamíferos, entre eles os bovinos portadores renais (2). De acordo com a região geográfica avaliada, há variação na prevalência da leptospirose. Entretanto, nos rebanhos bovinos brasileiros, o sorogrupo Sejroe é o mais prevalente, seguido pelos sorogrupos Javanica, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Tarassovi (3, 4).

Estima-se que, anualmente, 30% das fêmeas bovinas no Brasil apresentem algum tipo de perda reprodutiva e que a redução de 10% nesse total resultaria um ganho aproximadamente sete milhões de bezerros ao ano (5). Nesse contexto, como a leptospirose tem impacto negativo na reprodução bovina, o *screening* mais eficiente dessa infecção melhorará os índices reprodutivos (6, 7).

O *microscopic agglutination test* (MAT) é o teste de referência para o diagnóstico indireto da leptospirose bovina (8). Embora mundialmente utilizado para o *screening* da infecção, entre as limitações da técnica está a manipulação de antígenos vivos que devem representar os sorogrupos prevalentes em uma determinada região, não detectar anticorpos não aglutinantes e a sensibilidade reduzida (8, 9).

O sucesso no controle da leptospirose bovina exige a identificação do portador renal assintomático (5). O MAT detecta anticorpos aglutinantes contra o lipopolissacarídeo (LPS) da *Leptospira*. Entretanto, devido à baixa sensibilidade, o MAT não detecta a infecção em estágio inicial ou baixos títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por estirpes adaptadas aos hospedeiros (5, 10, 11).

O *enzyme-linked immunosorbent assay* indireto (ELISA) é uma plataforma de diagnóstico com sensibilidade e especificidade elevadas (12) e que também pode ser utilizada para o *screening* da leptospirose (5). O ELISA possibilita utilizar diferentes antígenos, tais como as proteínas hipotéticas (PHs) da parede bacteriana (11, 12, 13,14, 15, 16, 17) sem a necessidade da manipulação de leptospiras patogênicas vivas.

As PHs podem compor quase a metade de um genoma procarioto, são codificadas por *open read frames* identificáveis, mas que ainda não há indícios da sua

transcrição e tradução. Porém, é provável que as PHs tenham função na sobrevivência do patógeno e, por isso, sejam promissores como marcadores de infecção (18). Além disso, algumas dessas PHs são conservadas em todos os membros de um gênero taxonômico (19). A plataforma ELISA, utilizando PHs, tem potencial para apresentar sensibilidade e especificidade, assim como valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN), satisfatórios (16, 20).

Utilizando programas de bioinformática, sequências peptídicas que contêm os epítopos mais imunogênicos podem ser identificadas em proteínas com confiabilidade (18). Esses peptídeos podem ser sintetizados e utilizados no ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*Leptospira* e adicionarem sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância com o MAT no diagnóstico da leptospirose bovina (21, 22).

Não há na literatura, até o presente, plataformas ELISA desenvolvidas com peptídeos sintéticos de PHs para o sorodiagnóstico da leptospirose bovina. Nesse estudo, o objetivo foi a padronização de uma plataforma de ELISA indireto com o uso de peptídeos sintéticos de PH de *L. interrogans* sorovar Lai ($ELISA_{Peptídeo}$) para a detecção de IgG anti-*Leptospira* em bovinos naturalmente infectados.

2. Material e Métodos

2.1. Princípios éticos

Os testes com uso de animais foram realizados de acordo como o guia do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), seguindo as leis brasileiras para “Procedimentos para uso científico de animais” (11794/2008). A coleta das amostras de soro usadas para esse estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob o número CEUA–UFG 008/14 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número CEUA 42/2017.

2.2. Obtenção dos alvos antigênicos *in silico*

2.2.1. Predição de epítopos lineares de células B por programas de bioinformática

A sequência de aminoácidos correspondente à proteína hipotética (AAN50190.1) de *Leptospira interrogans* sorovar Lai *strain* 56601 foi obtida no GenBank (23), sob número de acesso NC_004342.2. Posteriormente, essa sequência

foi analisada para predição de epítopos lineares de células B pelo programa BepiPred 1.0 com *cut-off* de 1.3 (24).

2.2.2. Síntese das sequências peptídicas

As sequências peptídicas preditas como as mais antigênicas foram quimicamente sintetizadas pela empresa Aminotech® (Diadema, São Paulo, Brasil), a sua pureza foi verificada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a massa relativa foi obtida por espectrometria de massas.

2.3. Amostras de soro de bovinos

As amostras de soro bovino utilizadas nesse estudo estão descritas em detalhes na Tabela 1. Todas as amostras de soro foram testadas no MAT. As amostras de soro dos bezerros RN foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as demais amostras de soro foram gentilmente cedidas pelo Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os rebanhos R1 e R2 nunca haviam sido vacinados contra leptospirose e apresentaram histórico de falhas reprodutivas.

2.4. *Microscopic agglutination test* (MAT)

Todas as amostras de soro foram testadas no MAT (9). Inicialmente, as amostras foram diluídas (1:50) em solução tamponada com fosfatos (PBS), 0,01M, pH 7,2 e depois incubados com aproximadamente 2 x 10^8 leptospiras vivas/ml (v/v) com diluição final 1:100. O painel de sorovares de referência utilizados foram: Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffi. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro (Zeiss, Germany). Foram consideradas reagentes as amostras de soro com presença de 50% ou mais de aglutinação das leptospiras na diluição 1:100. As amostras reagentes foram novamente examinadas com diluições crescentes do soro na razão dois,

considerando-se como título a recíproca da sua maior diluição a apresentar 50% de aglutinação. Foram excluídos do teste ELISA$_{Peptídeo}$ todos os sororeagentes para apenas um sorovar no título 100.

2.5. Desenvolvimento do *Enzyme-linked immunosorbent assay* indireto com peptídeo (ELISA$_{Peptídeo}$)

2.5.1 Reagentes utilizados no desenvolvimento

Fase sólida – microplacas com 96 poços de poliestireno ou de polivinil (Corning-Costar); ***Antígenos*** – três peptídeos sintéticos de *Leptospira interrogans* (tabela 1); ***Sistema de detecção*** – IgG de coelho anti-IgG bovina conjugada com peroxidase (SIGMA); *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Slow Kinetic Form, for ELISA* (SIGMA), solução de parada – H_2SO_4 2N e leitura em 450 nm (TP-Reader, ThermoPlate, Brasil); ***Soluções para as imunorreações*:** PBS 0,01M, pH 7,2 (NaCl 0,8%; Na_2PO_4 0,12%, KH_2PO_4 0,02%, KCl 0,02%); solução carbonato/bicarbonato (SCB), 0,1M, pH 8,6 ($NaHCO_3$ 1M; Na_2CO_3 1M); solução de bloqueio – albumina sérica bovina 5% em PBS (PBS-BSA 5%), tampão de amostra – PBS-BSA 5% e tampão de lavadas – Tween 20 0,05% em PBS (PBS-T).

2.5.2 Padronização

A máxima performance do teste ELISA$_{Peptídeo}$ foi obtida por meio do método de *checkerboard*. As microplacas foram sensibilizadas com 50 µL dos peptídeos/poço nas concentrações de 1, 2, 5 ou 10 µg/mL de solução SCB 0,1M, pH 8,6, a 4°C, *overnight* e lavadas três vezes com PBS-T. O bloqueio dos sítios para ligações inespecíficas foi realizado com PBS-BSA 5% (150 µL/poço), a 26°C ou 37°C, 60 minutos, seguido ou não de três lavadas. As amostras de soro de bovinos (50 µL) foram testados nas diluições 1:100, 1:200, 1:400, seguido de cinco lavadas. O anticorpo secundário (50 µL) foi avaliado nas diluições 1:5000, 1:10.000 e 1:20.000, a 26°C ou 37°C por 60 minutos e lavado cinco vezes. A revelação foi desenvolvida com *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Slow Kinetic Form, for* ELISA (50 µL), a 26°C, por 15 minutos, abrigado da luz, interrompida com 50 µL H_2SO_4 2N e a leitura imediata em 450 nm (Thermoplate Reader, Brasil).

O *cut-off* foi obtido pela média da densidade óptica (DO) dos NR acrescidos de dois ou três desvios padrão (2DP ou 3DP). Os valores de DO das amostras de soro

inferiores ao *cut-off* 2DP foram consideradas não reagentes. Os valores de DO das amostras superiores ao *cut off* 3DP foram considerados reagentes e entre 2DP e 3DP, intermediários, porém foram interpretados como sendo reagentes para os cálculos de sensibilidade e especificidade do teste.

2.6. Avaliação de repetibilidade e variabilidade

A avaliação de repetibilidade e de variabilidade do $ELISA_{Peptídeo}$ foi realizada por meio do cálculo do coeficiente de variação intraplaca (CV_{intra}) e interplaca (CV_{inter}). Foram utilizadas 12 amostras de soro de bovinos reagentes testadas em duplicatas e repetidas em duas microplacas de ELISA.

2.7. Análises estatísticas

A normalidade foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste exato de Fischer foi utilizado para comparação entre dois grupos de resultados. Foi considerado estatisticamente significativo quando $P<0,05$. A estatística descritiva foi utilizada para a expressão dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo e coeficiente de variação. O grau de concordância com o MAT foi medido pelo índice *Kappa.* Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prism v 8.0

3. Resultados

3.1. Peptídeos selecionados

Nesse estudo, o programa BepiPred foi utilizado para predição de epítopos lineares de células B localizados em uma proteína hipotética de *L. interrogans* sorovar Lai. Os resultados da predição, apresentados na Tabela 2, apontaram sequências peptídicas dotadas de imunogenicidade. Para a síntese, foram escolhidas três sequências (Tabela 3), sendo duas confluências dos epítopos mais imunogênicos (P127e P128) e uma sequência consenso (P129).

3.2. Otimização dos procedimentos para o teste $ELISA_{peptídeo}$

As condições ótimas para o $ELISA_{Peptídeo}$ foram: microplaca de polivinil, peptídeo na concentração final 5µg/mL, bloqueio com PBS-BSA 5%, incubado por 60 minutos a 37°C e somente aspirado; anticorpo primário e conjugado nas diluições 1:200 e 1:20.000, respectivamente, ambos diluídos em PBS-BSA 5%, incubados por 60 minutos a 37°C.

3.3. Determinação do *background* e do *cut-off* do teste $ELISA_{peptídeo}$

Para a determinação do *background* do $ELISA_{Peptídeo,}$ foram realizadas 30 replicatas utilizando o *pool* de amostras de soro dos bezerros RN (Tabela 3). A DO média para o P127 foi 0,065±0,013 ($IC_{95\%}$: 0,060 a 0,070), para P128 foi 0,067±0,006 ($IC_{95\%}$: 0,64 a 0,69) e P129 foi 0,067±0,011 ($IC_{95\%}$: 0,063 a 0,072).

O soro dos bezerros RN não contém IgG, por isso eles não possibilitaram um cálculo de *cut-off* realista para os bovinos que são mantidos a campo. Nesse contexto, para o cálculo do *cut-off* do teste $ELISA_{Peptídeo}$, 12 amostras de soro dos bovinos jovens, não reagentes no MAT (SN), foram testadas contra os três peptídeos sintéticos (Tabela 4). A DO média para P127 foi 0,117±0,055 ($IC_{95\%}$: 0,082-0,152), para P128 foi 0,099±0,041 ($IC_{95\%}$: 0,071-0,127) e para 129 0,125±0,057 ($IC_{95\%:}$ 0,088-0,162).

3.4. Determinação de reatividade dos anticorpos IgG de bovinos aos peptídeos sintéticos

As amostras de 12 soros de bovinos reagentes no MAT (SR, título ≥ 800), foram testadas contra P127, P128 e P129 (Figura 1). Para P127, P128 e P129, onze, dez e oito bovinos, respectivamente, foram reagentes no $ELISA_{Peptídeo}$. A análise de variabilidade da reatividade das amostras de soro contra os três peptídeos não apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 2). A DO média para P127 foi 0,483±0,176 ($IC_{95\%}$: 0,297-0,520), para P128 foi 0,367±0,177 ($IC_{95\%}$: 0,224-0,449) e para 129 0,353±0,201 ($IC_{95\%:}$ 0,226-0,481). A melhor performance foi obtida com P127 e, por isso, ele foi selecionado para as análises de padronização do $ELISA_{Peptídeo}$.

3.5. Repetibilidade e reprodutibilidade de ensaios

Os resultados de repetibilidade e de reprodutibilidade, utilizando os 12 bovinos SR, para o $ELISA_{Peptídeo}$ foram apresentados na Tabela 5. O CV_{intra} variou entre 0,21%-13,69% (média 3,09%) na Placa 1 e entre 0,49% e 13,14% (média 4,86) na Placa 2, enquanto o CV_{inter} foi de 8,71%-13,97% (média 10,83%).

3.6. Detecção de IgG anti-*Leptospira* em amostras de soro de bovinos dos rebanhos RB1 e RB2

A plataforma $ELISA_{Peptídeo}$ foi utilizada para a determinação da reatividade de anticorpos IgG em amostras de soro de bovinos de dois diferentes rebanhos (RB1 e RB2) contra P127 (Figura 3).

Para o RB1, um total de 80 amostras de soro foram testadas, sendo 40 reagentes no MAT e 40 não reagentes. A DO média dos reagentes foi 0,396 ± 0,174 ($IC_{95\%}$: 0,340-0,451; $DO_{mín.}$: 0,130 e $DO_{máx.}$:0,770). Para soros não reagentes a DO média foi 0,147±0,044 ($IC_{95\%}$: 0,133-0,161; $DO_{mín}$: 0,028 e $DO_{máx.}$:0,226).

Para o RB2 utilizou-se um total de 100 amostras de soro, sendo 50 reagentes e 50 não reagentes no MAT. A DO média dos reagentes foi 0,415 ± 0,215 (IC 95%: 0,354 - 0,476; $DO_{mín.}$: 0,139 e $DO_{máx.}$:1,008). Para os soros não reagentes a DO média foi 0,188 ± 0,043 ($IC_{95\%}$: 0,176 - 0,201; $DO_{mín}$: 0,092 e $DO_{máx.}$:0,281).

3.7. Comparação da performance do $ELISA_{Peptídeo}$ nos rebanhos RB1 e RB2

Os indicadores de performance para o $ELISA_{Peptídeo}$, utilizando P127, estão sumarizados na Tabela 6. RB1 apresentou valores de sensibilidade e especificidade maiores que RB2, assim como VPP e VPN. A análise da variabilidade das DOs das amostras de soro de bovinos reagentes e não reagentes de RB1 e RB2 estão apresentadas na Figura 4. Não foi observada diferença estatisticamente significativa.

3.8. Concordância entre $ELISA_{Peptídeo}$ e o MAT

A concordância entre o $ELISA_{Peptídeo}$ e o MAT (teste de referência) foi determinada por meio do cálculo do índice *Kappa*. Para RB1 e RB2 os valores foram 78% e 58%, indicando concordância boa e regular, respectivamente.

4. Discussão

O presente estudo apresenta o potencial de peptídeos sintéticos, exclusivamente selecionados por meio de ferramentas de bioinformática, a partir de proteína hipotética, com o uso genomas de *Leptospira interrogans*. Foi analisada a possibilidade desses peptídeos serem reconhecidos por IgG bovina anti-*Leptospira interrogans*, utilizando a plataforma ELISA indireta. O ELISA desenvolvido com peptídeos tem demonstrado sensibilidade e especificidade no diagnóstico de doenças dos animais (25-27). A abordagem por meio de bibliotecas aleatórias de fagos (*Phage display*), para a seleção de peptídeos, revelou o potencial das PHs para o diagnóstico da leptospirose humana (28). Entretanto o *Phage display* é laborioso, de alto custo e demanda o teste de todas as sequências peptídicas obtidas (29).

Nossa hipótese é que sequências peptídicas selecionadas, exclusivamente *in silico,* podem ser reconhecidas por anticorpos séricos de bovinos naturalmente expostos a *L. interrogans*. Considerando o baixo custo da bioinformática, a praticidade, a rapidez para obtenção de resultados, o acesso aos métodos de síntese de peptídeos e a facilidade para a aplicação em plataformas ELISA, propomos um $ELISA_{Peptídeo}$ com epítopos preditos de PHs de *L. interrogans*. Na seleção dos peptídeos, P127 e P128 representaram a confluência dos peptídeos de maior imunogenicidade, e 129 uma sequência consenso. Os algoritmos de predição de epítopos lineares de células B tornaram possível o desenvolvimento de antígenos de elevada pureza para a geração de plataformas de diagnóstico sorológico (30, 31).

Para a determinação do *background* do $ELISA_{Peptídeo}$, foram testadas amostras de soro de bezerros RN. A ausência de IgG no soro dos RN determinou a baixa reatividade observada. Para uma avaliação mais realista foram testadas as amostras de soro dos bovinos SN. A presença de IgG nessas amostras elevou o valor da DO observada. A escolha de animais mais jovens levou em consideração a menor probabilidade de exposição à *Leptospira*. A incorporação de 2DP ou 3DP ao valor médio da DO dos SN aumentou o valor de *cut-off* e elevou a especificidade do teste, minimizando o efeito de falsos positivos.

A repetibilidade e a reprodutibilidade do $ELISA_{Peptídeo}$ foram obtidas por meio do CV_{intra} e CV_{inter} placas, respectivamente. As 12 amostras de soro de bovino SR no MAT (título ≥ 800) foram testadas em duplicatas e em duas placas diferentes. O título 800 para amostra única de soro e sua associação com o histórico clínico e epidemiológico,

foram indicativos leptospirose aguda (32). O $ELISA_{Peptídeo}$ identificou a maioria dos bovinos sororeagentes no MAT, com uma maior performance para P127. Os CV_{intra} e CV_{inter} revelaram valores inferiores a 14%, o que indica uma boa repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente.

Na padronização do $ELISA_{Peptídeo}$, dois rebanhos bovinos RB1 (MG) e RB2 (GO) foram estudados quanto à reatividade de anticorpos IgG contra P127. Não houve diferença estatisticamente significativa entre RB1 e RB2. A sensibilidade relativa ao MAT para RB1 e RB2 foi de 85% e de 78% respectivamente. A especificidade para RB1 e RB2 foi 93% e 80%, respectivamente. Testes ELISA indireto que foram desenvolvidos com proteínas recombinantes demonstraram sensibilidade superior a 96% (35-37). Em nosso estudo, uma menor sensibilidade foi observada pode ser explicada pela restrição de alvos antigênicos para ligação dos anticorpos bovinos (38). Os resultados obtidos no $ELISA_{Peptídeo}$ podem estar subestimados pois não foram utilizadas amostras pareadas de soro; as aglutininas contra o lipopolissacarídeo da leptospira talvez sejam precocemente induzidas, em comparação com os anticorpos anti-peptídeos e, considerando a utilização de um único alvo antigênico, poderia ser especulada a variação de polimorfismo no MHC bovino.

O $ELISA_{Peptídeo}$ mostrou-se capaz de detectar anticorpos contra Leptospira e para a utilização de peptídeos sintéticos no diagnóstico indireto da leptospirose bovina. Atualmente, os estudos usando peptídeos para o diagnóstico da leptospirose bovina são escassos (21). A maioria dessas pesquisas estão focadas no aprimoramento de testes para detecção de casos humanos de leptospirose (28, 39). No entanto, considerando a alta prevalência e as perdas econômicas causadas pela leptospirose bovina, e a importância desses animais como fontes de infecção para humanos, é importante aprimorar as pesquisas para o diagnóstico dessa enfermidade nos rebanhos, o que poderá contribuir para o seu controle. O mesmo antígeno também poderá futuramente ser testado para diagnóstico de outras espécies animais, como bubalinos, caprinos, ovinos, suínos e caninos.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Project Number: APQ-00937-15) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro.

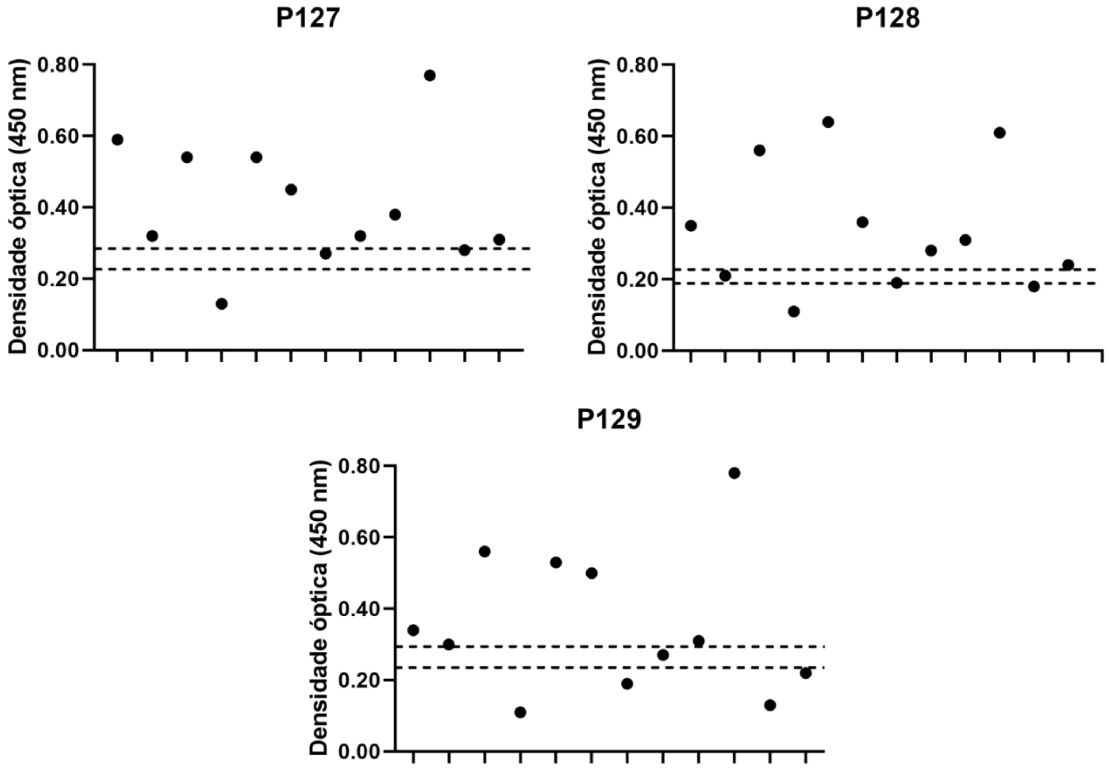


Figura 1 – Densidade óptica de amostras de soro de bovinos reagentes (SR) no *Microscopic Agglutination Test* na execução da otimização do ELISA$_{Peptídeo}$. Plot da DO média dos bovinos SR (n=12) para P127, P128 e P129. Linhas pontilhadas: superior – DO dos não reagentes mais três desvios padrão (3DP); inferior – DO dos não reagentes mais dois desvios padrão (2DP). DO > 3DP = reagente; DO < 2DP = não reagente; 2DP≤DO≥3DP = intermediária.

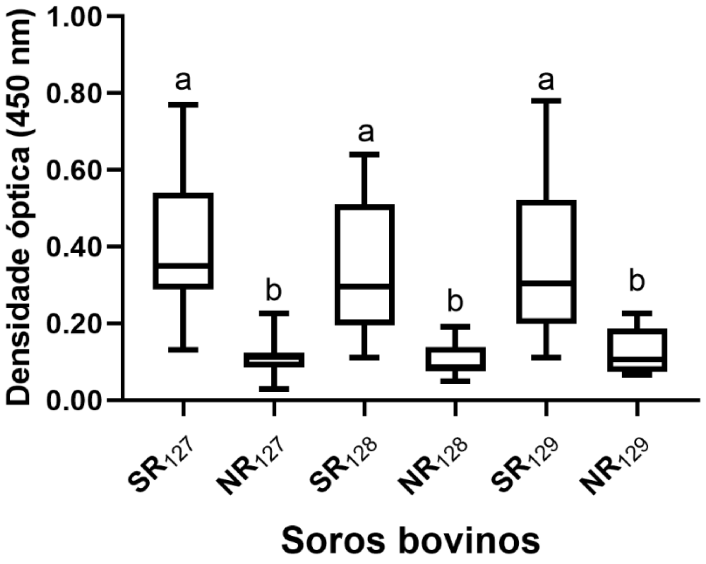


Figura 2 – Comparação da média da densidade óptica de bovinos reagentes (SR) e não reagentes (NR) no MAT de acordo com a otimização do ELISA$_{Peptídeo}$. Análise em box plot de SR (n=12) e NR (n=12), para P127, P128 e P129. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

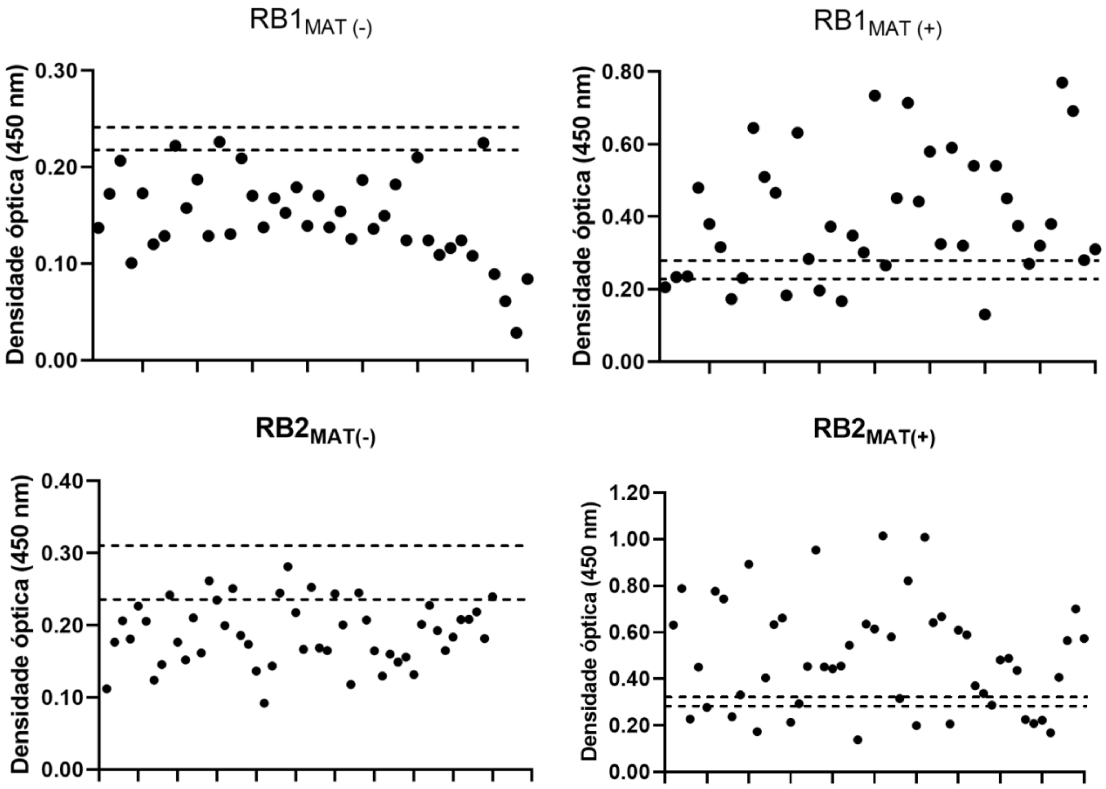


Figura 3 – Densidade óptica de bovinos dos rebanhos RB1 e RB2 reagentes no MAT (MAT_+) e não reagentes (MAT_-) de acordo com a padronização do $ELISA_{Peptídeo}$. Plot da DO média dos bovinos RB1 (MAT_+=40 e MAT_-=40) e RB2 (MAT_+=50 e MAT_-=50) para P127. Linhas pontilhadas: superior – DO dos não reagentes mais três desvios padrão (3DP); inferior – DO dos não reagentes mais dois desvios padrão (2DP). DO > 3DP = reagente; DO < 2DP = não reagente; 2DP≤DO≥3DP = intermediária.

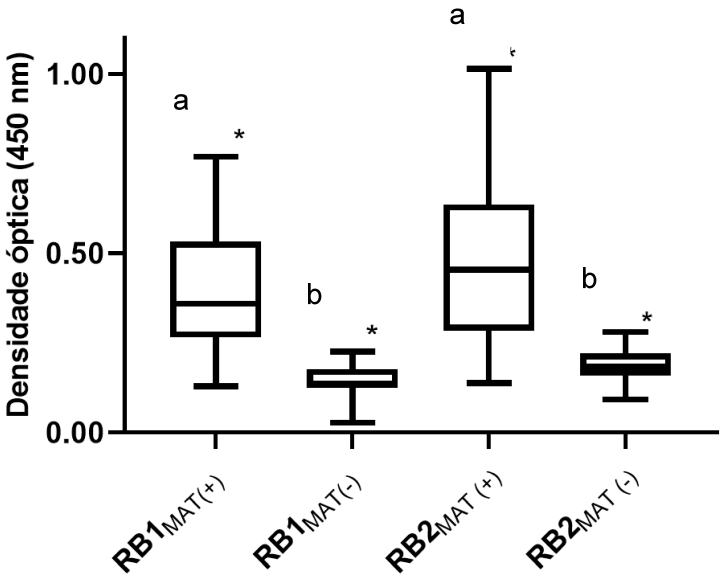


Figura 4 - Comparação da média da densidade óptica dos bovinos de RB1 e RB2 de acordo com a padronização do ELISA$_{Peptídeo}$. Análise em box plot de $RB1_{MAT+}$ (n=40), $RB1_{MAT-}$ (n=40), $RB2_{MAT+}$ (n=50) e $RB2_{MAT-}$ (n=50) para P127. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1 – Descrição das categorias de bovinos, número de animais utilizados no estudo, identificação das amostras (ID), comentários relevantes e aplicação no $ELISA_{Peptídeo}$.

Categoria	(n)	ID	Comentários	$ELISA_{Peptídeo}$
Bezerros recém-nascidos	12	**RN**	Coleta de sangue anterior à ingestão de colostro.	Determinação do *background*
Bovinos não reagentes no MAT*	12	**SN**	Entre seis meses e 12 meses de idade.	Cálculos de *cut-off*
Bovinos reagentes no MAT*	12	**SR**	Fêmeas, ≥24 meses de idade com título MAT ≥800	Otimização. Cálculos de repetibilidade e reprodutibilidade
Rebanho 1*	80	**R1**	Bovinos testados no MAT. Origem - MG	Padronização. Cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e índice Kappa
Rebanho 2*	100	**R2**	Bovinos testados no MAT. Origem - GO	

*Rebanhos sem histórico de vacinação contra leptospirose. MAT: *Microscopic agglutination test*; MG: Estado de Minas Gerais; GO: Estado de Goiás; VPN: valor preditivo negativo; VPP: valor preditivo positivo;

Tabela 2 – Identificação dos peptídeos selecionados pelo programa BepiPred, sequência de aminoácidos, localização na proteína, índice de imunogenicidade e número de acesso da proteína hipotética de *Leptospira interrogans* sorovar Lai.

Identificação do peptídeo	Sequência	Localização	Índice de Imunogenicidade	Número de acesso	Lai locus
EP1	KEADPNAADADNPVN	89-103	0,8289	AAN50190.1	LA_2992
EP2	GEPKEADPNAADADN	86-100	0,8235	AAN50190.1	LA_2992
EP3	DPNAADADNPVNPQT	92-106	0,8218	AAN50190.1	LA_2992
EP4	AADADNPVNPQTNKP	95-109	0,8052	AAN50190.1	LA_2992

Tabela 3 – Descrição da identificação dos peptídeos sintetizados e utilizados para o teste ELISA$_{Peptídeo}$, sequência de aminoácidos e sua localização na proteína hipotética.

Identificação do peptídeo	Abreviatura	Sequência	Localização
LEP-127	P127	GEPKEADPNAADADNPVN (confluência EP1 e EP2)	86-103
LEP-128	P128	DPNAADADNPVNPQTNKP (confluência EP3 e EP4)	92-109
LEP-129	P129	DPNAADADNPVN (sequência consenso)	92-103

Tabela 4 – Valores de média, desvio padrão e *cut-off* das amostras de soro de bezerros recém-nascidos (RN, n=12) e de bovinos jovens não reagentes no MAT (SN, n=12) de acordo com a otimização do ELISA$_{Peptídeo}$.

	P127		P128		P129	
	RN	**SN**	**RN**	**SN**	**RN**	**SN**
Média	0,065	0,117	0,067	0,099	0,067	0,125
DP	0,013	0,055	0,006	0,044	0,011	0,057
Cut-off 2xDP	0,091	0,227	0,079	0,187	0,089	0,239
*Cut-off 3*xDP	0,104	0,282	0,085	0,231	0,100	0,296

DP: desvio padrão

Tabela 5 – Coeficiente de variação (CV) intraplaca e interplaca utilizando amostras de soro de bovinos reagentes (SR=12) no MAT (título ≥ 800) de acordo com a otimização do $ELISA_{Peptídeo}$ utilizando P127.

		Identificador dos bovinos $SR_{MAT(+)}$											
		30	**44**	**53**	**92**	**128**	**174**	**182**	**193**	**194**	**217**	**228**	**235**
P127	$CV_{Placa\ 1}$	3,57	5,13	13,69	0,34	3,42	0,65	1,05	0,9	0,37	3,10	1,69	3,20
	$CV_{Placa\ 2}$	8,61	2,48	3,14	5,51	3,3	1,71	6,47	7,82	3,45	13,14	2,27	0,49
	CV_{Inter}	8,80	12,07	12,28	13,85	7,84	9,11	8,22	11,88	13,97	13,50	9,79	8,71

Tabela 6 – Descrição da sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os rebanhos RB1 e RB2 de acordo com o $ELISA_{Peptídeo}$ utilizando P127.

	Se	$IC_{95\%}$	Sp	$IC_{95\%}$	VPP	$IC_{95\%}$	VPN	$IC_{95\%}$	P
RB1	0,85	0,71-0,93	0,93	0,80-0,97	0,92	0,79-0,97	0,86	0,73-0,93	0,0001
RB2	0,78	0,65-0,87	0,80	0,67-0,89	0,79	0,64-0,89	0,78	0,66-0,87	0,0001

IC: intervalo de confiança; **Se**: sensibilidade; **Sp**: especificidade; **VPP**: valor preditivo positivo; **VPN**: valor preditivo negativo

5. Referências Bibliográficas

1. Hamond C, Pestana CP, Medeiros MA, Lilenbaum W. Genotyping of Leptospira directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. Epidemiol Infect. 2016;144(1):72-5. https://doi.org/10.1017/S0950268815001363
2. Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, et al. Isolation of pathogenic Leptospira strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(9):e0006694. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006694
3. Hamond C, Martins G, Lilenbaum W, Pinna M, Medeiros MA. Infection by Leptospira spp. in cattle in a tropical region, Rio de Janeiro, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2015;92(1):210. https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0519
4. Favero JF, de Araujo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, et al. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb Pathog. 2017;107:149-54. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032
5. Lilenbaum W, Martins G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. Transbound Emerg Dis. 2014;61 Suppl 1:63-8. https://doi.org/10.1111/tbed.12233
6. Libonati HA, Santos GB, Souza GN, Brandão FZ, Lilenbaum W. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. Trop Anim Health Prod. 2018;50(7):1625-9. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1604-9
7. Fávero JF, de Araújo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, et al. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb Pathog. 2017;107:149-54. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032
8. OIE. Leptospirosis. 2014. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018 [Internet]. OIE. 2018. Available from: http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/.
9. Adler B, de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010;140(3-4):287-96. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012
10. Bomfim MR, Ko A, Koury MC. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Vet Microbiol. 2005;109(1-2):89-94. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.002
11. Trueba GA, Bolin CA, Thoen CO. Evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of bovine leptospirosis caused by Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis. J Vet Diagn Invest. 1990;2(4):323-9. https://doi.org/10.1177/104063879000200413
12. Hartman EG, van Houten M, van der Donk JA, Frik JF. Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Immunol Immunopathol. 1984;7(1):33-42. https://doi.org/10.1016/0165-2427(84)90025-4
13. Sathiyamoorthy A, Selvaraju G, Palanivel KM, Srinivasan AP. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine leptospirosis. Vet World. 2017;10(5):530-5. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.530-535
14. Ye C, Yan W, Xiang H, He H, Yang M, Ijaz M, et al. Recombinant antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays in dogs. PLoS One. 2014;9(12):e111367. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111367
15. Hartleben CP, Leal FM, Monte LG, Hartwig DD, Seixas FK, Vasconcellos SA, et al. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. Curr Microbiol. 2013;66(2):106-9. https://doi.org/10.1007/s00284-012-0237-x
16. Oliveira TR, Longhi MT, de Morais ZM, Romero EC, Blanco RM, Kirchgatter K, et al. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(11):1715-22. https://doi.org/10.1128/CVI.00214-08

17. Ye C, Yan W, McDonough PL, McDonough SP, Mohamed H, Divers TJ, et al. Serodiagnosis of equine leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay using four recombinant protein markers. Clin Vaccine Immunol. 2014;21(4):478-83. https://doi.org/10.1128/CVI.00649-13
18. Gazi MA, Kibria MG, Mahfuz M, Islam MR, Ghosh P, Afsar MN, et al. Functional, structural and epitopic prediction of hypothetical proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: An in silico approach for prioritizing the targets. Gene. 2016;591(2):442-55. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.057
19. Naves JHFF, Oliveira FG, Bicalho JM, Santos PS, Ávila RAM, Chavez-Olortegui C, et al. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. J Virol Methods. 2018. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.009
20. Carvalho AMRS, Costa LE, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lima MP, et al. An ELISA immunoassay employing a conserved Leishmania hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. Cell Immunol. 2017;318:42-8. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.06.001
21. Andre-Fontaine G, Aviat F, Marie JL, Chatrenet B. Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154-178). Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2015;39:1-8. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.12.002
22. Sankar S, Harshan HM, Somarajan SR, Srivastava SK. Evaluation of a recombinant LigB protein of Leptospira interrogans serovar Canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Res Vet Sci. 2010;88(3):375-8. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.11.004
23. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D12-D7. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071
24. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res. 2006;2:2. https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2
25. Meshgi B, Jalousian F, Fathi S, Jahani Z. Design and synthesis of a new peptide derived from Fasciola gigantica cathepsin L1 with potential application in serodiagnosis of fascioliasis. Experimental parasitology. 2018;189:76-86. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.013
26. Mendes TM, Roma EH, Costal-Oliveira F, Dhom-Lemos LC, Toledo-Machado CM, Bruna-Romero O, et al. Epitope mapping of recombinant Leishmania donovani virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(5):e0005562. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005562
27. Dai J, Jiang M, Wang Y, Qu L, Gong R, Si J. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(3):338-42. https://doi.org/10.1128/CVI.05553-11
28. Ramli SR, Moreira G, Zantow J, Goris MGA, Nguyen VK, Novoselova N, et al. Discovery of Leptospira spp. seroreactive peptides using ORFeome phage display. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(1):e0007131. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007131
29. Tan Y, Tian T, Liu W, Zhu Z, C JY. Advance in phage display technology for bioanalysis. Biotechnol J. 2016;11(6):732-45. https://doi.org/10.1002/biot.201500458
30. Dhom-Lemos L, Viana AG, Cunha JLR, Cardoso MS, Mendes TAO, Pinheiro GRG, et al. Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. PLoS One. 2019;14(1):e0211719. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211719
31. Hisham Y, Ashhab Y. Identification of Cross-Protective Potential Antigens against Pathogenic Brucella spp. through Combining Pan-Genome Analysis with Reverse Vaccinology. J Immunol Res. 2018;2018:1474517. https://doi.org/10.1155/2018/1474517
32. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(4):245-52.

33. Pinto PAS, Libonati H, Penna B, Lilenbaum W. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. Tropical Animal Health and Production. 2016;48(2):239-48. https://doi.org/10.1007/s11250-015-0954-9
34. Martins G, Lilenbaum W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. Res Vet Sci. 2017;112:156-60. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.021
35. Tomich RGP, Bomfim MRQ, Koury MC, Pellegrin AO, Pellegrin LA, Ko AI, et al. Leptospirosis serosurvey in bovines from Brazilian Pantanal using IGG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. Brazilian Journal of Microbiology. 2007;38(4):674-80. https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400017
36. Mariya R, Chaudhary P, Kumar AA, Thangapandian E, Amutha R, Srivastava SK. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of Leptospira interrogans serovar canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2006;29(5-6):269- https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.007
37. Deneke Y, Sabarinath T, Gogia N, Lalsiamthara J, Viswas KN, Chaudhuri P. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. Mol Cell Probes. 2014;28(4):141-6. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001
38. Ghosh KK, Prakash A, Shrivastav P, Balamurugan V, Kumar M. Evaluation of a novel outer membrane surface-exposed protein, LIC13341 of Leptospira, as an adhesin and serodiagnostic candidate marker for leptospirosis. Microbiology. 2018;164(8):1023-37. https://doi.org/10.1099/mic.0.000685
39. Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL, et al. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010;33(5):375-87. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.01.001

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leptospirose é uma zoonose, com impacto em saúde pública e animal. As prevalências dessa doença nos rebanhos bovinos brasileiros são altas, normalmente ultrapassando os 50%. Por ser considerada uma doença reprodutiva, a leptospirose traz prejuízos às criações de bovinos. O *Microscopic Agglutination Test* (MAT) é a prova de referência para o diagnóstico indireto da infecção bovina, entretanto a sua execução depende da manipulação de bactérias vivas. Nesse contexto, a descoberta de novos alvos para diagnóstico que não necessite de culturas de leptospiras é de grande interesse.

As ferramentas de bioinformática possibilitam predizer com confiança regiões determinantes de antigenicidade (epítopos) dentro do genoma dos procariotos. Nesta pesquisa, foi inicialmente realizada a análise de 80 genomas de leptospiras e posteriormente selecionadas 37 proteínas potencialmente úteis para diagnóstico indireto. Deste total, uma proteína hipotética, de maior imunogenicidade, foi a escolhida para a predição de epítopos de linfócitos B.

Três peptídeos (P127, P128 e P129) foram sintetizados quimicamente e foram utilizados no desenvolvimento de anticorpos IgY e IgG, na padronização de ELISA indireto e otimização de uma reação de imunofluorescência indireta. Os resultados sugerem o potencial desses peptídeos para o diagnóstico da leptospirose bovina e para a geração de biológicos inovadores (p.ex. IgY extraída da gema do ovo).

Foram vários os desafios para a conclusão dessa pesquisa. As galinhas isogênicas não são acessíveis e, os coelhos desse padrão genético, eram economicamente inacessíveis. O processo de geração de anticorpos IgY é laborioso. Desde o alojamento das galinhas, sua manutenção e o armazenamento de um grande número de ovos. Embora sejam técnicas de fácil execução, a extração de anticorpos IgY da gema depende de equipamentos calibrados e com refrigeração.

A otimização e a padronização das plataformas ELISA para cada espécie animal e para cada objetivo desejado consumiu muito tempo e esforço. Desde o tipo de microplaca, temperaturas de incubação, tipos de bloqueio e diluições de anticorpos, todos foram desafios a serem superados. Devido a divergências com o MAT, foi necessário repetir inúmeras vezes os experimentos. Embora sejam duas técnicas de diagnóstico sorológico, os princípios de execução e os alvos são diferentes para o MAT e o $ELISA_{Peptídeo}$.

Os resultados da plataforma de imunofluorescência indireta (RIFI) sugerem que os anticorpos IgY anti-peptídeos se ligaram à superfície das leptospiras. A RIFI ainda está em desenvolvimento e os dados apresentados são preliminares.

Os resultados foram promissores, e sugerem que os peptídeos selecionados de maneira “reversa”, utilizando softwares com algoritmos construídos com critérios imunológicos, podem ser reconhecidos por anticorpos de bovinos com infecção natural por leptospiras.

As perspectivas futuras para os peptídeos sintéticos são a validação do $ELISA_{Peptídeo}$ para bovinos, o diagnóstico também da leptospirose canina e equina e padronização da técnica de imunohistoquímica para detecção de leptospiras em tecido renal. Quanto à proteína hipotética da qual foram originados os peptídeos, um projeto para sua clonagem, expressão e caracterização será futuramente submetido a agências de fomento, para que possamos conseguir recursos e continuar os trabalhos em busca de melhorias no diagnóstico da leptospirose animal.