

TATIANA BARRIONUEVO GOTTI

Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal

São Paulo

2015

TATIANA BARRIONUEVO GOTTI

Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Prof^a. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3177
FMVZ

Gotti, Tatiana Barrionuevo
Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal / Tatiana Barrionuevo Gotti. -- 2015.
148 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz.

1. Leptospira. 2. Diagnóstico. 3. Proteínas recombinantes. 4. LipL32. 5. Teste imunocromatográfico. I. Título.

Ao meu bebê, que mesmo antes de ter chegado, me fortalece todos os dias para continuar a caminhada...

Ao meu querido esposo, por todo companheirismo, amor, cumplicidade e dedicação incondicional em todos os momentos....

Aos meus pais João Gotti e Angela B. Gotti por todo amor, confiança e incentivo em todos os momentos...

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e a querida Danielle que estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

“É capaz quem pensa que é capaz”.

(Buda)

À Deus que me concedeu a oportunidade de vivenciar momentos tão únicos e especiais em minha vida. Gratidão!!

De uma maneira muito carinhosa, agradeço minha orientadora *Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz*, que desde o início acreditou em mim, me acolheu com muito carinho, paciência e dedicação. Uma profissional na qual me espelho, tenho muita admiração e respeito. Uma pessoa humana. Muito Obrigada!

À *Dra. Roxane Maria Fontes Piazza e a Dra Letícia Rocha* pelos ensinamentos científicos, atenção, força, paciência em todos os momentos desta pesquisa.

À *Dra. Angela Silva Barbosa*, na qual me recebeu muito bem no laboratório e pelo apoio.

Ao *Dr. Waldir Elias* pela recepção no laboratório e apoio.

À *Dra. Margareth Élide Genovez* que acreditou em mim desde o início e me incentivou a retomar meu grande sonho.

Às amigas *Vanessa Castro, Simone Miyashiro* e todas as pesquisadoras do laboratório de doença bacterianas da reprodução, por todo o carinho de sempre, que mesmo distantes estiveram sempre presentes nesta minha jornada.

Aos meus amigos do laboratório, *Denize, Demetria, Ligia, Larissa, Joana, Ludmila, Lídia, Natalia, Adriana, Claudia, Camila, Franciely, Afonso, Fernando, Fernanda, Adriana, Roberto, Thais, Bruna, Camila, Bruno* e a todos os amigos do laboratório que me receberam sempre com muito carinho, pelo apoio, ensinamentos em diversos momentos. Agradeço por deixarem meus dias mais leves. Cada um fez a diferença em minha vida.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia: alunos e funcionários pela amizade e colaboração.

À amiga-irmã *Sheila* e toda sua família, por estarem sempre em minha vida. E a amiga *Renata* por estar sempre ao meu lado.

Aos amigos *Rafaela, Rodrigo, Luiz, Alberto e Kátia* pelo momentos de reflexão e amizade.

Ao *Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, Zenaide, e a Gisele* do Laboratório de Epidemiologia e Zoonoses Bacterianas (FMVZ-USP), que cederam os soros de animais.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses (FMVZ-USP) por toda a ajuda, ensinamento e trabalho prestado, sou muito grata.

À FAPESP – *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste projeto (FAPESP 2011/179656) e a *Pró-Reitoria de Pós-Graduação* da USP pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“Ser feliz é encontrar força no perdão, esperanças nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. É agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.

Fernando Pessoa

“Ninguém muda ninguém; ninguém muda sozinho; nós mudamos nos encontros”.

Roberto Crema

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

GOTTI, T. B. **Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal.** [Development of a dipstick test for the diagnosis of animal leptospirosis]. 2015. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A leptospirose é uma doença bacteriana infectocontagiosa, de curso agudo ou crônico, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, de caráter zoonótico e cosmopolita que acomete o homem e os animais domésticos e silvestres. Pode ser transmitida de forma direta pelo contato com os fluidos contendo leptospiras, através das vias transplacentária e hematogênica, genital e o ato de mamar; ou de forma indireta pelo contato com ambiente contaminado com leptospiras. O conhecimento da gravidade da infecção, da distribuição geográfica, dos fatores de risco e das estirpes circulantes é de extrema importância para o estabelecimento da epidemiologia e o aprimoramento de medidas preventivas e diagnósticas. Neste estudo, avaliou-se a utilização de proteínas recombinantes de *Leptospira* spp. como antígenos no desenvolvimento de um teste rápido baseado em ensaio imunocromatográfico do tipo *dipstick*, como método diagnóstico da leptospirose animal. Foram selecionadas 11 proteínas recombinantes como candidatos a antígenos. As proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas na detecção de anticorpos específicos por *Western-blotting* e ELISA. Somente a LipL32 apresentou reatividade com os soros positivos para leptospirose. Dois testes imunocromatográficos, utilizando a proteína LipL32, foram desenvolvidos. Um teste tipo I utilizando a proteína LipL32 conjugada ao ouro coloidal e outro tipo III com o ouro coloidal conjugado a proteína A e a LipL32 na linha teste. Em ambos as linhas teste e controle reagiram, demonstrando que os testes estão funcionando. O teste tipo I realizado manualmente mostrou resultados satisfatórios para os soros bovinos e soro hiperimune de coelho. O tipo III mostrou reatividade para as amostras de soro bovino, equino, coelho e cão. Quando se aplicou este dois testes em máquinas automatizadas não foi possível detectar a linha teste, provavelmente devido a necessidade de nova padronização de todos os parâmetros do método.

Palavras-chave: *Leptospira*. Diagnóstico. Proteínas recombinantes. LipL32. Teste imunocromatográfico.

ABSTRACT

GOTTI, T. B. **Development of a dipstick test for the diagnosis of animal leptospirosis.** [Desenvolvimento de um teste *dipstick* para o diagnóstico da leptospirose animal]. 2015. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Leptospirosis is an infectious bacterial disease of acute or chronic course, caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, with zoonotic and cosmopolitan character, which affects humans, wild and domestic animals. It can be transmitted directly by contact with fluids containing leptospires through placental, hematogenous and genital routes and through the act of breastfeeding; or indirectly by contact with an environment contaminated with leptospires. Acquiring knowledge about the infection severity, the geographical distribution, the risk factors, and the circulating strains is of utmost importance to establish the epidemiology and to improve preventive and diagnostic measures. In this study, recombinant proteins of *Leptospira* spp. were evaluated as antigens in the development of a rapid immunochromatographic assay based on the type dipsticks a method of diagnosing animal leptospirosis. 11 recombinant proteins were selected as candidate antigens. The purified recombinant proteins were evaluated in the detection of specific antibodies by *Western blotting* and ELISA. Only the LipL32 protein showed reactivity with positive sera for leptospirosis. Two immunochromatographic tests, using LipL32 protein, have been developed: a type I test using the LipL32 protein conjugated to colloidal gold and another, type III with colloidal gold conjugated to protein A and LipL32 in the test line. In both assays the test lines and the control lines reacted, showing that the methods are working. The type I test performed manually showed satisfactory results for bovine and hyperimmune rabbit sera. The type III test showed reactivity for bovine, horse, rabbit and dog sera. When these two tests were applied in automated machinery, it has not been possible to detect the line test, probably due to the need for further standardization of all method parameters.

Keywords: *Leptospira*. Diagnosis. Recombinant proteins. LipL32. Immunoassay test.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana infectocontagiosa, de curso agudo ou crônico, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, de caráter zoonótico e cosmopolita que acomete o homem, os animais domésticos e silvestres (FAINE et al., 1999). Apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sido evidenciada em mais da metade dos países, sendo particularmente prevalente nas Américas. Ocorre de forma endêmica na América Latina e no Caribe, com impacto na saúde pública e na economia agropecuária (GENOVEZ, 2007).

Até 1988, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies. A espécie *Leptospira interrogans* (senso lato) que compreendia todas as estirpes patogênicas e a espécie *Leptospira biflexa* (senso lato), com as estirpes saprófitas (LEVETT, 2001). Em 1987, o pesquisador brasileiro Yasuda e colaboradores propuseram uma nova classificação baseada em características genóticas e hibridação por homologia do DNA. Atualmente, o gênero *Leptospira* é dividido em 19 espécies, definidas por homologia de DNA e sequenciamento de genes, normalmente, o 16S rDNA (RAMADASS et al., 1992; WOO et al., 1997). Destas, nove espécies são consideradas patogênicas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. genospecies 1* e *L. wolffii*. Seis são saprófitas: *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. genospecies 3*, 4 e 5. Há, ainda, um grupo intermediário com quatro espécies, a *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii* e *L. licerasiae* cuja patogenicidade ainda não foi confirmada (YASUDA et al., 1987; BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Estas bactérias também são classificadas em sorovares definidos por reações de aglutinação após absorção dos soros com antígenos homólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são reunidos num mesmo sorogrupo (FAINE et al., 1999). Existem cerca de 300 sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas descritos em 25 sorogrupos. Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS (lipopolissacarídeo). A classificação fenotípica em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação genotípica (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras são bactérias espiraladas, muito finas com aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e comprimento variando de 6 a 20 µm. Apresentam as extremidades em forma de gancho e dois flagelos periplasmáticos responsáveis pela que facilitam na motilidade. Sua

membrana externa envolve completamente os flagelos e o cilindro protoplásmico helicoidal. Nesse cilindro, há o material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e a porção de peptidoglicano da parede celular (QUINN et al., 1994; HAAKE et al., 2000). O LPS é similar aos de outras bactérias Gram-negativas, porém com menor atividade endotoxigênica (SHIMIZU et al., 1987), sendo composto por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, *core*, e antígeno O. O lipídeo A é uma porção lipídica altamente conservada, que ancora o LPS à membrana externa celular. O *core* é uma porção polissacarídica que forma a região intermediária e externamente, encontra-se o antígeno O, que consiste em grupos de polissacarídeos altamente variáveis. Este último é considerado o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias Gram-negativas (FAINE et al., 1999).

Estes patógenos são aeróbios estritos, crescem em temperaturas entre 28 °C e 30 °C (QUINN et al., 1994) e são exigentes no que se refere a meios nutritivos (HANSON; TRIPATY, 1988), com divisão celular em torno de 7 a 12 horas. Uma cultura em meio líquido atinge a fase estacionária de crescimento em média entre 5 a 10 dias. (FAINE et al., 1999). Podem ser visualizados em microscópio de campo escuro ou contraste de fase (FAINE et al., 1999) e apresentam afinidade tintorial por corantes à base de sais de prata, o que possibilita o emprego das técnicas de coloração de Fontana-Tribondeau para esfregaços e a de Levaditi em cortes de tecidos (SANTA ROSA, 1970), além do método de Warthin-Starry (WARTHIN; CHRONISTER, 1920). As leptospiros sobrevivem na água conforme a temperatura, o pH, a salinidade e ao grau de poluição (LEVETT, 2001), mas são pouco resistentes à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos (FAINE et al., 1999).

A leptospirose pode ser transmitida aos animais de forma direta e indireta. A via de transmissão direta ocorre quando fluidos (sangue /urina) contendo leptospiros passam de um animal infectado a outro susceptível, destacando-se as vias transplacentária e hematogênica, genital (monta natural e inseminação artificial) e o ato de mamar. A transmissão indireta ocorre quando o animal adquire leptospirose do ambiente contaminado com leptospiros originárias da urina de animais infectados, doentes ou convalescentes. Animais transitórios em um ambiente contaminado podem carrear infecção para outros ambientes ou animais distantes do original (CÔRTEZ, 1993).

Em teoria, qualquer sorovar de *Leptospira* spp. pode infectar qualquer espécie animal, porém na prática um número limitado de sorovares é endêmico em uma região ou país em particular. Neste caso, a infecção é determinada pelas espécies animais de contato, pelo(s) sorovar (es) existente (es) na propriedade ou região, pelas condições ambientais e climáticas, e ainda depende do manejo e das oportunidades de infecção direta ou indireta (GENOVEZ et

al., 2006a). Os sorovares Wolffi e Grippytyphosa podem estar presentes em alguns roedores silvestres e espécies marsupiais. Roedores sinantrópicos, suínos e cães são, respectivamente, considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona e Canicola (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999; RADOSTITS et al., 2000).

As leptospirosas se mantêm circulando na população de hospedeiros primários, usualmente roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinantrópicos e/ou domésticos. Estes são os hospedeiros secundários, que ao invadir o ambiente silvestre entram em contato com espécies silvestres. O ser humano é considerado um hospedeiro acidental, que se infecta quando em contato direto ou indireto com os animais.

A doença tem forte associação com a atividade profissional. O trabalho diário em terrenos alagadiços frequentados por populações de roedores é um fator importante na transmissão da doença para colhedores de arroz e cana de açúcar (CÔRTEZ, 1993). Em alguns países, a leptospirose é considerada doença ocupacional para magarefes, fazendeiros e veterinários (FAINE et al., 1999).

A concentração de grandes efetivos de animais domésticos, como os rebanhos bovinos, pode ter como consequência à criação de amplas cadeias infecciosas, que contribuem para a disseminação do agente no ambiente e atuam como fator de risco para o homem (CÔRTEZ, 1993). Dentre os animais domésticos que podem atuar como portadores da doença, disseminando o organismo no ambiente, destacam-se os bovinos, suínos, caprinos, ovinos, equinos e em especial os caninos, que mantêm um convívio muito próximo ao homem. Entre as espécies silvestres destacam-se carnívoros, roedores e marsupiais (CORREA et al., 1982).

Os roedores das espécies *Mus musculus* (camundongo), *Rattus* (rato de telhado) e principalmente o *Rattus norvegicus* (rato de esgoto) estão envolvidos na epidemiologia da leptospirose por eliminarem leptospirosas pela urina por períodos prolongados, sendo o principal reservatório da doença em áreas urbanas (LEVETT, 2001).

As portas de entrada para a leptospirose invadir o organismo do hospedeiro são a pele íntegra ou com abrasões e membranas mucosas conjuntiva, oral, nasofaríngea e genital. Após a entrada, as leptospirosas patogênicas alcançam a corrente sanguínea (leptospirose) e as vias linfáticas, chegando aos pulmões, baço, rins e fígado, onde se multiplicam dando origem ao estágio febril. Nestes órgãos, ocorrem lesões nas membranas das células endoteliais de pequenos vasos, levando ao extravasamento sanguíneo, cuja consequência imediata é a perda das junções entre as células, permitindo que as leptospirosas e fluido migrem para o espaço

extravascular, ocasionando a desestruturação tecidual pela desintegração e morte celular (CASTRO, 2006).

A habilidade em sobreviver e multiplicar-se no hospedeiro é o maior componente de virulência deste grupo de bactéria, contudo a ação dos mecanismos imunes adquiridos pode impedir o estabelecimento da doença. (FAINE, 1982, 1999). Na primo infecção, o período de incubação é de 7 a 14 dias, quando ocorre a septicemia e o aparecimento de imunoglobulinas da classe IgM, que têm atividade de poucos dias, posteriormente acontece a produção anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos ajudarem a combater a bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995).

A leptospirose é caracterizada pelo desenvolvimento de vasculites, dano endotelial e infiltração de células inflamatórias. Nos órgãos, o surgimento de petéquias é comum e pode ser extenso (LEVETT, 2001). A isquemia renal evolui para necrose dos túbulos contorcidos renais. Nas formas mais graves, ocorre nefrite intersticial aguda, contudo, lesões glomerulares são menos presentes. A degeneração pode evoluir para a falência renal e anúria. Lesões também são observadas em pulmões, fígado, cérebro, placenta e coração, onde estas levam a sinais clínicos de hemorragia pulmonar, falência hepática e icterícia, encefalopatia e meningite, miocardites, morte fetal e abortamento (FAINE et al., 1999).

Nos animais que sobrevivem à infecção aguda, as leptospirosas persistem em sítios imunologicamente protegidos, como os túbulos proximais, a câmara anterior do olho e trato genital. Nos rins, multiplicam-se ativamente, atingindo o pico máximo em 3 a 4 semanas, sendo eliminadas pela urina. Contudo, há animais portadores que podem manter-se negativos sorologicamente, mas eliminando leptospirosas para o meio ambiente constituindo-se em fonte de infecção importante. Fetos podem nascer portadores renais e eliminadores de leptospirosas (FAINE, 1982, 1994; FAINE et al., 1999). A persistência e a intensidade da leptospirose variam com o hospedeiro e o sorovar infectante (GONÇALVES, 1995).

A apresentação clínica da leptospirose pode cursar como um processo brando e inaparente, até como forma grave, com sintomas graves que chegam a óbito (LEVETT, 2001). A presença de falência renal aguda, pancreatite, meningite, trombocitopenia e sintomas pulmonares são comuns em humanos.

Nos equinos, o sinal clínico mais comum é a uveíte recorrente, que pode ser considerada uma doença autoimune (PARMA et al., 1987; DAHER et al., 2003).

Nos cães, a leptospirose ocorre principalmente pelos sorovares *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni* e *Canicola*, cujo curso pode variar de subclínico, agudo ou crônico. As manifestações clínicas podem incluir ou não a icterícia, dependendo do sorovar infectante. Na

forma aguda, pode ocorrer à morte do animal por insuficiência renal e hepática e aqueles que sobrevivem à infecção tornam-se portadores e eliminadores de leptospiros pela urina de forma assintomática, disseminando a doença para outros cães, outras espécies animais e o homem (FAINE et al., 1999).

Nos ovinos e caprinos, os sintomas são principalmente reprodutivos, semelhantes aos bovinos. Na infecção aguda, ocorre anorexia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, icterícia, urina de cor vermelha escura e febre. Há certa evidência que também os ovinos sejam hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo. Segundo Fernandes (2009), a infecção pelo sorovar Hardjo, nesta espécie, está diretamente envolvida com o pastejo consorciado com bovinos, independentemente da existência de outros fatores de risco. Entretanto, no Brasil, os sorovares mais frequentemente observados no sorodiagnóstico nos ovinos são *Icterohaemorrhagiae* e *Hebdomadis*. Na espécie caprina, também o sorovar *Icterohaemorrhagiae* é mais detectado, seguido de *Castellonis* e *Grippotyphosa* (FAINE et al., 1999).

Em bovinos e suínos, o quadro reprodutivo inclui abortamentos, retorno ao cio e infertilidade. A doença leva a perdas na produção de leite decorrentes do aumento do intervalo de partos (FAINE et al., 1999; KAZAMI et al., 2002; BOQVIST et al., 2003). Em bovinos jovens, os sinais clínicos da leptospirose são hemoglobinúria, icterícia, anorexia e uremia. Em vacas prenhes, na maioria das vezes, o único sintoma relaciona-se a esfera reprodutiva, onde ocorre morte fetal com abortamento e infertilidade. No entanto, com o decorrer do tempo, a imunidade se restabelece e abortamentos podem ocorrer somente em novilhas de primeira cria. Natimortos, nascimento de bezerros fracos e com baixo peso que podem não sobreviver também são observados (AMATREDJO; CAMPBELL; PATH, 1975; HANSON, 1977). Achados de leptospiros em rins de fetos apontam que estes animais não sobreviveriam após o nascimento, ou não chegariam a termo para o nascimento (ELLIS et al., 1984).

Os bovinos são infectados, normalmente, pelos sorovares Hardjo, Pomona, *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae*. O sorovar Hardjo tem sido considerado o mais adaptado à espécie bovina e o mais evidenciado em todo o mundo, demonstrando diferentes aspectos de patogenicidade (ELLIS, 1984). A infecção causada por este sorovar é apontada em vários países como causa de infertilidade e falhas reprodutivas.

Em alguns países, a infecção nos bovinos por este sorovar apresenta sinais de infertilidade, abortamentos, natimortos, nascimento de animais prematuros, bezerros fracos ou aparentemente normais, mas infectados e portadores renais. Infertilidade pelo sorovar Hardjo

está geralmente associada à infecção ovariana e uterina, originando aumento do intervalo entre parto-concepção e entre partos, em consequência da morte embrionária (DHALIWAL et al., 1996a,b). Em gado leiteiro, a síndrome mais comum associada à leptospirose aguda é a síndrome da queda do leite, ocasionada pelo sorovar Hardjo, ocorrendo diminuição na produção de leite que dura de 2 a 10 dias, caracterizando-se pelo aparecimento de mastite flácida com agalaxia, com pequena quantidade de sangue no leite, o qual adquire aspecto de colostro, amarelado, com grumos grosseiros e elevada contagem de células somáticas. (FAINE et al., 1999). Uma vez introduzido em um rebanho, este sorovar estabelece níveis variáveis de infecção, podendo persistir por longos períodos (HATHAWAY; BLACKMORE; MARSHALL, 1981). Os bovinos são hospedeiros de manutenção para o sorovar Hardjo, uma vez que são portadores renais adaptados (FERNANDES, 2009).

Dois genótipos do sorovar Hardjo são encontrados nos ruminantes – Hardjobovis e Hardjoprajitno. Hardjobovis ocorre com maior frequência em Nova Zelândia, Austrália e Holanda (FAINE et al., 1999), sendo eliminado em maiores quantidades pela urina, enquanto Hardjoprajitno tem sido relatado no Reino Unido, Nigéria, Índia, Malásia, Brasil, México e nos Estados Unidos (AGUIAR, 2004).

A presença do sorovar Hardjo é endêmica nos países de clima tropical e subtropical (ELLIS, 1984). Em países como Austrália, Nova Zelândia e Holanda, apesar de endêmico, o sorovar Hardjo não causa significantes perdas em rebanhos bovinos (SLEE; McORIST; SKILLBECK, 1983; FAINE et al., 1999). No Brasil, constitui-se em infecção endêmica, cujo impacto sobre as taxas reprodutivas, ainda necessita de maiores estudos principalmente em rebanhos leiteiros (GENOVEZ et al., 2006b). Apesar da elevada soroprevalência desse sorovar nos rebanhos bovinos brasileiros, apenas dois relatos de isolamentos são descritos na literatura, e nestas a tipificação das estirpes não está esclarecida. Moreira (1994) isolou de rebanhos bovinos leiteiros o genótipo Hardjoprajitno (amostra Norma) e Langoni (1999) a partir de fetos bovinos, identificados por antissoros específicos para este sorovar.

Diante destas questões, o isolamento e identificação dos sorovares circulantes nos rebanhos nacionais são necessários para a determinação de seus genótipos, com intuito não somente de avaliar sua adaptação e interação com as condições ambientais do Brasil, mas, sobretudo definir quais estirpes tem impacto na eficiência reprodutiva e decidir a incorporação destes nas vacinas nacionais (GENOVEZ et al., 2006a).

O controle da leptospirose é necessário para prevenir a doença clínica, as perdas econômicas e minimizar o risco de infecção humana. Uma das formas de controle depende da diminuição da prevalência da infecção com sorovares mantidos na população e na diminuição

do grau de associação ecológica das leptospiros mantidas por animais de vida livre (HATHAWAY; BLACKMORE; MARSHALL, 1981).

O objetivo principal do tratamento é o controle da doença e a interrupção da leptospiúria nos animais acometidos. A diidroestreptomicina ou outras tetraciclinas são recomendáveis na dose de 25mg/Kg por um dia, durante três ou cinco dias (RADOSTITS et al., 2000). Como medida preventiva da leptospirose, deve-se vacinar o rebanho e, frente ao diagnóstico, usar a antibioticoterapia para eliminar os portadores. Como a proteção é sorovar-específica, é importante vacinar contra os sorovares prevalentes no rebanho ou na região da criação (ELLIS, 1984).

Além da vacinação e do uso de estreptomicina nos animais, deve-se ainda aplicar estratégias que visem à redução ou eliminação dos fatores de risco. Medidas de prevenção consistem em eliminar o contato de animais sadios com os portadores de leptospiros, da mesma espécie ou espécie diferente, população de roedores e o acesso a águas de superfície onde coabitam animais silvestres.

As vacinas comerciais existentes consistem em preparações de culturas de leptospiros de diferentes sorovares inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas) (HANSON, 1977; LANGONI, 1999). Muitas destas disponíveis no mercado nacional são compostas por cinco a dez sorovares, que atendem as soroprevalências da maioria das regiões do país e sua eficácia é aumentada com a adição de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (HANSON, 1977). Em condições de campo, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção e diminui o impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974). Entretanto, as bacterinas promovem proteção somente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

O diagnóstico de leptospirose se baseia em exames laboratoriais diretos, que detectam o agente etiológico, e os indiretos, pela detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro (GENOVEZ, 2006a). Reações antígeno-anticorpo são usadas na identificação de estirpes (ou sorovares) de leptospiros no diagnóstico de infecções recentes e na investigação de anticorpos residuais resultantes de infecções passadas nos indivíduos (TURNER, 1970).

A soraglutinação microscópica (SAM) é o teste padrão de referência para diagnóstico sorológico e para classificação de leptospiros em sorovares e sorogrupos como preconiza a Organização Mundial de Saúde. Recomenda-se a realização do teste com os antígenos vivos cuja densidade ideal de crescimento é atingida em culturas de 4 a 14 dias (WHO, 1967) e contendo os sorovares representativos de cada um dos sorogrupos, além de outros de

importância regional (VASCONCELLOS, 1979). Os inconvenientes para este teste são a necessidade de uma infraestrutura laboratorial e a manutenção de repiques das culturas vivas, o que gera a necessidade de mão-de-obra técnica, além de submeter o operador a riscos de contaminação (VASCONCELLOS, 1979; GENOVEZ; YASUDA, 1988).

Outro ponto importante é que embora a SAM consiga estabelecer certo grau de especificidade sorogrupo/sorovar envolvido, apresenta como desvantagem ser pouco sensível quando considerado o tempo e a elevada concentração de anticorpos necessários para a emissão do sinal. Além disto, em alguns casos não é discriminatória de infecção pregressa, ativa ou reação vacinal (FAINE et al., 1999; KEE et al., 1994). Portanto, a sorologia não reflete necessariamente o estado de portador ou eliminador de leptospiras (VAN EYS et al., 1989).

Outros ensaios têm sido aplicados como métodos alternativos de triagem soroepidemiológica para a leptospirose, como o ELISA que apresenta como vantagens a segurança, por não utilizar bactérias vivas, a alta sensibilidade, a facilidade de execução, rapidez e o baixo custo (CHAMPAGNE et al., 1991). Neste teste, são utilizados lisado total obtidos a partir de culturas bacterianas, adsorvidos em placa, cujas contaminações presentes nas preparações destas culturas, são responsáveis pela reatividade cruzada, muitas vezes, observada. Diversos ensaios imunoenzimáticos são considerados mais sensíveis que o MAT. As diferenças no desempenho destes testes se referem à sua composição, particularmente variações na preparação do antígeno (SMITH et al., 1994). Apesar da maior sensibilidade do ELISA, que eleva sua habilidade em detectar infecções recentes e o fato de que antígenos vivos não são necessitados para este teste, o ELISA possui baixa especificidade quando comparado com o SAM (SMITH et al., 1994; LEVETT, 2001). Além disso, o teste ELISA é normalmente gênero-específico, não sendo hábil para detectar o sorotipo infectante, limitando assim sua utilização para estudos epidemiológicos.

O isolamento bacteriano é o diagnóstico definitivo da doença, embora apresente baixa sensibilidade, necessitando de amostras de sangue, urina ou liquor recém-colhidas que devem ser observadas em cultura por um período mínimo de 30 dias (GENOVEZ et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004). Este método de diagnóstico apesar de suas dificuldades, sua baixa sensibilidade e ser dependente da viabilidade das leptospiras é importante para o conhecimento da doença. Permite conhecer a epidemiologia da enfermidade e possíveis mudanças do perfil de infecção numa espécie animal ou habitat ao longo dos anos.

Em vista da necessidade de suprir as falhas diagnósticas de isolamento e do diagnóstico sorológico pela SAM ou ELISA vem sendo empregados métodos com maior

sensibilidade, especificidade e rapidez (MAGAJEVSKI, 2002), como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que permite amplificar sequências específicas a partir de quantidades mínimas de DNA do microrganismo em diversos tipos de amostras biológicas, tais como soro, líquido cérebro-espinhal, urina, fezes e tecidos (BAL et al., 1994; SCARCELLI et al., 2004). Além disso, a PCR possibilita a identificação de leptospiras em materiais de difícil isolamento, tais como fetos abortados (SCARCELLI et al., 2004) e sêmen nas centrais de inseminação artificial (GOTTI, 2007). Porém, a mais importante limitação desta técnica como método diagnóstico gênero específico é a impossibilidade de identificar a estirpe infectante e relacioná-las aos dados epidemiológicos.

O ensaio do tipo *dipstick*, empregando antígenos preparados a partir de culturas de *L. biflexa* inativadas pela ação do calor, também já foram estudados e são comercialmente disponíveis. Neste caso, a detecção é feita utilizando-se anti-IgM conjugado com corante coloidal. A fita é colocada em contato com a amostra de soro e quando existem anticorpos da classe IgM os mesmos se ligam aos antígenos da fita e são detectados pela ligação do conjugado marcado (SMITS et al., 2000). Este método apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis com os obtidos para o ELISA IgM com a vantagem de ser de execução simples e rápida e utiliza pequeno volume de amostra. Entretanto, como é utilizado o lisado total de leptospira também é observada reatividade cruzada, o que pode resultar em resultados falso-negativos (GUSSENHOVEN et al., 1997; SMITS et al., 1999).

Recentemente, testes imunocromatográficos que empregam o uso de proteínas recombinantes vêm sendo estudados como novos métodos diagnósticos para a leptospirose e outras enfermidades. A detecção de anticorpos, através de teste imunocromatográfico, para outros patógenos também vem sendo amplamente aplicados, como para as doenças causadas por *Anaplasma marginale* (NILSEN et al., 2007); *Yersinia pestis* (RAJERISON et al., 2009); *Neisseria meningitidis* (ROSE et al., 2010); *Theileria annulata* (ABDO et al., 2010); *Treponema pallidum* (LIN et al., 2010); *Salmonella typhi* (PREECHAKASEDKIT; PINWATTANA; DUNGCHAI, 2011); vírus da peste suína clássica (LI et al., 2012); circovírus suíno 2 (JIN et al., 2012); entre outras. Alvarez et al. (2010) realizaram um teste imunocromatográfico para o diagnóstico de anemia infecciosa equina com a proteína recombinante p26 proteína do capsídio, apresentando sensibilidade de 98,3% e especificidade de 87,4% quando comparado a imunodifusão em gel de agarose. Wang et al. (2011) realizaram o teste imunocromatográfico para o diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa* com a proteína recombinante OprF e obteve uma sensibilidade de 84,8% quando comparou com PCR multiplex.

Um teste rápido em látex (LAT) com antígeno recombinante (LipL32) foi utilizado realizados em soros de cães e humanos, para o diagnóstico da leptospirose (DEY et al., 2007). Nability et al. (2012) desenvolveram um teste DDP (*Dual Path Platform*) utilizando a proteína recombinante pertencente a uma família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos para o diagnóstico de leptospirose em humanos. Ambos os teste apresentaram boa especificidade e sensibilidade, porém o aprimoramento do teste na detecção na fase aguda da doença se faz necessário, principalmente focando na melhoria da sensibilidade do teste.

Outros ensaios como o que detecta a presença de leptospiras na urina utilizando nano partículas de ouro (CHIRATHAWORN et al., 2011; WIDIYANTI et al., 2013) e o desenvolvimento de PCR de imunocaptura (IC- PCR) utilizando anticorpos policlonais e monoclonais para diferentes sorovares e sorogrupos de *Leptospira* têm sido descritos (BALASSIANO; VITAL-BRAZIL; PEREIRA, 2012). Goarant et al. (2013) desenvolveram um teste rápido de fluxo lateral vertical para detecção de IgM em humanos. Obtiveram valores bons em relação à sensibilidade (89,8%) e à especificidade (93,7%) do teste. Porém, foi utilizado lisado total de *Leptospira faine*, podendo apresentar reações cruzadas.

A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeira criada para o estudo das proteínas séricas. Também conhecida como teste imunocromatográfico (TIC), ensaio de fluxo lateral, *dipstick* ou ensaio de fita, a técnica utiliza as propriedades da reação antígeno-anticorpo para a rápida detecção do analito (JIN et al., 2005).

O teste imunocromatográfico (TIC) se tornou amplamente utilizado no diagnóstico e na triagem de diversas patologias como diabetes, doenças cardíacas e renais, nas e doenças infecciosas como: dengue, malária, amebíase, peste bubônica, brucelose, giardíase, leishmaniose visceral, hepatite B, infecção por HIV, cinomose, parvovirose, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, entre outras. Este método possui como principais características a de ser de baixo custo, simples e ser realizado em um curto período de tempo, entre 15 a 30 minutos (LIN et al., 2010). Esta técnica permite identificar doenças com mais rapidez aumentando as chances de recuperação dos pacientes.

Considerando as facilidades descritas, os testes imunocromatográficos têm sido muito aplicados no diagnóstico em domicílio, no campo ou em regiões com poucos recursos. Seu emprego inclui diferentes moléculas alvo, como: antígenos, anticorpos, hormônios, citocinas, receptores de células, haptenos, resíduos de drogas, ácidos nucleicos, oligonucleotídeos e marcadores sanguíneos (ZHANG; GUO; WANG, 2009), podendo se utilizados pelas áreas

médica, veterinária e sanitária (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Os modelos dos imunoenaios do teste imunocromatográfico existentes são do tipo sanduíche, inibição ou competição. A técnica do teste imunocromatográfico, é uma metodologia de detecção baseada na utilização de tiras de um material de suporte impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. O sistema é realizado em uma matriz constituída de membrana de nitrocelulose ou de náilon coberta por acetato transparente para facilitar a visualização do teste.

Os componentes do teste são: anticorpos ou antígeno de detecção que são marcados com um gerador de sinal, normalmente esferas de látex ou ouro coloidal, e outro anticorpo ou antígeno, que é denominado partícula de captura, ambos são imobilizados sobre superfície sólida. Os anticorpos ou antígenos de detecção, conjugados com ouro, são colocados em um estado desidratado na membrana de fibra de vidro de modo que são dissolvidos quando em contato com o meio aquoso contendo o analito (MILLIPORE, 2008). Em seguida, forma-se o complexo analito-conjugado, no qual este migra por capilaridade do meio até ser capturado pelo anticorpo ou antígeno previamente imobilizado sobre a superfície da membrana de nitrocelulose na linha teste (SHYU et al., 2002; MURRAY et al., 2008). Um anticorpo adicional específico para o anticorpo de detecção pode ser utilizado para produzir um sinal na linha controle. A fibra de celulose possui a atribuição de aumentar o volume da amostra que entra na tira do teste. Sua função é absorver tanto os reagentes de revelação quanto a amostra que migraram pelos poros das membranas, garantindo uma absorção contínua dos componentes do sistema na plataforma (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Nos testes imunocromatográficos os marcados mais utilizados para preparação do conjugado são o látex e o ouro coloidal. As partículas de ouro são menores que as de látex, e mais comumente usadas nestes testes (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Outros conjugados de enzimas, metais coloidais, partículas fluorescentes e partículas magnéticas também são usadas (MILLIPORE, 2008).

O resultado do teste imunocromatográfico é considerado positivo quando duas linhas são visíveis, sendo uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T). A intensidade de cor da linha teste (T) poderá variar de acordo com a concentração presente na amostra. Todavia, qualquer intensidade de cor na linha teste indica resultado positivo. No resultado negativo apenas uma linha é visível na região controle (C), não sendo observada linha na

região teste. O teste é considerado inválido quando não é evidenciada a linha controle (C). As razões mais comuns de falha são o volume insuficiente de amostra ou falha no procedimento técnico. Neste caso, rever a técnica e repetir o teste com uma nova tira.

Recentemente, foram sequenciados oito genomas de *Leptospira* spp, sendo de dois sorovares de *L. interrogans* (Lai e Copenhageni) (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a,b), de duas estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis (L550 e JB197) (BULACH et al., 2006); de duas estirpes da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc I (Paris e Ames) (PICARDEAU et al., 2008); de duas estirpes de *L. licerasiae* sorovar Varillal (VAR010 e MMD0835) (RICALDI et al., 2012). As análises computacionais destas sequências têm contribuído para a identificação de genes que codificam proteínas possivelmente envolvidas na patogênese da doença, na virulência e na interação patógeno-hospedeiro. Estes estudos são de grande importância na busca de proteínas para serem utilizadas no desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos mais eficientes.

A proposta deste trabalho é utilizar proteínas recombinantes de *Leptospira* spp. como antígenos no desenvolvimento de um teste rápido baseado em ensaio imunocromatográfico do tipo *dipstick*, como possível método diagnóstico da leptospirose animal. Métodos sorológicos utilizando proteínas recombinantes como antígenos podem possibilitar sensibilidade e especificidade maiores devido à maior concentração de antígenos imunoreativos e à ausência de sítios inespecíficos. Tomich et al. (2009) observou em bovinos uma alta sensibilidade e especificidade apresentada pelo Teste IgG ELISA utilizando a lipoproteína de membrana externa LipL32 em sua forma recombinante. Os resultados obtidos sugerem a aplicação deste teste em investigações soropidemiológicas de leptospirose bovina, para triagem de animais positivos, conferindo mais rapidez e praticidade aos procedimentos laboratoriais.

As proteínas escolhidas para este trabalho (Quadro 1) são prováveis lipoproteínas de membrana externa e foram identificadas utilizando ferramentas de bioinformática em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo (BARBOSA et al., 2010).

As lipoproteínas bacterianas são um grupo importante de proteínas de membrana que possuem a cisteína amino-terminal covalentemente ligada a ácidos graxos. São sintetizadas com um peptídeo sinal, clivado por uma peptidase sinal antes da ligação covalente aos ácidos graxos. Em *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 foram identificadas 136 prováveis lipoproteínas (NASCIMENTO et al., 2004a; SETUBAL et al., 2006). Esta diversidade sugere que muitas funções celulares podem ser dependentes destas proteínas, como formação e estabilização da parede celular, transporte de substratos, interação bacté-

hospedeiro e virulência, como já descrito para outras bactérias (BABU; SANKARAN, 2002; SUTCLIFFE; HARRINGTON, 2004).

As lipoproteínas Lp25, Lp11, Lp22, Lp35 e LipL32 (Quadro 1) são hipotéticas e ainda não foram identificadas em nenhum outro organismo e as proteínas Lp21, Lsa30, LcpA, LigA e LigB já possuem funções descritas (BARBOSA et al., 2010).

Resultados obtidos com a Lp21 mostraram que esta proteína é expressa nas células dos túbulos renais de animais infectados, está localizada na membrana externa da bactéria e também é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e E-selectina) em células endoteliais (HUVECS) (VIEIRA et al., 2007).

Estudos descreveram a capacidade da proteína Lsa30 em aderir a componente de matriz extracelular como fibronectina plasmática e laminina, atuando como receptora de plasminogênio e podendo ocasionar a atividade proteolítica através da produção de plasmina. Além disso, esta proteína interfere na cascata de complemento através da interação com o regulador de C4BP (SOUZA et al., 2012). As moléculas de adesão são proteínas localizadas na superfície de células eucarióticas e estão envolvidas nas interações celulares ou com a matriz extracelular. Muitas bactérias, como a leptospira, invadem os tecidos do hospedeiro através da habilidade de se ligarem às moléculas de adesão.

A proteína codificada pelo gene LIC11947 (Quadro 1) foi caracterizada, por nosso grupo, como a primeira proteína de leptospira capaz de interagir com a proteína reguladora de complemento C4BP (BARBOSA et al., 2010). Devido a esta função, esta proteína foi nomeada de LcpA, para *Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*. É conservada em diferentes espécies de leptospiros patogênicos e está ausente nas espécies saprófitas. A habilidade de escapar aos mecanismos de defesa imune, dentre os quais os sistemas fagocítico e complemento, parecem constituir uma estratégia essencial para que as leptospiros patogênicos sobrevivam e consigam invadir os tecidos do hospedeiro (BARBOSA et al., 2010).

As Lig (Leptospiral immunoglobulin-like) são pertencentes à família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos. Três genes lig (*ligA*, *ligB* e *ligC*) já foram descritos e só estão presentes em espécies patogênicas. O gene *ligB* é encontrado em várias espécies de leptospiros enquanto *ligA* é restrito às espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e *ligC* é um pseudogene (PALANIAPPAN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2004; CERQUEIRA et al., 2009). As proteínas LigA e LigB estão localizadas na membrana externa da bactéria e participam dos processos de adesão das leptospiros às células do tecido do hospedeiro. Possuem as regiões

amino-terminais idênticas, que correspondem a seis domínios Big repetidos, seguidas por uma região variável de aproximadamente sete domínios Big repetidos. LigB apresenta ainda uma região carboxi-terminal sem domínios Big repetidos (MATSUNAGA et al., 2003). Estas proteínas se ligam a uma variedade de componentes da matriz extracelular mediando a adesão das bactérias a células hospedeiras. Além disso, interagem com reguladores negativos do sistema complemento humano ajudando no processo para o processo de evasão ao sistema imune inato (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

A LipL32 é a mais abundante proteína de membrana externa de espécies patogênicas de *Leptospiras*, tem sido considerada um promissor candidato à antígeno vacinal embora seja capaz de induzir somente imunidade protetora parcial em hamsters desafiados com inóculo letal de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000). Além disso, a resposta imunológica do hospedeiro à LipL32 é bastante intensa (NABITY et al., 2012). Essas características sugerem que a LipL32 seja adequada ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico para a leptospirose (HAAKE et al., 2000). A lipoproteína recombinante LipL32 tem sido utilizada em ELISAs para diagnóstico de leptospirose humana (FLANNERY et al., 2001), canina (DEY et al., 2004) e bovina (BOMFIM; KO; KOURY, 2005; TOMICH et al., 2009).

Quadro 1- Proteínas recombinantes utilizadas neste estudo

<i>Nomenclatura do Genoma^a</i>	<i>Nomenclatura da proteína</i>	<i>Anotação do Genoma</i>
LIC10009	Lp25	Provável lipoproteína
LIC10301	Lp11	Provável lipoproteína
LIC10507	Lp21	Provável lipoproteína
LIC10704	Lp22	Provável lipoproteína
LIC11030	Lp35	Provável lipoproteína
LIC11087	Lsa30	Provável lipoproteína
LIC11947	LcpA	Provável lipoproteína
LIC10465	LigAC porção C-terminal	Lipoproteína com domínios IgG-like
LIC10464	LigBN porção N-terminal	Lipoproteína com domínios IgG-like
LIC10464	LigBC porção C-terminal	Lipoproteína com domínios IgG-like
LIC11352	LipL32	Lipoproteína

Quadro 2 - Resumo dos resultados obtidos neste trabalho

	TIPO I	TIPO II	TIPO III	Detecção de antígeno
Conjugado	Ouro coloidal + LipL32	Ouro coloidal + LipL32	Ouro coloidal + Prot. A	Ouro coloidal + Anti-LipL32
Linha teste	Anti-IgG (espécie animal)	LipL32	LipL32	Anti-LipL32
Linha controle	Anti-LipL32	Anti-LipL32	Anti-IgG coelho	Anti-IgG coelho
Tratamento da fibra de vidro	Não	Não	Não	Não
Tratamento sample pad	Sim	Sim	Sim	Sim
Tamanho da Fita hiflow	HF 240	HF 240	HF 240	HF 240
Linha teste dialisada com 5 % de sacarose	Sim	X	Sim	X
Secagem em dessecador a vácuo	Sim	X	Sim	X
Período de secagem	<i>Overnight</i>	X	<i>Overnight</i>	X
Diluição do soro teste	1:10	X	1:10	X
Tampões escolhidos (1,2,3 , 4 e PBS)	1	X	1	X
Amostras de soro que reagiram	Coelho e bovino	X	Coelho, bovino, equino e cão	X
Teste realizado em plataforma diagnóstica	Sim	Não	Sim	Não
Amostras que reagiram na plataforma	Nenhuma	X	Coelho	X

2 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste manuscrito estão resumidos no quadro 6 e demonstraram que:

- A proteína recombinante LipL32 foi a proteína que mostrou maior reatividade com os soros de animais (bovino, hamster, coelho, cão e equino) reagentes para leptospirose nos ensaios de *Western blotting* e ELISA. Estes resultados indicam que esta proteína é a mais adequada para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico dentre as proteínas recombinantes testadas.
- O teste imunocromatográfico no modelo tipo I, onde o ouro coloidal de 20 nm foi conjugado com a LipL32, utilizando o anticorpo da linha teste dialisado e com 5% sacarose mostrou-se satisfatório utilizando soros hiperimunes de coelho e soros bovinos.
- O teste imunocromatográfico no modelo para detecção de antígeno, onde o ouro coloidal de 20 nm foi conjugado com o anti-LipL32, mostrou-se satisfatório utilizando a urina infectada com leptospira.
- O teste imunocromatográfico no modelo Tipo III, onde o ouro coloidal de 20 nm foi conjugado com a proteína A, utilizando a LipL32 na linha teste dialisada e com 5% sacarose mostrou-se satisfatório utilizando soros de bovinos, equinos, cães, coelhos. Mostrou ser possível de utilização em diversas amostras de soros animais, tendo uma configuração universal do teste.
- O ouro coloidal produzido *in house* mostrou ser adequado no teste imunocromatográfico através da análise por microscopia eletrônica de transmissão.
- Não foi possível detectar anticorpos específicos para leptospirose em soros de bovinos, utilizando o teste imunocromatográfico, com a configuração do tipo I, em plataforma diagnóstica. Provavelmente, devido à necessidade de padronização de todos os parâmetros.
- Não foi possível detectar anticorpos específicos para leptospirose em soros de bovinos, equinos, cães e hamster, utilizando o teste imunocromatográfico, com a configuração do tipo

III, em plataforma diagnóstica. Provavelmente, devido à necessidade de padronização de todos os parâmetros.

- Foi possível detectar anticorpos específicos para leptospirose em soros hiperimunes de coelho, utilizando o teste imunocromatográfico do tipo III, em plataforma diagnóstica.
- Estes resultados preliminares demonstram que o teste imunocromatográfico do tipo *dipstick*, tanto para detecção de antígeno quanto anticorpo, com a proteína recombinante LipL32 como antígeno ou com anticorpo anti-LipL32, pode ser uma promissora técnica diagnóstica contra a leptospirose.

REFERÊNCIAS

- ABDO J.; KRISTERSSON, T.; SEITZER, U.; RENNEKER, S.; MERZA, M.; AHMED J. Development and laboratory evaluation of a lateral flow device (LFD) for the serodiagnosis of *Theileria annulata* infection. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1241–1248, 2010. DOI 10.1007/s00436-010-1994-8. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-010-1994-8>>. Acesso em: 9 maio 2011.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Veterinary Microbioly**, v. 140, p. 287-296, 2010.
- AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum, anti-Brucella abortus e anti- Leptospira spp. em bovinos da zona rural do Município de Monte Negro, Rondônia**: estudo de possíveis fatores de risco. 2004. 120 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Immunochromatographic lateral flow test for detection of antibodies to Equine infectious anemia virus. **Journal of Virological Methods**, v. 167, p. 152–157, 2010.
- AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 45, n. 12, p. 875-891, 1975.
- BABU, M. M.; SANKARAN, K. DOLOP- Database of bacterial lipoprotein. **Bioinformatics**, v. 18, p. 641-643, 2002.
- BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BALASSIANO, I. T.; VITAL-BRAZIL J. M.; PEREIRA M. M.; Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: A new tool for early diagnosis and epidemiology surveillance. **Diagn. Microbiology Infection Disease**, v. 74, p. 11-15, 2012.
- BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.
- BENDAYAN, M. A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 75, n. 5, p. 203-42, 2000.
- 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. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BISWAS, D.; ROY, S.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; NARARAJASEENIVASAN, K.; SEHGAL, S. C. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India. **Indian Journal Medical Research**, v. 121, p. 151-158, 2005.

BOMFIM, M. R. Q.; KO, A.; KOURY, M. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 89-94, 2005.

BOQVIST, S.; MONTGOMERY, J. M.; HURST, M.; THU, H. T. V.; OLSSON, E.; ENGVALL, E.; GUNNARSSON, A.; MAGNUSSON, U. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 361-368, 2003.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGER, F.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and servovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839-858, 1999.

BROWNLOW, T.; KAVANAGH, O. V.; LOGAN E. F.; HARTSKEERL, R. A.; SAVAGE R.; PALMER M. F.; KRAHL M.; MACKIE D. P.; ELLIS W. A. "Leptorapide" – a one-step assay for rapid diagnosis of human leptospirosis. **Epidemiology Infection**, v. 142, n. 6, p. 1182-1187, 2013.

BULACH, D. M.; ZUERNER; R. WILSON, P., SEEMAN, T.; McGrath A.; CULLEN, P.; DAVIS, J.; ALT, D. V.; ROOD, J.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BURNETTE, W. N. Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

CARNEY, J.; BRAVEN, H.; SEAL, J; AND WHITWORTH, E. present and future applications of gold in rapid assays. **IVD Technology**, v. 12, p. 41-49, 2006.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A. E.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC. L.; BARBOSA. A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins Interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal Infectious Diseases**, v. 205 p. 995-1004, 2012.

CASTRO, V. **Estudo da prevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil**. 2006, 104 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 760-768, 2009.

CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.; KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 105, p. 289-97, 2011.

CHAMPAGNE, M. J.; HIGGINS, R.; FAIRBROTHER, J. M.; DUBREUIL, D. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. **Canadian Journal of Veterinary Research**, n. 55, p. 239-245, 1991.

CHANDLER, J.; GURMIN, T.; ROBINSON, N. The place gold in rapid tests. **IVD Technology Magazine**, v. 6, n. 2, p. 37-49, 2000. IVDT Article Index.

CHIRATHAWORN, C.; CHANTARAMALAI, T.; SEREEMASPUN, A.; KONGTHONG, NSUWANCHAROEN, D. Detection of *Leptospira* in urine using anti-*Leptospira*-coated gold nanoparticles. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 34. n. 1, p. 31-34, 2011.

CHUANLAI, X.; HUTING, W.; CHIFANG, P.; ZHENGYU, J.; LIQIANG, L. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 12, p. 1390-94, 2006.

CORREA, M. O. A.; VERONESI, R.; BRITO, T.; HYAKUTAKE, S.; SANTA ROSA, C. A.; EDELWEISS, E. L. Leptospiroses. In: VERONESI, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 573-589.

CÔRTEZ, J. A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** 1993. p. 53-57.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection Immunity**, v. 76, p. 5826-33, 2008.

DAHER, E. F.; BRUNETTA, D. M.; SILVA JÚNIOR, G. B.; PUSTER, R. A.; PATROCINIO, R. M. S. V. Pancreatic involvement in fatal human leptospirosis: clinical and histological features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 307-313, 2003.

DEY, S.; MOHAN, C. M.; RAMADASS, P.; NACHIMUTHU, K. Recombinant Antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of Leptospirosis. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 9-15, 2007.

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.

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A. Effect of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 319-320, 1996a.

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 110-114, 1996b.

ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 411-421, 1984.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 171 p. (WHO off set publications, 67).

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 353, 1994.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999. p. 272.

FERNANDES, E. C. **Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo**: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos. 2009. [78 p.]. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n 9, p. 3303-3310, 2001.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. P.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GENOVEZ, M. E. **Leptospirose**: uma doença além da época das chuvas. 2007. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/leptospirose/index.htm. 2007>. Acesso em: 9 maio 2011.

GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C.; CASTRO, V.; GOTTI, T. B.; DIB, C. C.; POZZI, R. C.; ARCARO, J. R. P.; MIYASHIRO, C.; NASSAR, A. F. C.; CIRRILO, S. L. Leptospirosis outbreak in dairy cattle due to *Leptospira* spp. serovar Canicola: reproductive rates and serological profile after treatment with streptomycin sulfate. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 4, p.389-393, 2006b.

GENOVEZ, M. E.; YASUDA, P. H. Avaliação da eficiência de estirpes de *Leptospira biflexa* no diagnóstico de triagem da leptospirose animal. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 399-405, 1988.

GENOVEZ, M. E.; CASTRO, V.; GREGORY, L.; DEL FAVA, C.; FERRARI, C. I. L.; LANÇA NETO, P.; SOUZA, M. R.; GOTTI, T.; OLIVEIRA, J. C. F.; PITUCO, E. M. Effetive of *Leptospira* spp. Serovar Hardjo infection reproduction of two beef nelore herds with different serological status. In: WORLD BUIATRIC CONGRESS, 24., 2006, Nice, FR. Nice, 2006a.

GOARANT, C.; BOURHY, P.; D'ORTENZIO, E.; DARTEVELLE, S.; MAURON, C.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; CHANTEAU, S. Sensitivity and Specificity of a New Vertical Flow Rapid Diagnostic Test for the Serodiagnosis of Human Leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 6, p. e2289, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002289. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002289>>. Acesso em: 9 maio 2011.

GONÇALVES, C. A. **Zoonoses**. São Paulo: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. CATI, 1995. p. 121.

GOTTI, T. B. **Avaliação de três protocolos de associações antibióticas na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajtino e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 35, p. 92-97, 1997.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infection Immunity**, v. 70, p. 4936-45, 2002.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infection Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HANSON, L. E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1977.

HANSON, M. A.; TRIPATHY, D. N. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1988. p. 237.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

HATHAWAY, S. C.; BLACKMORE, D. K.; MARSHALL, R. B. Leptospirosis in free-being species in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, p. 189-196, 1981.

HAUK, P.; GUZZO, C. R.; RAMOS, H. R.; HO, P. L.; FARAH, C. S. Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. **Journal Molecular Biology**, v. 24, p. 722–36, 2009.

HUANG, S. H.; Gold nanoparticle-based immunochromatographic test for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. **Clinica Chimica Acta**, v. 373, p. 139-143, 2006.

JIN, Q.; YANG, J.; LU, Q.; GUO J.; DENG, R.; QANG, Y.; WANG, S.; WANG, S.; CHEN, W.; ZHI, Y.; WANG, L.; YANG, S.; ZHANG, G. Development of an immunochromatographic strip for the detection of antibodies against Porcine circovirus-2. **J VET Diagn Invest.**, v. 24, n. 6, p. 1151, 2012. doi:10.1177/1040638712462374. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23051825>>. Acesso em: 9 maio 2011.

JIN, Y.; JANG, J. W.; HAN, C. H.; LEE, M. H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7639-43, 2005.

KAZAMI, A.; WATANABE, H.; HAYASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OGAWA, Y.; YAMAMOTO, K.; ADACHI, Y. Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 8, p. 735-737, 2002.

KEE, S.; KIM, I.; CHOI, M.; CAANG, W. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptosira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reveiws Microbioloty**, v. 7, p. 736-747, 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, 2004.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LIN, L. R.; FUA Z. G.; DANA, B.; JING, G. J.; TONGA, M.; CHEND, D. T.; YUE, Y.; ZHANGF, C. G.; YANGA, T. C.; ZHANGA, Z. Y. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TPN17 and TPN47. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 193–200, 2010.

LI, X.; WANG, L.; SHI, X.; ZHAO, D.; YANG, J.; YANG, S.; ZHANG, G. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of antibodies against classical swine fever virus. **Journal of Virological Methods**, v. 180, n. 1, p. 32-37, 2012.

LIU, L.; PENG, C.; JIN, Z.; XU, C. Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 8, p. 861-6, 2007.

LOU, S.; YE, J. Y.; LI, K. Q.; WU, A. A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: the influence of nanoparticulate size. **Analyst**, v. 137, p. 1174-1181, 2012.

MAGAJEVSKI, F. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de Leptospira interrogans sorovar hardjo em sêmen e urina de touros (Bos taurus) sorologicamente reagentes**. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

McKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **Journal Immunological Methods**, v. 96, n. 2, p. 271-278, 1987.

MIKAWA, A. Y. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C**. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em análises clínicas, Imunologia Clínica) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, 2006.

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips**: considerations for product. Billerica, 2008. 39 p.

MINEIRO, A. L. B. B.; VASCONCELLOS, S. A.; BEZERRA, E. E. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N. A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

MIORANZA, S. L. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG anti-Toxoplasma Gondii**. 2009. 220 f. Tese. (Doutorado em Ciências, Biologia da relação patógeno-hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

MOREIRA, E. C. Leptospirose: difícil erradicação. **Cultivar Bov.**, v. 10, p. 25-28, 2004.

MOREIRA, E. C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospirose em bovinos leiteiros**. 1994, 94 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MURRAY, C. K.; GASSER JR., R. A.; MAGILL, A. J.; MILLER, R. S. Update on rapide diagnostic testing for malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 97-110, 2008.

NABITY, S. A.; RIBEIRO, G. S.; AQUINO, C. L.; TAKAHASHI, D.; DAMIÃO, A. O.; GONÇALVES, A. H. O.; MIRANDA, D. B.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.;

LYASHCHENKO, K. P.; REIS, M. G.; MEDEIROS, M. A.; KO, A. I. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of human Leptospirosis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1878, 2012.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. & 43 COLABORADORES. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-72, 2004a.

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

NEVES, F. O.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C.; NASCIMENTO, A. L. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Archives Microbiology**, v. 188, p. 523-32, 2007.

NIELSEN, K.; YU, W. L.; KELLY, L.; BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T.; DAJER, A.; TORIONI DE ESCHAIDE, S. Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2007.

OLIVER, C. Immunocytochemical methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 588, p. 369-373, 2010.

PAEK, S. H.; LEE, S. H.; CHO, J. H. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, v. 22, p. 53-60, 2000.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; JUSUF, S. S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

PARMA, A. E.; FERMANDEZ, A. S.; SANTISTEBAN, C. G.; BOWDEN, R. A.; CERONE, S. I. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, p. 181-185, 1987.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZA DRI, S.; DAVIS, J. C.; MC GRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A. I.; DAVIES, J. K.; ME DIGUE, 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, p. e1607, 2008.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, e51025, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0051025.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569-82, 2009. doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.

PREECHAKASEDKIT, P.; PINWATTANA, K.; DUNGCHAI, W. et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of *Salmonella typhi* in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 562–566, 2012.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. Spain: Grafos, p. 292-303, 1994.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Veterinary medicine*. 9. ed. W.B. Saunders, p. 1877, 2000.

RAJERISON, M.; DARTEVELLE, S.; RALAFIARISO, A. L. A.; BITAM, I.; TUYET, D. T. N.; ANDRIANAIVOARIMANANA, V.; NATO, F.; RAHALISON, L. Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs. **PLoS One**, v.3:e421, 2009.

RAMADAS, P.; JARVIS, B. D.W.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetics characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 215-219, 1992.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

REBHUN, W. C. **Disease of dairy cattle**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 625.

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, p. 888–893, 2003.

RICALDI, J. N.; FOUTS, D. E.; SELENGUT, J. D.; HARKINS, D. M.; PATRA, K. P.; MORENO, A.; 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. doi:10.1371/journal.pntd.0001853.

ROSE, A. M.; MUELLER, J. E.; GERSTL, S.; NJANPOP-LAFOURCADE, B. M.; PAGE, A. L.; NICOLAS, P.; GUERIN, P. J. Meningitis Dipstick Rapid Test: Evaluating Diagnostic Performance during an Urban *Neisseria meningitidis* Serogroup A Outbreak, Burkina Faso, 2007. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11086, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0011086.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Press, 1989.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, v. 1, n. 9, p. 97-109, 1970.

SATO, Y.; COWELL, J. R.; SATO, H.; BURSTYN, D. G.; MANDARCK, C. R. Separation and purification of the hemagglutinins from *Bordetella pertussis*. **Infection Immunity**, v. 41, p. 313-320, 1983.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR – Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p.23-27, 2004.

SETUBAL, J. C.; REIS, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v. 152, p. 113-121, 2006.

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; NAGAKURA, N.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, Y. Chemical properties of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Moulton. **Microbiology Immunology**, v. 31, n. 8, p. 717-25, 1987.

SHYU, R. H.; SHYU, H. F.; LIU, H. W.; TANG, S. S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 255-258, 2002.

SLEE, K. J.; McORIST, S.; SKILLBECK, N. W. Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 60, p. 204- 206, 1983.

SMITH, C. R.; KETTERER, P. J.; McGOWAN, M. R.; CORNEY, B. G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 71, n. 9, p. 290-295, 1994.

SMITS, H. L.; ANANYINA, Y. V.; CHERESHKY, A.; DANCEL, L.; LAI-A-FAT, R. F. M.; CHEE, H. D.; LEVETT, P. N.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; MUTHUSETHUPATHI, M. A.; SANDERS, E. J.; SASAKI, D. M.; DOMEN, H.; YERSIN, C.; AYE, T.; BRAGG, S. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; GORIS, M. G. A.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. International Multicenter Evaluation of the Clinical Utility of a Dipstick Assay for Detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Serum Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2904-2909, 1999.

SMITS, H. L.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; GUSSENHOVEN, G. C.; YERSIN, C.; SASAKI, D. M.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1272-1275, 2000.

SOUZA, N. M.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO A. L. T. O. Lsa 30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, p. 125-134, 2012.

STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 64, p. 247-255, 2009.

SUBATHRA, M.; SENTHILKUMAR, T. M.; RAMADASS, P. Recombinant OmpL1 protein as a diagnostic antigen for the detection of canine leptospirosis. **Applied Biochem Biotechnol.**, v. 169, p. 431-7, 2013.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 216-223, 1974.

SUTCLIFFE, I. C.; HARRINGTON, D. J. Putative lipoproteins of *Streptococcus agalactiae* identified by bioinformatic genome analysis. **Antonie VanLeeuwenhoek**, v. 85, n. 4, p. 305, 2004.

THAIPADUNPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; 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, p. e16236, 2011.

TOMICH, R. G. P.; JULIANO, R. S.; PELLEGRIN, A. O.; BOMFIM, M. R. Q.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; KOURY, M. C. **Ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante para triagem de bovinos positivos para leptospirose**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 6 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 86). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php? arq_pdf=CT86>. Acesso em: 31 dez. 2009.

TURNER, L. H. Leptospirosis II serology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 62, p. 880-889, 1970.

VAN EYS, G. J. J. M.; GRAVEKAMP, C.; GERRISTSEN, M. J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M. T. E.; TER SCHEGGE, J.; TERPSTRA, W. J. Detection of Leptospirosis in urine by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.

VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico laboratorial de leptospirose. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 189-195, 1979.

VIEIRA, M. L.; D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A. M.; BARBOSA, A. S.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ABREU, P. A. E.; GÓMEZ, R. M.; NASCIMENTO, A. L. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, n. 2, p. 172-180, 2007.

WANG, Y.; DOU, H.; CHEN, K.; ZHANG, H.; HU, C. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic test strip for the rapid, on-site detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 329-338, 2011.

WARTHIN, A. S.; CHONISTER, A. C. "A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues (Warthin and Starry's cover-glass method)". **American Journal of Syphilis**, v. 4, p. 97-103, 1920.

WIDIYANTI, D.; KOIZUMI, N.; FUKUI, T.; MUSLICH, L.T.; SEGAWA, T.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; SAITO, M.; MASUZAWA, T.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S.I. Development of Immunochromatography-Based Methods for Detection of Leptospiral Lipopolysaccharide Antigen in Urine. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 20, n. 5, p. 683-690, 2013.

WOO, T. H. S.; PATEL, B. K. C.; SMYTHE, L. D.; SYMONDS, M. L.; NORRIS, M. A.; DOHNT, M. F. Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies interrogans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, p. 169-177, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). **Report of a WHO expert group. Current problems in leptospirosis research**. Geneva: World Health Organization Technical Report, 1967. p. 1-32. (Series, 380).

YANG, J.; JIN, M.; CHEN, J.; YANG Y.; ZHENG, P.; ZHANG, A.; SONG, Y.; ZHOU, H.; CHEN, H. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for detection of *Streptococcus suis* type 2 antibody. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 4, p. 355-361, 2007.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGER, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and sorovars for seven new *Leptospira* species. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ZHANG, G.; GUO, J.; WANG, X. Immunochromatographic lateral flow strip test. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. (Ed.). **Methods in molecular biology – Biosensors and Biodetection: methods and protocols**. [S.l.]: Humana Press, 2009. v. 2, p. 169-83, 2009.