

HIGOR SETTE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SORODIAGNÓSTICO BOVINO DE  
ANTÍGENOS DE *Trypanosoma vivax* CONTENDO EPÍTOPOS IDENTIFICADOS POR  
*PHAGE-DISPLAY***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Aplicada, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436a  
2018  
Pereira, Higor Sette, 1992-  
Avaliação do potencial de sorodiagnóstico bovino de  
antígenos de *Trypanosoma vivax* contendo epítomos identificados  
por *phage-display* / Higor Sette Pereira. – Viçosa, MG, 2018.  
vi, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Protozoologia veterinária. 2. Sorodiagnóstico. 3. Bovinos  
- Doenças. 4. *Trypanosoma vivax*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

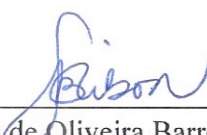
CDD 22. ed. 636.0896936

HIGOR SETTE PEREIRA

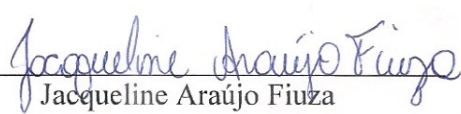
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SORODIAGNÓSTICO BOVINO DE  
ANTÍGENOS DE *Trypanosoma vivax* CONTENDO EPÍTOPOS IDENTIFICADOS POR  
*PHAGE-DISPLAY***

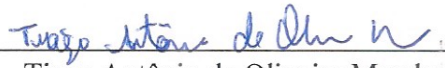
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica  
Aplicada, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Andréa de Oliveira Barros Ribon  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Graziela Domingues Almeida Lima

  
\_\_\_\_\_  
Jacqueline Araújo Fiuza

  
\_\_\_\_\_  
Tiago Antônio de Oliveira Mendes  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Ninguém chega a lugar algum sem apoio, orientação e participação. Por isso, dedico a presente dissertação a pessoas que foram importantíssimas no trajeto que percorri até aqui.

À minha mãe, meu pai, minha avó e meu avô, por me ensinarem o valor e a importância do estudo e possibilitarem a realização dos meus sonhos. A eles, o meu amor e gratidão por todo o sempre.

À minha esposa Ana Paula, por todo amor, carinho, companheirismo e paciência em todos os momentos. Obrigado por existir em minha vida!

Ao meu irmão, tias e tio (*in memoriam*) por serem a minha base.

Aos amigos de Ponte Nova, de Viçosa e à família da Ana Paula por tornarem o trajeto mais leve e prazeroso.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes por me orientar com tamanha dedicação, competência e carinho. Sempre me espelho em você quando penso no profissional que quero ser!

Aos coorientadores, Prof<sup>ª</sup>. Andréa Ribon e Prof. Daniel Menezes Souza, pela disponibilidade e pelas considerações que certamente enriqueceram o meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular pela parceria e risada diária. Especialmente ao Renato por compartilhar comigo todas as alegrias e desafios.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na pessoa do secretário Eduardo, pelo convívio e por auxiliar em toda a parte burocrática.

A UFV e a Capes por proporcionarem ambiente adequado e darem condições favoráveis para a realização da minha pesquisa.

À Patologia Clínica (Coltec UFMG), especialmente a Ana Maria e Guilherme, por toda a ajuda e suporte nesta reta final.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	3
2.1. Origem e transmissão da Tripanossomíase bovina.....	3
2.2. Epidemiologia da doença.....	5
2.3. Métodos de diagnóstico .....	7
2.4. <i>Phage display</i> .....	9
<b>3. Objetivos</b> .....	11
<b>4. Capítulo 1 (Artigo submetido a revista Veterinary Parasitology em 11/02/2018)</b> .....	12
<b>5. Capítulo 2</b> .....	36
5.1. Introdução .....	36
5.2. Materiais e Métodos.....	37
5.3. Resultados .....	42
5.4. Discussão .....	48
<b>6. Conclusões e perspectivas</b> .....	52
<b>7. Bibliografia</b> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

AUC – *Area Under Curve*

BCA – *Ácido bicinconínico*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

DAB – *Tetracloridrato de 3,3-Diaminobenzidina*

DNA – *Ácido Desoxirribonucleico*

OD – *Densidade Ótica*

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

IPTG – *Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo*

IFAT – *Indirect Fluorescent Antibody Test*

kDa – *Kilo Daltons*

LB – *Luria Bertani*

M – *Molar*

mA - *Miliampere*

mL – *Mililitros*

mM – *Milimolar*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

pb – *Pares de Base*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PEG – *Polyethylene Glycol*

PIB – *Produto Interno bruto*

RNA – *Ácido ribonucleico*

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

TEMED – *Tetramethylethylenediamine*

TMB – *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*

$\mu$ g – *Microgramas*

$\mu$ L – *Microlitros*

WT – *Wild Type*

## RESUMO

PEREIRA, Higor Sette, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Avaliação do potencial de sorodiagnóstico bovino de antígenos de *Trypanosoma vivax* contendo epítomos identificados por *phage-display***. Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Coorientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Daniel Menezes Souza.

A pecuária bovina está diretamente relacionada ao crescimento econômico nacional, uma vez que esta atividade movimentou uma quantia superior a 400 bilhões de reais entre 2012 e 2017. Doenças como a tripanossomíase bovina, causada pelo protozoário *Trypanosoma vivax*, acometem os rebanhos acarretando enormes prejuízos à bovinocultura. Atualmente, o diagnóstico da doença é baseado na detecção do protozoário através de técnicas parasitológicas ou moleculares. No Brasil, a tripanossomíase bovina é considerada crônica e as técnicas disponíveis para o diagnóstico se mostram insuficientes para o controle e diagnóstico da patologia. Neste trabalho, técnicas de *phage display*, bioinformática e imunológicas foram utilizadas para identificar peptídeos e proteínas recombinantes com alta afinidade a anticorpos do soro de animais infectados. Dentre os peptídeos clones de fagos testados, 25 foram reativos com as amostras de bovinos infectados, sendo que 11 apresentaram valor máximo de sensibilidade e especificidade. Isto posto, utilizou-se da sequência dos fagos reativos para mapear proteínas de *T.vivax* e expressá-las em *Escherichia coli*. Duas proteínas foram identificadas, sendo que a Tv2 foi isolada, purificada e titulada com as amostras infectadas. Este *screening* inicial indicou que a proteína Tv2 possui potencial antigênico a ser explorado, visto que os valores de absorvância foram distintos entre as amostras saudáveis, as de animais infectados com demais patologias e de tripanossomíase bovina. Logo, faz-se necessário mais ensaios para avaliar e elucidar o potencial de diagnóstico da proteína Tv2.

## ABSTRACT

PEREIRA, Higor Sette, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Evaluation of bovine serodiagnostic potential of *Trypanosoma vivax* antigens containing epitopes identified by phage-display.** Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Co-advisers: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Daniel Menezes Souza.

Cattle raising is directly related to national economic growth since this activity moved more than 400 billion of reais between 2012 to 2017. However, diseases such as bovine trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma vivax* protozoan, affect the herds, causing enormous damage to the cattle. Currently, diagnosis of disease is based on detection of protozoan through parasitological or molecular techniques. In Brazil, bovine trypanosomiasis is considered chronic and techniques available for diagnosis are insufficient for the control and diagnosis of disease. In the present work, phage display, bioinformatics and immunological techniques were used to identify recombinant peptides and proteins with high affinity for serum antibodies from infected animals. Among the peptides phage clones tested, 25 were reactive with samples of infected cattle, and 11 presented the maximum value of sensitivity and specificity. Thus, reactive phages sequence was used to map and express *T.vivax* proteins in *Escherichia coli*. Two proteins were identified, and Tv2 was isolated, purified and titrated with the infected samples. This initial screening indicated that Tv2 protein has an antigenic potential to be explored since absorbance values were different among healthy samples, those of animals infected with other pathologies and of bovine trypanosomiasis. Therefore, further testing is needed to evaluate and elucidate the diagnostic potential of Tv2 protein.

## 1. Introdução

A pecuária brasileira é destaque mundial quando se trata da qualidade e quantidade de produtos exportados. Um levantamento feito pela EMBRAPA em 2015 apontou que o Brasil possui um rebanho estimado de 209 milhões de cabeças de gado, sendo o segundo maior mercado consumidor e exportador (Gomes, 2017). Em termos econômicos, a exportação da carne bovina representa 3% das exportações brasileiras, o que corresponde a 6 bilhões de reais ou 30% do PIB do agronegócio nacional. Vale ressaltar que, ao longo de 40 anos, uma revolução tecnológica permitiu que a pecuária bovina nacional tivesse seu patamar elevado em termos de produção e organização, fato que pode ser creditado à melhoria da qualidade da carne bovina (Gomes, 2017).

Entretanto, mesmo com toda relevância econômica, existem grandes perdas na bovinocultura que podem ser associadas às falhas reprodutivas ou às técnicas de obtenção do leite. Muitas vezes, a origem destas perdas é desconhecida, porém estão associadas a infecções e doenças que acometem o rebanho. Dentre as principais doenças que afetam o rebanho bovino, destacam-se a brucelose, leptospirose, mastite e tuberculose, que estão entre as de maior ocorrência (Oliveira, 2006). Com menor incidência reportada, a tripanossomíase bovina é uma doença silenciosa que possui notificação subestimada e configura uma ameaça ao rebanho bovino nacional (Batista, 2012).

Entre os protozoários causadores da tripanossomíase em animais, o *Trypanosoma vivax*, um protozoário hemoflagelado e patogênico, é o principal responsável pela doença em espécies de bovinos silvestres e domésticos, especialmente na África e América Latina (Batista, 2012; Osório, 2008). Na América Latina, a transmissão ocorre por vetores mecânicos sugadores de sangue, além de transmissão por materiais perfuro-cortantes, como agulhas (Bastos, 2017; Dagnachew, 2014; Silva, 2002). O estudo do *T. vivax* vem sendo de grande interesse para o Brasil, devido ao seu impacto negativo sobre a pecuária, sendo a tripanossomíase a doença que gera maior perda na produtividade do animal (Abrão, 2016). Os animais acometidos por este protozoário podem apresentar infecções agudas e crônicas, que podem resultar em alterações hematológicas severas, perda de condição corporal, queda na produtividade, abortos e alterações na reprodução (Adamu, 2007; Osório, 2008).

Alguns sinais clínicos como perda de peso, fraqueza progressiva, febre, diminuição na produção de leite e carne, conjuntivite, repetições de cio, nascimentos de crias fracas, queda na produtividade ou permanente e eventualmente morte podem ser observados

(Abrão, 2016; Silva, 2009; Guerreiro, 2005; Carvalho, 2008). Tais condições geram grandes perdas econômicas para a pecuária, já que cerca de três milhões de bovinos morrem anualmente por estes motivos, tanto nos países africanos quanto nos países da América do Sul. Em animais subclínicos, o impacto econômico também é significativo devido à diminuição da produção de carne, leite e derivados, resultando em perda de aproximadamente cinco milhões de dólares/ano (Osório, 2008).

O diagnóstico definitivo da doença consiste em exames diretos empregando a técnica parasitológica com confirmação da presença das formas tripomastigotas do protozoário em esfregaços sanguíneos ou por meio de técnicas moleculares (PCR) para a detecção de DNA de *T. vivax*, além de testes imunológicos (ELISA) para observação da presença de anticorpos anti-*T. vivax* (Woo, 1970; Desquesnes, 1995, Aquino, 2010). Como a ocorrência da doença em bovinos no Brasil é considerada crônica e assintomática, a detecção de *T. vivax* pelos métodos parasitológicos citados anteriormente é dificultada. Por isso, a triagem sorológica e a busca de anticorpos se tornam importantes, fornecendo informações úteis complementares, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por tripanosoma e os efeitos da infecção sobre a saúde animal, a produtividade e o risco de doença (Mattioli, 2001). Um dos entraves dos testes sorológicos se refere à obtenção dos antígenos utilizados, visto que, em sua grande maioria, são antígenos brutos obtidos a partir de sangue de bovinos experimentalmente infectados. Isso promove baixa especificidade dos testes sorológicos. Desta forma, a busca de proteínas recombinantes e peptídeos para serem utilizadas como antígenos em testes diagnósticos mais específicos e sensíveis faz-se necessária.

Uma vez que o genoma de um isolado de *T. vivax* já está disponível (Jackson, 2012), métodos de triagem computacional podem facilitar a busca por antígenos potenciais para o diagnóstico e até mesmo reduzir os custos experimentais ao direcionar a etapa experimental para alvos com maior potencial. Nesta perspectiva, este projeto objetiva-se a identificação de proteínas e peptídeos do patógeno contendo epítomos previamente mapeados pela técnica de *phage display* e avaliação do potencial destes antígenos para o diagnóstico da tripanossomíase bovina.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Origem e transmissão da Tripanossomíase bovina

Relatos históricos apontam que os surtos de tripanossomíase bovina fizeram com que diversas tribos africanas, possuidoras de gados, migrassem para evitar locais em que a presença do agente transmissor fosse notada (Baral, 2010). De acordo com Bezerra (Bezerra, 2008), *Trypanosoma vivax*, um dos agentes causadores da doença, foi introduzido na América do Sul em 1830, sendo que o primeiro relato da existência do parasito no Brasil ocorreu apenas em 1972. Ainda de acordo com o estudo supracitado, acredita-se que a cepa presente no Brasil possui origens filogenéticas semelhantes às do oeste da África.

A tripanossomíase pode ser causada por diferentes espécies de tripanosomas, sendo que a virulência de diferentes espécies, estado nutricional, a raça do gado e a cepa influenciam diretamente na gravidade e no curso da infecção (Dagnachew, 2014; Bakari, 2017). Entre os protozoários causadores da tripanossomíase em animais na América do Sul, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax* são considerados de maior patogenicidade, impacto e incidência veterinária. *Trypanosoma vivax* é um hemoprotozoário parasito de ruminantes e outros vertebrados que pode ser transmitido de um animal a outro através da inoculação de sangue contendo formas viáveis do hemoparasito (Osório, 2008). Segundo relatos recentes, a forma mais virulenta do protozoário pode ser encontrada apenas em países africanos, nas regiões em que se encontra o vetor biológico da doença, a mosca tsé-tsé (Bassi, 2018).

Existem duas maneiras diferentes de se transmitir a doença ao gado: a transmissão cíclica, em que o vetor biológico é a mosca tsé-tsé, que ocorre de maneira mais recorrente em países africanos e a transmissão mecânica (sem replicação do patógeno no inseto vetor), que se dá através de moscas hematófagas, como *Stomoxys* sp. e *Tabanus* sp., que acometem em maior proporção os rebanhos da América do Sul e Ásia (Bastos, 2017; Batista, 2007; Batista, 2012; Dagnachew, 2014). O ciclo biológico do parasito é apresentado na Figura 1. A infecção no hospedeiro de mamífero começa quando o estágio infeccioso, conhecido como estágio metacíclico, é injetado intradermicamente pelo inseto (Baral, 2010).

Uma possível estratégia, visando controlar a transmissão e a disseminação da doença, seria o controle dos vetores mecânicos e biológicos, além do uso de drogas que

aniquilem o parasito nos animais. Porém, o controle do vetor é uma tarefa laboriosa, principalmente no continente africano, em que a presença dos vetores ocorre em uma ampla faixa territorial. Além disso, há aproximadamente 60 anos, os medicamentos utilizados para controle dos protozoários são os mesmos (Boulangé, 2017). Ademais, uma prática que contribui para a transmissão iatrogênica da infecção é o uso de materiais perfuro-cortantes para administração medicamentosa em todos os animais de um rebanho, sem uma análise prévia do perfil infeccioso de cada animal (Bastos, 2017).

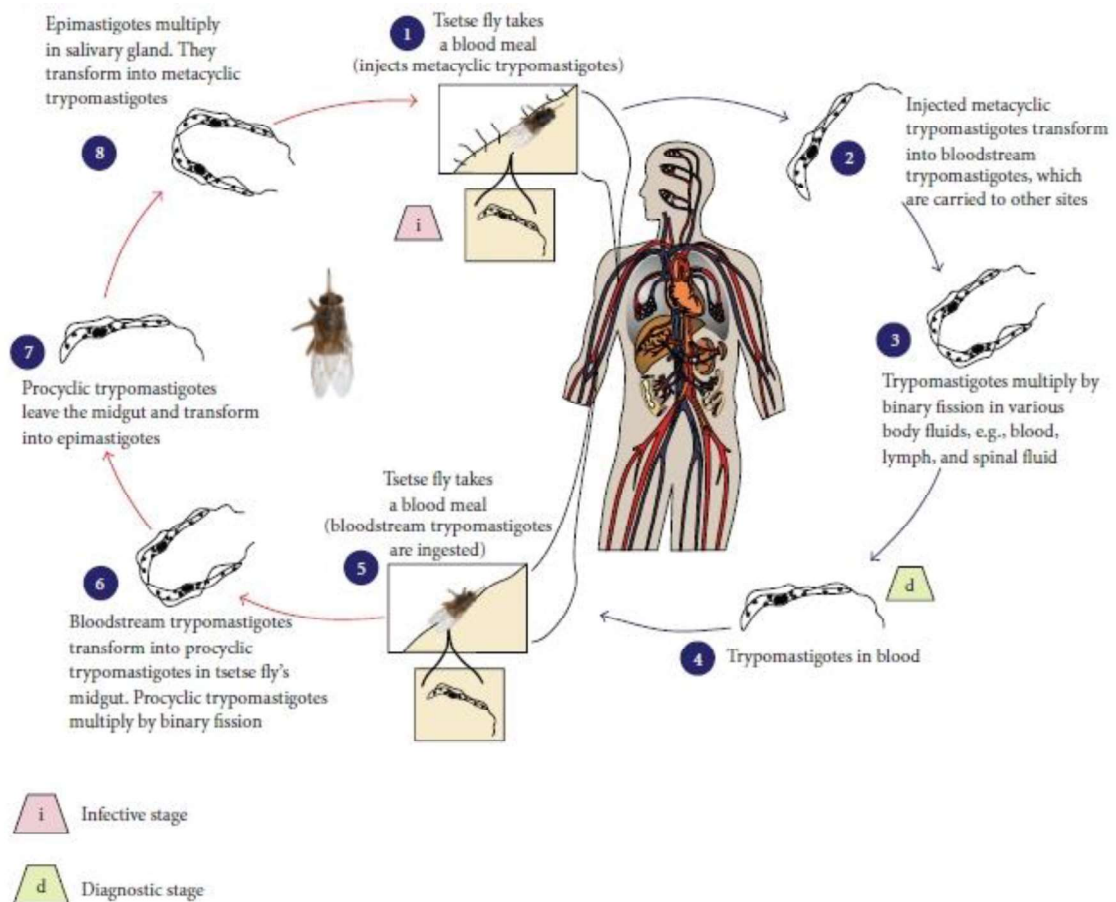


Figura 1 - Representação do ciclo de infecção pelas formas tripanomastigotas do *Tripanosoma vivax* do vetor ao hospedeiro (Baral, 2010).

Ao longo do processo de infecção, os tripanossomos se mantêm na corrente sanguínea do hospedeiro, afetando diretamente os componentes responsáveis pela resposta imunológica, além de comprometer a função de diversos órgãos vitais, como baço, fígado e rins (Bakari, 2017). Alguns animais se mostram mais resistentes à infecção, desenvolvendo uma resposta imunológica eficaz, controlando a parasitemia e os sinais clínicos mais comuns; em contrapartida, outros animais são mais susceptíveis, com uma resposta imunológica mais limitada e sintomatologia mais grave, podendo chegar até a morte (Bassi, 2018). Como consequência da infecção, alguns parâmetros bioquímicos do soro

podem sofrer mudanças e afetar a fisiopatologia do animal e a virulência da infecção (Dagnachew, 2014). Uma dessas mudanças está relacionada com a alteração do quadro citocinas, sendo que, no início da infecção nota-se a produção de citocinas pró-inflamatórias e, em infecções crônicas, percebe-se citocinas anti-inflamatórias (Bakari, 2017). Este fato está diretamente relacionado com a diminuição da parasitemia e patologia, respectivamente. Um estudo recente indicou que conhecer os parâmetros parasitológicos, imunofenotípicos e sorológicos da infecção pode auxiliar no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais acuradas e de maior interesse veterinário (Bassi, 2018).

## 2.2. Epidemiologia da doença

Acredita-se que o *Trypanosoma vivax* chegou ao continente americano inicialmente na América Latina, através de gados contaminados importados da África (Batista, 2012). A Guiana Francesa foi o local onde ocorreu o primeiro surto na América do Sul, em 1919, sendo notado a partir da queda da produção de leite e pela morte de mais de 50% do gado (Leger, 1919). Já no Brasil, o primeiro caso de infecção ocorreu no estado do Pará em um rebanho de búfalos no ano de 1972 (Shaw and Lainson, 1972). Após a epidemia inicial, a disseminação do protozoário se deu em todo território nacional (Figura 2), tendo sua presença confirmada em todas as regiões e em 13 dos 26 estados (Bezerra, 2008; Abrão, 2009; Cuglovici, 2010; Cadioli, 2012; Bastos, 2017). Bastos e colaboradores (Bastos, 2017) relatam que o surto ocorrido em Goiás se deu em consequência à inserção de 18 vacas oriundas do estado de Minas Gerais. Uma análise realizada no município de Igarapé, interior de Minas Gerais, avaliou-se o impacto de um surto de tripanossomíase em um rebanho de 235 bovinos (Abrão, 2009). De acordo com o autor, as condições sanitárias, nutricionais e genéticas dos animais não foram alteradas. Após o surto, foram encontradas 9 vacas leiteiras mortas e 11 abortos no primeiro semestre de 2008, além de queda no valor bruto diário da produção em 47%. Em outro estudo, Bezerra (Bezerra, 2008) descreve o primeiro surto da região nordeste. Em um rebanho de 130 gados, 64 adoeceram e 11 morreram por consequência da infecção.



hospedeiro, levando em conta fatores genéticos e ambientais, além do estado nutricional, exposição a fármacos e fatores envolvendo a cepa do parasito (Bezerra, 2008; Bittar, 2015). Entretanto, independente da ocorrência ou não de sintomas clínicos perceptíveis, os animais infectados também atuam como reservatório na disseminação e propagação da doença (Masake, 2002).

*Trypanosoma vivax* é considerado um dos principais causadores de falhas reprodutivas em bovinos, tendo verificado que sua infecção levou à redução da libido, indução de um estado febril e aumento do volume ejaculado, acarretando no baixo desempenho sexual destes animais (Batista, 2012; Bittar, 2015). Vale destacar que o protozoário afeta de maneira diferente machos e fêmeas. Nos primeiros, as consequências da infecção podem levar à má qualidade do sêmen, redução da libido e retardamento da puberdade; já nas fêmeas, destacam-se a subfertilidade, aborto, efeito patogênicos no feto e ciclos estrais anormais (Abrão, 2009; Bezerra, 2008).

### 2.3. Métodos de diagnóstico

Técnicas para o diagnóstico da tripanossomíase em animais podem ser divididas em dois grupos: as que visam detectar o parasito e/ou seus constituintes, como antígenos e DNA, em amostras sanguíneas; e as que desejam encontrar os anticorpos produzidos a partir da presença do microrganismo (Bossard, 2010; Boulangé, 2017). Atualmente, os tratamentos disponíveis se apresentam como ferramentas generalistas e não espécie-específica para cada organismo infectante. Além disso, como não há disponível nenhum teste de diagnóstico de campo, buscar mecanismos que simplifiquem o reconhecimento precoce da doença se torna um bom ponto de partida para novas pesquisas (Pillay, 2013). Entretanto, a ausência de sinais clínicos e específicos da infecção em fases agudas dificulta a construção de um modelo de diagnóstico suficientemente sensível, capaz de impedir a disseminação da doença (Almeida, 2012).

De acordo com Pillay (Pillay, 2013), entre as análises parasitológicas, o padrão ouro para diagnóstico é baseado na avaliação do sangue por microscopia com o objetivo de constatar a presença do parasito. Uma maneira de aumentar a sensibilidade da técnica é concentrar o sangue por centrifugação (técnica de Woo), um método simples e factível que, no entanto, não torna o diagnóstico parasitológico mais útil, uma vez que em infecções crônicas a parasitemia é baixa e intermitente (Masake, 2002). A centrifugação de micro-hematócitos é amplamente utilizada pois proporciona a detecção do parasito em um

período de seis a dez dias de antecedência em relação à esfregaços de sangue fresco (Almeida, 2012).

Como uma alternativa aos métodos parasitológicos, técnicas moleculares e imunológicas se inseriram no contexto da tripanossomíase na esperança de obter um diagnóstico mais sofisticado. Entre as técnicas moleculares, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) que forneceu resultados altamente específicos e com sensibilidade semelhante às técnicas parasitológicas (Almeida, 2012). Contudo, os mecanismos moleculares demandam tecnologias onerosas e de uso técnico mais exigente relativo à manipulação das amostras e equipamentos (Bossard, 2010).

Com relação ao imunodiagnóstico, IFAT (do inglês, *Indirect Fluorescent Antibody Test*) foi um dos primeiros testes a utilizar a detecção de anticorpos como ferramenta de diagnóstico, porém não é um método quantitativo e demanda conhecimento em microscopia de fluorescência (Pillay, 2013). A detecção de anticorpos anti-parasito é feita pelo ensaio de imunoabsorção enzimática, o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), considerado o teste imunológico padrão ouro, que utiliza o lisado do tripanossomo como alvo e permite um screening de vários alvos, além de demandar menor custo laboratorial que a PCR, por exemplo (Boulangé, 2017). Nos países em desenvolvimento, em locais onde a tripanossomose é endêmica, já é utilizado o ELISA como ferramenta de diagnóstico (Masake, 2002). Entretanto, apesar de apresentar elevada sensibilidade, as reações cruzadas entre antígenos de outros patógenos causadores de infecção bovina se tornam uma limitação pois diminuem a especificidade do ELISA (Almeida, 2012). Além disso, os anticorpos permanecem na corrente sanguínea do animal infectado por um certo tempo após o tratamento, contribuindo assim para baixa especificidade do método (Bossard, 2010). Ainda que diagnósticos imuno e parasitológicos sejam utilizados para detecção da tripanossomíase bovina, existem diversas lacunas a serem preenchidas, especialmente no que diz respeito a aprimorar a sensibilidade e a especificidade da técnica (Bassi, 2018).

Análises sorológicas são ferramentas úteis para detecção de anticorpos anti-tripanosoma em estudos epidemiológicos de grande escala, facilitando campanhas de controle da doença (Bossard, 2010). Segundo Bakari (Bakari, 2017), os fatores bioquímicos e hematológicos presentes no soro se apresentam como ferramentas importantes para o diagnóstico e o prognóstico das doenças imunológicas. Portanto, desenvolver novos testes sorológicos baseados em tecnologias recombinantes, como moléculas não variantes do proteoma do parasito, abaixaria o custo da tecnologia,

facilitaria a aplicação em grande escala e seria um recurso útil (Bossard, 2010). Em um estudo desenvolvido por Masake e colaboradores (Masake, 2002), foi avaliado a eficiência de diferentes técnicas de detecção de *T.vivax* em sangue de animais experimentalmente infectados. Verificou-se que PCR e PCR combinado com ELISA evidenciaram o DNA do parasito em 93 e 94% dos casos, respectivamente. Em contrapartida, na análise dos parasitos por microscopia, encontrou-se apenas em 63% das amostras. Contudo, ainda é importante destacar que tanto o PCR, quanto o PCR combinado com o ELISA foram sensíveis ao DNA do *T.vivax* na análise de animais provenientes de área livre de tripanosomas.

Com a disponibilidade e o fácil acesso à sequência de genes de diversos organismos patogênicos, o desenvolvimento de testes de diagnóstico para doenças infecciosas utilizando ferramentas que envolvem genômica, transcriptômica e, principalmente, a proteômica vêm aumentando. Segundo McGuire (McGuire, 2009), a tetramerização dos peptídeos pode contribuir de maneira significativa para o aumento da afinidade entre o peptídeo e o alvo. Entretanto, a identificação da região em que um antígeno reconhece o sítio de ligação do epítipo de célula B, efeito denominado paratopia, é a grande desvantagem no uso de peptídeos (Carmona, 2012). Como medida alternativa, diversas proteínas recombinantes se apresentam como recurso propício para diagnóstico de doenças infecciosas. Em um estudo fusionou-se sequências de DNA responsáveis pela expressão diferentes proteínas preditas com alto potencial antigênico, produzindo assim proteína quiméricas compostas de alto conteúdo de epítopos altamente capazes de reconhecer o alvo em testes sorológicos (Aguirre, 2006).

#### 2.4. *Phage display*

Phage display é uma técnica que se baseia na expressão de peptídeos, proteína, ou fragmentos de anticorpos na superfície de um bacteriófago recombinante (Fack, 1997). A presente metodologia tem sido utilizada em estudos que visam identificar novos antígenos para várias doenças, como infecções virais, câncer e doenças autoimunes, bem como na produção de vacinas recombinantes (Manoutcharian, 1999; Noya, 2003). A identificação de peptídeos reativos na superfície dos fagos permite sua utilização e subsequente construção sintética com aplicação direcionada ao diagnóstico e desenvolvimento de novas vacinas (He, 2012; Toledo-Machado, 2015; Toledo-Machado, 2015).

Ao longo dos anos, a técnica se consolidou como uma poderosa ferramenta na busca de moléculas que interagem com alvos específicos. De acordo com McGuire (McGuire, 2009), *phage display* já foi utilizado para o reconhecimento de células do sistema imune, beta-pancreáticas, cardíacas, tumorais e infectados por parasitos com alta capacidade discriminatória entre o alvo e o controle. A busca por peptídeos sintéticos fornece plataformas rápidas, de alto rendimento e baixo custo para testes imunológicos baseados em epítopos lineares de células B (Carmona, 2012). Tetramerizar os peptídeos e o aumento no *round* de seleção reduzem a quantidade de fagos disponíveis e contribuem significativamente para o aumento da afinidade entre o peptídeo e o alvo (McGuire, 2009).

### 3. Objetivos

O objetivo geral desta proposta é identificar peptídeos e proteínas capazes de diagnosticar a tripanossomíase bovina no ambiente agropecuário. Sendo assim, os objetivos específicos são:

- I. Mapeamento dos peptídeos clonados em fagos que interajam com anticorpos anti- *T.vivax*, utilizando a técnica de *phage display*;
- II. Avaliação do potencial antigênico específico dos peptídeos preditos atuando como epítomos lineares de células B;
- III. Identificação de proteínas de *T. vivax* contendo os epítomos mapeados por *phage display*;
- IV. Expressão heteróloga de proteínas recombinantes selecionadas em *E. coli Artic Express*;
- V. Teste de reatividade com amostras bovinas infectadas, não infectadas e com outras patologias;
- VI. Avaliação do potencial de diagnóstico da tripanossomíase bovina.

## **Serodiagnosis of bovine trypanosomiasis using mimotope peptides identified by phage display library**

### **Abstract**

Trypanosomiasis is a disease of African origin that affects wild and farm animals, posing a major threat to the health of cattle. The disease is caused by the hemoprotozoan *Trypanosoma vivax*, a parasite of ruminants and other vertebrates with reported presence in several herds of Latin and South America. In Brazil, the disease has been taking on greater proportions over the years, and there is evidence of contamination in all regions of the country. In South America, the disease is considered chronic and asymptomatic. However, in some cases, animals are affected by the infection and develop symptoms such as anemia, weight loss, decreasing milk production and reproductive failures. Bovine trypanosomiasis can be detected by parasitological, molecular or immunological diagnostic methods. Serological methods have a valuable importance for disease diagnosis and control because they can be adapted and applied in a large scale in a short time at low cost with high sensitivity and specificity. Phage-display is a cloning technique capable of isolating and selecting peptides that mimic linear and conformational epitopes (mimotopes) that can be used to diagnose various diseases. In the present work, we identified potential peptides for serological diagnosis of Bovine Trypanosomiasis using a phage-display technique. From a random library, 25 phage clones reacted with sera from infected animals. In addition, 11 clones presented maximum value (100%) for specificity, sensitivity and accuracy for the identification of infected samples. A total of 8 reactive peptides were successfully mapped to proteins encoded in the protozoan genome in regions predicted to contain linear B cell epitopes. Moreover, ELISA using the selected phages suggested that the peptides are able to differentiate with high sensitivity, specificity and accuracy the infected samples from non-infected.

**Keywords:** *Trypanosoma vivax*, phage display, peptides, mimotopes and serodiagnosis

### **Highlights (3-5 bullet points):**

1. Bovine trypanosomiasis diagnosis of infected animal serum.
2. Phage display technology as a strategy to identify mimotopes to serodiagnosis.
3. Mimotopes peptides are efficient for diagnosis of *T. vivax* infected samples.

## 1. Introduction

Bovine trypanosomiasis is a disease caused by the parasite *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. It is a protozoan hemoflagellate responsible for the disease in bovine species in Africa and Latin America (Osório et al., 2008). Infection can occur by two modes of transmission vector including the cyclic, by the African fly Tsetse, and the mechanics, by contaminated fomites or hematophagous of insects such as blood-sucking dipterans, in addition to transmission by needle motifs (Hoare et al., 1972; Gardiner et al., 1989; Silva et al., 2002). Trypanosomiasis can cause acute and chronic infections in ruminants, which can result in severe hematological alterations, loss of body condition, decrease in productivity, abortions and alterations in reproduction (Osório et al., 2008; Silva et al., 2009; Bittar et al., 2015). Clinical signs such as leukopenia, lacrimation, anemia, progressive weakness, conjunctivitis, fever, lethargy, impairment of milk and meat production, eventually death. Furthermore, heat repetitions, and temporary or permanent anoestrus can also be observed (Bezerra et al., 2008; Carvalho et al., 2008; Silva et al., 2009).

*T. vivax* is one of the most important and pathogenic protozoa that causes trypanosomiasis in cattle and generates great economic losses by the death of around three million cattle annually, both in African and in South America countries (Osório et al., 2008). Especially due to the negative impact of the disease on cattle raising, the disease control is of great interest for the maintenance of livestock health. In order to support the control of disease, a precise, low-cost and rapid diagnostic method is need to identify *T. vivax* infection. A definitive diagnosis is performed by direct examinations to confirm the presence of *T. vivax* trypomastigote forms in blood smears (Woo, 1970; Murray et al., 1977). Detection of protozoan by parasitological methods is a difficult task, since the occurrence of the disease in cattle in Brazil is considered as chronic and asymptomatic (Ventura et al., 2001). In addition, it is possible to identify the pathogen by molecular techniques, such as the polymerase chain reaction (PCR), where *T. vivax* DNA / RNA are detected (Ventura et al., 2001; Dávila et al., 2003) as well as serological tests for the presence of antibody anti-*T. vivax* (Madruga et al., 2006; Aquino et al., 2010). Serological screening and titration of antibodies provide useful information due to possibility of screening of large number of samples and to assess with more sensitivity the status of the herds infected by the parasite and the effects of the infection on animal health, productivity and risk of disease (Mattioli et al., 2001). However, one of the challenges of the serological tests is the quality of the antigens used. The current serological tests are usually composed of crude antigens obtained from blood of experimentally infected cattle that is associated to low specificity of the serological tests (Eisler et al., 1998; Rebeski et al., 1999; Silva et al., 2002; Magona et al., 2003; Pillay et al., 2013). Nowadays, no method currently available for the diagnosis of Bovine Trypanosomiasis presents all the desirable characteristics of high sensitivity and specificity, ease of execution and low cost.

Phage display is based on the expression of peptides, proteins or antibody fragments in the surface of recombinant bacteriophage (Fack et al., 1997). This technology has been used in several studies to investigate new antigens of various diseases, such as viral infections, cancer and autoimmune diseases; as

well as in the production of recombinant vaccines (Manoutcharian et al., 1999; Noya et al., 2003). Identification of reactive peptides on the surface of the phages allows their use and/or the subsequent synthetic construction with directed application for diagnosis and/or development of vaccines against various diseases (He et al., 2012; Toledo-Machado et al., 2015; Toledo-Machado et al., 2015).

In this study, a subtractive selection of phage display was first used to identify peptides that can be used in the serodiagnosis of Bovine Trypanosomiasis caused by *T. vivax*. After peptide screen, direct phage-ELISA provided a panel of the most relevant serologically selected phage clones. In this sense, the present study identified antigens with high sensitivity and specificity and potential to significantly improve the serodiagnosis of bovine trypanosomiasis.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Animals and ethics statement**

All samples used were obtained from sera bank of the Veterinary Hospital of Uberaba. Approval to use the samples was obtained from Animal Experimentation Ethical Committee from Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brazil (CEEA/UNIUBE, protocol number 001/2013). The samples were collected followed all the ethical principles of cattle experimentation procedures.

The bovine sera panel consisted of samples from endemic area for Trypanosomiasis (*T. vivax*-infected group, n=12), cases identified in the Veterinary Hospital of Uberaba. The infection was confirmed by microscopic identification of the trypomastigote form of *T. vivax* in blood smears from peripheral blood associated to investigation of the antibodies IgG anti-*T. vivax* using the technique of indirect immunofluorescence (Bittar et al., 2015). Bovines from an endemic area for trypanosomiasis with negative results for *T. vivax* employed parasitological and serologic test, with absence of clinical signs, were considered to be non-infected and used as the control group (Non-infected group, n=10).

### **2.2 Bovine IgG purification**

The purification of bovine IgG antibodies from the serum samples of the different groups was performed by coupling to magnetic microspheres (magnetic beads) conjugated to protein G (Dynabeads, Invitrogen), as described previously (Costa et al., 2014).

### **2.3 Phage display selection and titration of clones**

The pipeline for the identification of new targets for the serodiagnosis of bovine trypanosomiasis is summarized in the Figure 1. The phage library containing random peptides fused to a minor coat protein of M13 filamentous phages (Ph.D.-C7C library; New England BioLabs, USA) were used in this study, as described previously (Costa et al., 2014). In briefly, biopanning was performed using IgGs that had been purified from healthy bovines. The supernatant containing the clones that were not adhered to the IgGs was recovered and transferred to a new tube, titrated, and used in the positive selection. In this step, the previously recovered phage clones were transferred to a tube containing IgGs purified from serum samples of *T. vivax*-infected bovines and incubated for 30 min at room temperature. After, the supernatant was removed and the remaining phages that were bound to the IgGs were washed 10 times with 1 mL of TBS-T and eluted with 500  $\mu$ L of 0.2 M glycine buffer (pH 2.0). Next, 75  $\mu$ L of 1 M Tris-base (pH 9.0) was added to neutralize the acidic pH. Subsequently, the recovered phage clones were used in a new biopanning cycle and the process was repeated three times. Finally, after 3rd cycle, the selected phage clones were recovered and titrated. Next, phage clones were diluted  $10^{-1}$  to  $10^{-11}$  in 500  $\mu$ L of sterile phosphate-buffered saline (PBS), mixed with an *Escherichia coli* culture with optical density at 600 nm, and plated on LB agar plates containing 1 mL of IPTG 1.0 mM (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside). The colonies were individually quantified, and the titration was performed for each biopanning cycle. 96 colonies were selected from the plate and added to 200  $\mu$ L of LB in a sterile culture plate, and then the plate was sealed and incubated for 5h with constant stirring at 37°C. After incubation, the plate was centrifuged for 20 min at 2,250 x g and the supernatant was transferred to a new plate, in which a polyethylene glycol (PEG)-NaCl (20% PEG 8000 and 2.5 M NaCl) solution was added (1/6 of the total volume of the supernatant) following incubation for 16 h at 4°C. Afterward, the plate was centrifuged for 1h, the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of a solution composed of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 4 M NaI. DNA of each phage clone selected was extracted and sequenced by Sanger method as described previously (Costa et al., 2014).

## 2.4 Phage-ELISA

Previous titration curves were performed to determine the most appropriate phage concentration, besides antibody dilution to be used. For the Phage-ELISA, clones diluted in 100  $\mu$ L of coating buffer (50mM carbonate buffer, pH 9.6) were coated ( $1 \times 10^9$  phages per well, each) onto 96-well microplates (Nalge Nunc International, USA) for 16 h at 4° C. A wild-type phage was used as controls in a concentration of  $1 \times 10^9$  phages per well. After coating step, the plates were blocked with 150  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 1h at 37°C and then treated with 1:100 dilutions of bovine serum samples (non-infected or *T. vivax*-infected) for 1h at 37°C. Peroxidase-conjugated antibodies specific for bovine IgG (Sigma-Aldrich, USA) were diluted at 1:5,000 and added to the plates for 1h at 37°C. The wells were washed, and the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate (Sigma-

Aldrich) in citrate buffer containing hydrogen peroxide was added to the plate. The plates were incubated for 30 min in the dark at 37°C. The reaction was halted by adding 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance at 450 nm was read with an automatic microplate reader (EMax<sup>®</sup>; Molecular Devices, USA). Each serum sample was assayed in duplicate.

## **2.5 Identification of the *T. vivax* proteins containing reactive peptides**

In order to identify the proteins that induced the production of specific antibodies against peptides recognized by the phage display technique, a search was carried out using the 25 peptides from the selected phages as query sequence and BLASTp tool (Altschul et al., 1990; Gish and States, 1993) against the predicted *T. vivax* proteome deposited in the database GenBank (Benson et al., 2005). The bioinformatics analyses were based only on proteins containing peptides with 100% of coverage and identity value above 70%. The BLASTp parameters were adjusted for the input of short sequences: expected limit of 100, maximum match in query interval 0, BLOSUM62 matrix, costs for extension gap 11 and existence 1, and used a conditional scoring matrix adjustment.

## **2.6 *In silico* prediction of linear B-cell epitopes and gene expression analyses**

Linear B-cell epitopes from the peptides recognized by phage display technique were predicted using the BepiPred 1.0 program with a cutoff of 0.9 which represents a specificity of 91% (Larsen et al., 2006). The expression profile of the genes in bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax* was retrieved from RNAseq database previously published (Greif et al., 2013).

## **2.7 Statistical analysis**

The lower limit of positivity (cut-off) for the phage clones was established for optimal sensitivity and specificity using the Receiver Operator Curve (ROC curve). The cut-off was chosen based on point that provides the maximum of the sum of the sensitivity and specificity (Linnet et al., 2012; Toledo-Machado et al., 2015). The performance of each test was evaluated according to the sensitivity, specificity, accuracy and area under curve (AUC). The one-sample Kolmogorov-Smirnoff test was used to determine whether a variable was normally distributed. An unpaired Student t-test was used to compare means of absorbance between non-infected and *T. vivax*-infected groups. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . All of the statistical analyses were performed using GraphPad Prism<sup>™</sup> (version 5.0) and GraphPad QuickCals software (<http://www.graphpad.com/quickcals/>).

### 3. Results

#### 3.1 Selection of phage clones by affinity in *T. vivax* sera.

Positive selection of phage clones was realized by the acceptance of bovine sera antibody samples experimentally infected by the protozoan. Figure 1 represents schematically a resumed protocol for the three steps of biopanning cycles (Incubation, elution and amplification) until the phage selection following analyses. Coming out of previous step, 25 clones were randomly selected and had their sequence amplified and identified by PCR, as shown in Table I.

#### 3.2 Diagnostic potential of selected phage clones.

Diagnostic potential of 25 phage clones selected was evaluated by a phage-ELISA, measuring the reactivity of the phage to sera from infected animals. Parameters that best represent the performance of phages in diagnosis are sensitivity, specificity and accuracy (Table 1), generated from the ELISA assays and ROC curve of each peptide (Figures S1-5). Should be noted that, of the 25 phages selected, fifteen (P1 to P15) presented sensitivity equal to 100%. Among selected 15 clones, only P2, P7, P14 and P15 did not present specificity value and maximum accuracy. Thus, eleven phages were able to accurately and differentiate sera from infected animals of control animals. We can note that phages present highly accurate ROC curves, AUC = 1.0, and significant statistical data ( $p < 0.0001$ ), calculated from unpaired T-test between uninfected and infected samples.

#### 3.3 Epitope mapping in the *T. vivax* genome

Thereupon, after selecting phages with highest diagnostic potential, proteome of *Trypanosoma vivax* was mapped in search of recombinant proteins. We searched for molecules containing in their amino acid sequence regions of high similarity to those of the selected phages. Results of mapping are shown in Table 2, where NCBI codes of each found protein, coverage relative to the size of the input, identity relative to the similarity to the original sequence, and the predictive score for the region to act as a linear cell epitope B are shown. We can highlight P5 and P6 phage clones, already previously treated as promising, because they have predictive regions with high possibility of acting as epitopes in four different proteins.

Table 3 illustrates the function of proteins mapped and described in Table 2. We note that there are several proteins whose function is well established in the literature, however, most are conserved or partial hypothetical proteins, indicating that these molecules have no similarity to any other already known.

## 4. Discussion

Techniques for diagnosis bovine trypanosomiasis are divided into two groups: detect the parasite and/or its constituents, such as antigens and DNA, in blood samples or those that desired find antibodies produced from the presence of the microorganism (Bossard et al., 2010; Boulangé et al., 2017). Currently available treatments are generalist and non-species-specific tools for each infecting organism. In addition, since no field diagnostic test is available, finding mechanisms that simplify early recognition of the disease becomes a good starting point for further research (Pillay et al., 2013). However, the absence of clinical signs of infection in acute phases makes it difficult to construct a sufficiently sensitive diagnostic model capable of preventing the spread of the disease (Almeida et al., 2012). Thus, this current work describes the process of identification potential peptides by a subtractive phage display strategy to serodiagnosis Bovine Trypanosomiasis.

Over the years, phage display technique has consolidated itself as a powerful tool based on a random library of phage-coupled peptides to seek molecules that bind to specific target. According to McGuire (McGuire et al., 2009), phage display has already been used for recognition of immune, beta-pancreatic, cardiac, tumor and parasite-infected cells with high discrimination between target and negative control. Search for synthetic peptides can provide fast, high-yield, low-cost platforms for immunological tests that rely on linear B-cell epitopes (Carmona et al., 2012). Tetramerization of peptides and increasing rounds of selection reduces the amount of phage available and contributes significantly to increased affinity between peptide and target (McGuire et al., 2009). According to records found to date, no other study has relied on phage display technology to look for molecules to be used in the serodiagnosis of bovine trypanosomiasis.

Gold standard techniques diagnosis of infection by *Trypanosoma vivax* through parasitological means is investigation of blood smears from infected animals. However, besides being a more time-consuming and costly technique, the specificity and accuracy of the method do not allow an accurate classification of the origin and degree of infection (Masake et al., 2002). In contrast, results obtained 15 selected phage clones (P1 to P15), suggest that proposed method is highly sensitive and truly positive individuals were selected. Moreover, within the selected group, 11 phage clones have maximum specificity, meaning that healthy individuals were correctly unselected. Among four dispensed clones, three presented values within an acceptable mean, having P2, P7 and P15 80, 90 and 90% specificity, respectively. For purposes of comparison, one study evaluated the use of parasitological, serological (ELISA) and molecular (PCR) techniques in detection of *T. vivax* (Masake et al., 2002). Results indicated PCR and combined PCR-ELISA were able to discriminat between 93 and 94% of infection cases, respectively. In parasitological tests, efficiency of method only approached 63%. As shown in Table 2, four proteins (CCC51833.1; CCC49444.1, CCD19908.1 and CCC52526.1) were selected by immunoinformatics techniques by identity analysis, parameter that evaluates similarity of selected protein region to sequence of peptides.

In some studies, the authors search for recombinant proteins that could act as antigens for the diagnosis of bovine trypanosomiasis. GM6, an antigen present in several trypanosome species, was used to detect the disease in field samples, presenting sensitivity and specificity of 91.5 and 91.3%, respectively (Pillay et al., 2013). Another study used a surface glycosylated antigenic protein, known as p64, and obtained a sensitivity of 71.6% and specificity of 98.8% (Uzcanga et al., 2016). These results corroborate in the relevance of our study, since peptides found, besides having maximum detection values, were able to provide multiple strategies of combinations for the production of synthetic proteins.

Peptides differ from proteins when used as diagnostic antigens because in their sequence there is differentiation between peptides that are able to interact better with antibodies. As note in Table 2, prediction of linear epitopes of B cells was made, however, more than 90% of epitopes from phage display are conformational. This fact becomes an advantage of the method, since it recovers peptides that mimic the conformational epitopes (mimotopes).

Although it was shown to be a promising mechanism for detection of antibodies anti-*T. vivax*, difficulty to identifying regions in which antigen recognizes the binding site of B-cell epitope represents a major disadvantage of use peptides (Carmona et al., 2012). Consequently, we searched for proteins with regions of high similarity with those selected peptides. In addition, we sought proteins with a minimum predictive score (threshold > 0.9) capable of filtering molecules with high antigenic capacity in regions of phage identity.

In Table 3, function of each proteins found in Table 2 are demonstrated. Among the four proteins selected, it is worth mentioning three of them are hypothetical proteins and, consequently, do not have described and/or related functions. Thereby, seeking to relate the function of the protein to its immunogenic potential is no longer applicable. However, CCC46909.1 protein is a diacylglycerol acyltransferase, an enzyme that catalyzes the formation of triglycerides and acts on intestinal absorption and formation of adipose tissue, and was not expected to have immunogenic potential, at first.

## **5. Conclusion**

This study presents eleven peptides identified by phage display that are potential antigens for the diagnosis of bovine trypanosomiasis. We emphasize the need of additional studies about immunogenicity of predicted proteins or even the combination of selected peptides to form a chimeric protein may contribute to establishment of a more accurate, adaptive diagnostic method for the conditions of endemic areas and for further development of strategies for large-scale production of diagnostic tests.

## **Acknowledgments**

EAFC and DM-S thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, for their fellowships. This work was supported by grants from PRPq/UFMG (87-05/2016) and CAPES (23038.004862/2015-74).

## References

- Almeida, K.D.S., Costa, A.F., Silva, P.C. Da, Fagliari, J.J., Machado, R.Z., Nascimento, A.A. Do, 2012. Acute phase proteins: a potential approach for diagnosing chronic infection by *Trypanosoma vivax*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 21, 97–100.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.
- Aquino, L.P.C., Machado, R.Z., Lemos, K.R., Marques, L.C., Garcia, M.V., Borges, G.P., 2010. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 2, p. 112-118.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., 2005. GenBank. *Nucleic acids research* 33, D34-38.
- Bezerra, F.S., Batista, J.S., 2008. *Trypanosoma vivax* in testicular and epididymal tissues of experimentally infected sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, p. 575-582.
- Bittar, J.F., Bassi, P.B., Moura, D.M., Garcia, G.C., Martins-Filho, O.A., Vasconcelos, A.B., Costa-Silva, M.F., Barbosa, C.P., Araujo, M.S., Bittar, E.R., 2015. Evaluation of parameters related to libido and semen quality in Zebu bulls naturally infected with *Trypanosoma vivax*. *BMC veterinary research* 11, 261.
- Bossard, G., Boulange, A., Holzmüller, P., Thévenon, S., Patrel, D., Authie, E., 2010. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis based on HSP70/BiP inhibition ELISA. *Vet. Parasitol.* 173, 39–47.
- Boulangé, A., Pillay, D., Chevtzoff, C., Biteau, N., Comé de Graça, V., Rempeters, L., Theodoridis, D., Baltz, T., 2017. Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Vet. Parasitol.* 233, 32–38.
- Carmona, S.J., Sartor, P.A., Leguizamón, M.S., Campetella, O.E., Agüero, F., 2012. Diagnostic Peptide Discovery: Prioritization of Pathogen Diagnostic Markers Using Multiple Features. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050748>
- Carvalho, A.U., Abrão, D.C., Facury Filho, E.J., Paes, P.R.O., Ribeiro, M.F.B, 2008. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, p.769–771.
- Costa, L.E., Lima, M.I., Chavez-Fumagalli, M.A., Menezes-Souza, D., Martins, V.T., Duarte, M.C., Lage, P.S., Lopes, E.G., Lage, D.P., Ribeiro, T.G., Andrade, P.H., de Magalhaes-Soares, D.F., Soto, M., Tavares, C.A., Goulart, L.R., Coelho, E.A.,

2014. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clinical and vaccine immunology* : CVI 21, 96-106.
- Dávila, A. M. R., Herrera, H.M, Schlebinger, T., Souza, S.S., Traubcseko, Y.M., 2003. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. *Brazilian Veterinary Parasitology*, v.117, p.1–13.
- Eisler, M.C., Lessard, P., Masake, R.A., Mooloo, S.K., Peregrine, A.S., 1998. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 79, p. 187-201.
- Fack, F., Hügler-Dörr, B., Song, D., Queitsch, I., Petersen, G., Bautz, E.K.F., 1997. Epitope mapping by phage display: Random versus gene-fragment libraries. *J. Immunol. Methods* 206, 43–52.
- Gardiner, P.R., 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*, 28, 229-317.
- Gish, W., States, D.J., 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature genetics* 3, 266-272.
- Greif, G., Ponce de Leon, M., Lamolle, G., Rodriguez, M., Pineyro, D., Tavares-Marques, L.M., Reyna-Bello, A., Robello, C., Alvarez-Valin, F., 2013. Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC genomics* 14, 149.
- He, Y., Wang, Y., Struble, E.B., Zhang, P., Chowdhury, S., Reed, J.L., Kennedy, M., Scott, D.E., Fisher, R.W., 2012. Epitope mapping by random peptide phage display reveals essential residues for vaccinia extracellular enveloped virion spread. *Virology* 453, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.017>
- Hoare, C. A, 1972. *The Trypanosomoses of mammals*, Oxford: Blackwell, 749p.
- Larsen, J.E., Lund, O., Nielsen, M., 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research* 2, 2.
- Linnet, K., Bossuyt, P.M., Moons, K.G., Reitsma, J.B., 2012. Quantifying the accuracy of a diagnostic test or marker. *Clinical chemistry* 58, 1292-1301.
- Madruga, C.R., Araújo, F.R., Cavalcante-Goes, G., Martins, C., Pfeifer, I.B., Ribeiro, L.R., Kessler, R.H., Soares, C.O., Miguita, M., Melo, E.P.S., Almeida, R.F.C., Lima, M.M.S.C., 2006. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 801–807.
- Magona, J.W., Mayende J.S., Olaho-Mukani, W., Coleman, P.G., Jonsson, N.N., Welburn, S.C., Eisler, M.C., 2003. A comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research*., v.70, 213-218.

- Manoutcharian, K., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodrigues, M. Govezensky, T., 1999. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect Immun*, 67,4764-4770.
- Masake, R.A., Njuguna, J.T., Brown, C.C., Majiwa, P.A.O., 2002. The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. *Vet. Parasitol.* 105, 179–189.
- Mattioli, R.C., Faye, J.A., Jaitner, J., 2001. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. *Vet Parasitol*, 95, 25–35.
- Mcguire, M.J., Li, S., Brown, K.C., 2009. *Biosensors and Biodetection* 504, 1–28.
- Murray, M., Murray, P.K., McIntyre, W.I., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 325-326.
- Noya, O., Patarroyo, M.E., Guzmán, F., Alarcón de Noya, B., 2003. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 299–308.
- Osório, A.L.A.R., Madruga, C.R., Desquesnes, M., Soares, C.O., Ribeiro, L.R.R., Costa, S.C.G. Da, 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 1–13.
- Pillay, D., Izotte, J., Fikru, R., Büscher, P., Mucache, H., Neves, L., Boulangé, A., Seck, M.T., Bouyer, J., Napier, G.B., Chevtzoff, C., Coustou, V., Baltz, T., 2013. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. *PLoS One* 8, 1–10.
- Rebeski, D.E., Winger, E.M., Rogovic, B., Robinson, M.M., Crowther, J.R., Dwinger, R.H., 1999. Improved Methods for the Diagnosis of African Trypanosomosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 249–253.
- Silva, R.A.M.S., Seidl, A., Ramirez, L., Dávila, A.M.R., Davila, A.M.R., Dávila, A.M.R., 2002. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia , Diagnóstico e Controle. 2002 135.
- Silva, A.S. Da, Costa, M.M., Polenz, M.F., Polenz, C.H., Teixeira, M.M.G., Lopes, S.T.D.A., Monteiro, S.G., 2009. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 39, 2550–2554.
- Toledo-Machado, C.M., Bueno, L.L., Menezes-Souza, D., Machado-de-Avila, R.A., Nguyen, C., Granier, C., Bartholomeu, D.C., Chavez-Olortegui, C., Fujiwara, R.T., 2015. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. *Parasites & vectors* 8, 133.

- Toledo-Machado, C.M., De Avila, R.A.M., Nguyen, C., Granier, C., Bueno, L.L., Carneiro, C.M., Menezes-Souza, D., Carneiro, R.A., Chávez-Olórtegui, C., Fujiwara, R.T., 2015. Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. *Biomed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/401509>
- Uzcanga, G.L., Pérez-Rojas, Y., Camargo, R., Izquier, A., Noda, J.A., Chacín, R., Parra, N., Ron, L., Rodríguez-Hidalgo, R., Bubis, J., 2016. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. *Vet. Parasitol.* 218, 31–42.
- Ventura, R.M., Paiva, F., Silva, R.A.M.S., Takeda, G.F., Buck, G.A., Teixeira, M.M.G., 2001. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp. Parasitol.* 99, 37–48.
- Woo, P. T. K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. *Acta Tropica, Basel*, 27, 384–386.

## Figure legends

**Figure 1.** Representative biopanning workflow steps for selection of phages with high target affinity to IgG anti-*T. vivax*.

## Table legends

**Table 1.** Diagnostic performance of phage clones to diagnose bovine trypanosomiasis.

**Table 2.** Mapping of phage protein sequences in predicted proteins from *T. vivax* genome.

**Table 3.** Function of *T. vivax* proteins with similarity to phage peptides.

## Supplementary information

**Figure S1.** Comparison of ELISA reactivity of *T. vivax* infected and non-infected sera and ROC curve of test performance. ELISA was performed in different groups of individuals: groups negative (non-infected, n=10) and positive for bovine trypanosomiasis (*T. vivax* infected, n=12). The anti-peptides (P1-5) reactivity between groups were compared by unpaired Student t-test. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ , highlighted by connecting lines. Cut-offs were determined by ROC curves.

**Figure S2.** Comparison of ELISA reactivity of *T. vivax* infected and non-infected sera and ROC curve of test performance. ELISA was performed in different groups of individuals: groups negative (non-infected, n=10) and positive for bovine trypanosomiasis (*T. vivax* infected, n=12). The anti-peptides (P6-10) reactivity between groups were compared by unpaired Student t-test. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ , highlighted by connecting lines. Cut-offs were determined by ROC curves.

**Figure S3.** Comparison of ELISA reactivity of *T. vivax* infected and non-infected sera and ROC curve of test performance. ELISA was performed in different groups of individuals: groups negative (non-infected, n=10) and positive for bovine trypanosomiasis (*T. vivax* infected, n=12). The anti-peptides (P11-15) reactivity between groups were compared by unpaired Student t-test. The differences were considered statistically significant at  $p<0.05$ , highlighted by connecting lines. Cut-offs were determined by ROC curves.

**Figure S4.** Comparison of ELISA reactivity of *T. vivax* infected and non-infected sera and ROC curve of test performance. ELISA was performed in different groups of individuals: groups negative (non-infected, n=10) and positive for bovine trypanosomiasis (*T. vivax* infected, n=12). The anti-peptides (P16-20) reactivity between groups were compared by unpaired Student t-test. The differences were considered statistically significant at  $p<0.05$ , highlighted by connecting lines. Cut-offs were determined by ROC curves.

**Figure S5.** Comparison of ELISA reactivity of *T. vivax* infected and non-infected sera and ROC curve of test performance. ELISA was performed in different groups of individuals: groups negative (non-infected, n=10) and positive for bovine trypanosomiasis (*T. vivax* infected, n=12). The anti-peptides (P21-25) reactivity between groups were compared by unpaired Student t-test. The differences were considered statistically significant at  $p<0.05$ , highlighted by connecting lines. Cut-offs were determined by ROC curves.

**Table 1.** Diagnostic performance of phage clones to diagnose bovine trypanosomiasis.

Phage Code	Phage Sequence	Cut-off*	Parameters <sup>a</sup>				<i>p</i> -value <sup>b</sup>
			Sensitivity (CI 95)(%)	Specificity (CI 95)(%)	Accuracy (%)	AUC (CI 95)(%)	
P1	PRSTSHL	0.1919	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P2	LYHDTHY	0.1742	100.00 (73.54-100.00)	80.00 (44.39-97.48)	90.90	0.91 (0.77-1.05)	<i>p</i> = 0.0002
P3	NPFCGSR	0.1740	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P4	FGAPVSL	0.1624	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P5	TSPPLHA	0.2952	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P6	QSTSGSS	0.2251	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P7	TFSPLSV	0.2164	100.00 (73.54-100.00)	90.00 (55.50-99.75)	95.45	0.99 (0.97-1.02)	<i>p</i> < 0.0001
P8	FPHLSRY	0.1627	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P9	NPFLADP	0.0337	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P10	ALTPQLL	0.0844	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P11	MSPTYLL	0.0309	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P12	FPLFGLS	0.0251	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P13	DRAALSL	0.0182	100.00 (73.54-100.00)	100.00 (69.15-100.00)	100.00	1.00 (1.00-1.00)	<i>p</i> < 0.0001
P14	DLCTQIT	0.0647	100.00 (73.54-100.00)	60.00 (26.24-87.84)	81.81	0.77 (0.55-0.98)	<i>p</i> = 0.0378
P15	GSRSYPR	0.0682	100.00 (73.54-100.00)	90.00 (55.50-99.75)	95.45	0.95 (0.85-1.05)	<i>p</i> < 0.0001
P16	VQSWSVR	0.0973	75.00 (42.81-94.51)	60.00 (26.24-87.84)	68.18	0.67 (0.43-0.90)	<i>p</i> = 0.1985
P17	SPDSLFP	0.0843	75.00 (42.81-94.51)	90.00 (55.50-99.75)	81.81	0.84 (0.66-1.02)	<i>p</i> = 0.0076
P18	PQDPKQW	0.0853	66.67 (34.89-90.08)	90.00 (55.50-99.75)	77.27	0.87 (0.72-1.03)	<i>p</i> = 0.0022
P19	PSPSRFP	0.1069	66.67 (34.89-90.08)	90.00 (55.50-99.75)	77.27	0.84 (0.67-1.01)	<i>p</i> = 0.0076
P20	DSAFRLK	0.1015	100.00 (73.54-100.00)	80.00 (44.39-97.48)	90.90	0.92 (0.82-1.04)	<i>p</i> = 0.0002
P21	AETVESC	0.1147	83.33 (51.59-97.91)	100.00 (69.15-100.00)	90.90	0.97 (0.92-1.03)	<i>p</i> = 0.0002
P22	VYSALVE	0.1094	58.33 (27.67-84.83)	90.00 (55.50-99.75)	72.72	0.85 (0.70-1.02)	<i>p</i> = 0.0026
P23	GYSALVE	0.1340	83.33 (51.59-97.91)	100.00 (69.15-100.00)	90.90	0.92 (0.79-1.06)	<i>p</i> = 0.0009
P24	DRRGYGL	0.1050	66.67 (34.89-90.08)	80.00 (44.39-97.48)	72.72	0.77 (0.57-0.97)	<i>p</i> = 0.0348

<b>P25</b>	<b>ACFDGVF</b>	0.0955	83.33 (51.59-97.91)	70.00 (34.75-93.33)	77.27	0.76 (0.54-0.98)	$p = 0.0443$
------------	----------------	--------	---------------------	---------------------	-------	------------------	--------------

---

<sup>a</sup>Parameters was calculated using all samples presented in this work (non-infected and *T. vivax*-infected).

<sup>b</sup>Unpaired t-test to compare means of non-infected and *T. vivax*-infected groups.

\*Cut-off obtained by ROC curve.

Abbreviations: CI: confidence interval; AUC: area under curve.

**Table 2.** Mapping of phage protein sequences in predicted proteins from *T. vivax* genome.

Phage Code	Phage peptide sequence	NCBI protein ID	Query Cover	Identity	<i>T. vivax</i> peptide sequence*	Initial coordinate	Final coordinate	Epitope prediction (score)	RNA level (RPKM) in trypomastigotes
P1	PRSTSHL	CCC48034.1	100%	86%	PQSTSHL	53	59	PQST--- (1.552)	20.49
		CCC46635.1	100%	86%	PRSQSHL	776	782	PR----- (1.3615)	37.38
		CCC49077.1	100%	86%	PRSRSHL	785	791	PRS---- (1.5373)	18.08
P2	LYHDTHY	CCC51335.1	100%	71%	LYEDTQY	136	142	-	39.34
P3	NPFCGSR	CCC47882.1	100%	71%	DPFCGRR	117	123	-	14.59
P4	FGAPVSL	CCC52531.1	100%	88%	FGAPLVSL	113	120	-	17.78
		CCC49152.1	100%	86%	FGQPVSL	315	321	-	17.96
		CCC49149.1	100%	86%	FGQPVSL	314	320	-	20.28
P5	TSPPLHA	CCC51833.1	100%	86%	TPPLHA	102	108	TPPPL-- (1.8474)	35.6
		CCC49444.1	100%	86%	TSPPRHA	1688	1694	TSPPRHA (2.006)	21.26
P6	QSTSGSS	CCD19908.1	100%	100%	QSTSGSS	213	219	QSTSG-- (1.8774)	5.19
		CCC52526.1	100%	86%	QETSGSS	373	379	QETSGSS (1.7307)	14.73
P7	TFSPLSV	CCD21738.1	100%	86%	TFSPQSV	570	576	-	10.76
		CCC46909.1	100%	86%	TFIPLSV	180	186	-	20.79
P8	FPHLSRY	CCC53665.1	100%	71%	YPHLNRY	237	243	-	23.19
		CCC54210.1	100%	71%	FPHLAPY	554	560	-	28.05
		CCC49942.1	100%	71%	FAYLSRY	116	122	-	23.24
		CCC49646.1	100%	71%	FPDLSHY	113	119	-	20.54
P9	NPFLADP	-	-	-	-	-	-	-	
P10	ALTPQLL	CCD21345.1	100%	71%	ALTAQLM	748	754	-	7.35
		CCC52718.1	100%	71%	AIAPQLL	163	169	-	15.94
P11	MSPTYLL	CCC47119.1	100%	86%	MSPSYLL	106	112	M----- (1.153)	17.57
		CCC49982.1	100%	71%	LSPSYLL	159	165	-	36.72
		CCC49677.1	100%	71%	MARTYLL	1000	1006	-	16.94
P12	FPLFGLS	CCC48431.1	100%	86%	FPLFQLS	1202	1208	-	14.07
		CCD19296.1	100%	86%	FPLSGLS	5	11	-	18.16
		CCC53502.1	100%	71%	FSIFGLS	506	512	-	10.35
		CCD18084.1	100%	71%	FPMLGLS	477	483	-	42.98
		CCD19712.1	100%	71%	FSLFSL	341	347	-	20.26
CCC51989.1	100%	71%	FSLFSL	194	200	-	12.78		
P13	DRAALSL	CCC49495.1	100%	86%	ERAALSL	22	28	ER----- (1.0625)	41.33
		CCC49036.1	100%	86%	DRAALQL	579	585	-	24.53
		CCC48065.1	100%	86%	DMAALSL	1327	1333	-	17.68
		CCC48540.1	100%	71%	DRSSL	95	101	-	13.43
		CCD18528.1	100%	71%	ERAALSM	16	22	-	11.66

		CCC53799.1	100%	71%	ERAAISL	474	480	-	11.74
<b>P14</b>	<b>DLCTQIT</b>	CCC50029.1	100%	71%	DLCASIT	400	406	-	17.15
		CCC52735.1	100%	86%	GSRSQPR	480	486	GSRSQPR (1.4698)	17.03
<b>P15</b>	<b>GSRSYPR</b>	CCC46776.1	100%	71%	GSRPCPR	1333	1339	RPCPR (1.1764)	24.31
		CCC53956.1	100%	71%	GSVNYPR	379	385	-	18.67
		CCC50050.1	100%	71%	GSSVYPR	288	294	YPR (1.1183)	15.48
<b>P16</b>	<b>VQSWSVR</b>	CCC46639.1	100%	86%	VQSLSVR	1554	1560	-	20.36
		CCD18696.1	100%	86%	VQSLSVR	137	143	-	4.04
		CCD20722.1	100%	71%	VRKWSVR	62	68	-	23.43
<b>P17</b>	<b>SPDSLFP</b>	CCC47384.1	100%	71%	SPQKLF	583	589	S----- (1.092)	16.24
		CCC51526.1	100%	71%	SSNSLFP	856	862	-	14.71
		CCC50202.1	100%	71%	SSASLFP	39	45	-	22.13
<b>P18</b>	<b>PQDPKQW</b>	-	-	-	-	-	-	-	
<b>P19</b>	<b>PSPSRFP</b>	CCC54313.1	100%	86%	PSPSRSP	785	791	PSRSP (1.5872)	14.68
		CCC48016.1	100%	71%	PSAARFP	15	21	-	33.9
		CCC52276.1	100%	71%	PAPSSF	524	530	PAPSSF (1.6685)	19.82
		CCC53034.1	100%	71%	PTPSFP	214	220	PTPSFP (1.6932)	24.52
<b>P20</b>	<b>DSAFRLK</b>	CCC53794.1	100%	71%	DSGFRVK	115	121	-	19.0
		CCC48437.1	100%	71%	DPIFRLK	125	131	-	12.6
		CCC52697.1	100%	71%	DSVLRK	184	190	-	37.96
<b>P21</b>	<b>AETVESC</b>	CCC53168.1	100%	71%	AEAVEAC	484	490	-	31.22
		CCC50844.1	100%	71%	AETVQRC	646	652	-	38.39
		CCC48244.1	100%	71%	AETVNNC	1005	1011	-	11.79
<b>P22</b>	<b>VYSALVE</b>	CCC51432.1	100%	86%	VYSQVE	313	319	-	37.88
		CCC50426.1	100%	86%	VYSYVE	336	342	-	17.31
		CCC47971.1	100%	71%	VYSELVD	535	541	-	23.31
		CCC47860.1	100%	71%	IYNALVE	322	328	-	25.31
<b>P23</b>	<b>GYSALVE</b>	CCC50347.1	100%	71%	GYPTLVE	68	74	-	21.90
		CCC47351.1	100%	71%	GYAAFVE	984	990	-	22.05
		CCC49376.1	100%	71%	GYKAVVE	286	292	-	13.34
<b>P24</b>	<b>DRRGYGL</b>	CCC53461.1	100%	71%	DRSTYGL	379	385	-	17.28
		CCC49297.1	100%	71%	DRRHFGL	458	464	-	9.47
<b>P25</b>	<b>ACFDGVF</b>	CCC48332.1	100%	86%	AC-DGVF	216	221	-	32.26

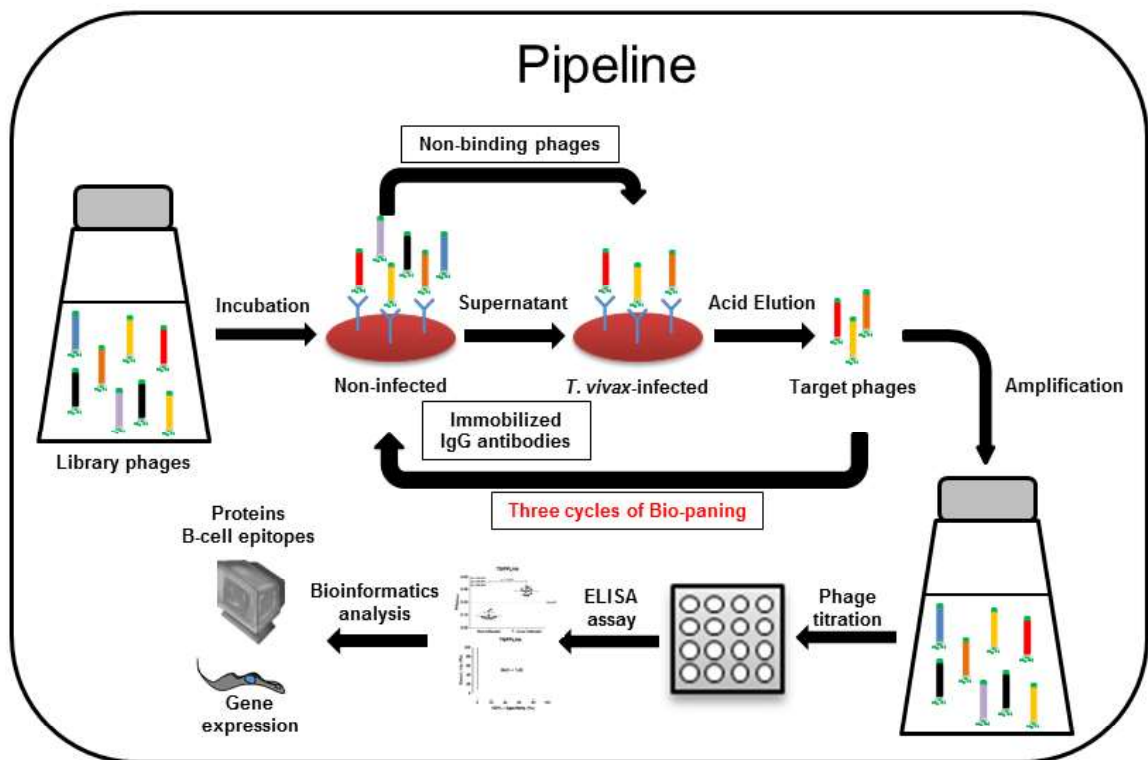
\* Red letters represent polymorphic amino acids compared to phage sequence.

**Table 3.** Function of *Trypanosoma vivax* proteins with similarity to phage peptides.

Phage peptide sequence	NCBI protein ID	Protein function
PRSTSHL	CCC48034.1	conserved hypothetical protein
	CCC46635.1	conserved hypothetical protein
	CCC49077.1	putative DNA excision repair protein
LYHDTHY	CCC51335.1	putative SNF-7-like protein
NPFCGSR	CCC47882.1	hypothetical protein, unlikely
FGAPVSL	CCC52531.1	conserved hypothetical protein, fragment
	CCC49152.1	conserved hypothetical protein
	CCC49149.1	conserved hypothetical protein, fragment, partial
TSPPLHA	CCC51833.1	hypothetical protein, unlikely
	CCC49444.1	conserved hypothetical protein, fragment
QSTSGSS	CCD19908.1	hypothetical protein, conserved, partial
	CCC52526.1	conserved hypothetical protein
TFSPLSV	CCD21738.1	hypothetical protein, conserved in <i>T.vivax</i>
	CCC46909.1	putative diacylglycerol acyltransferase
FPHLSRY	CCC53665.1	conserved hypothetical protein
	CCC54210.1	putative intergrin alpha chain protein
	CCC49942.1	putative cullin
	CCC49646.1	conserved hypothetical protein, fragment, partial
NPFLADP	-	-
ALTPQLL	CCD21345.1	hypothetical protein, conserved, partial
	CCC52718.1	conserved hypothetical protein
MSPTYLL	CCC47119.1	conserved hypothetical protein
	CCC49982.1	conserved hypothetical protein
	CCC49677.1	conserved hypothetical protein
FPLFGLS	CCC48431.1	conserved hypothetical protein, fragment
	CCD19296.1	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i> , partial
	CCC53502.1	putative helicase-like protein
	CCD18084.1	hypothetical protein
	CCD19712.1	hypothetical protein, conserved
	CCC51989.1	conserved hypothetical protein
DRAALSL	CCC49495.1	hypothetical protein, unlikely
	CCC49036.1	conserved hypothetical protein
	CCC48065.1	conserved hypothetical protein
	CCC48540.1	conserved hypothetical protein
	CCD18528.1	hypothetical protein, conserved, partial
CCC53799.1	conserved hypothetical protein	
DLCTQIT	CCC50029.1	putative DNA repair protein
GSRSYPR	CCC52735.1	conserved hypothetical protein
	CCC46776.1	conserved hypothetical protein
	CCC53956.1	conserved hypothetical protein, fragment, partial
	CCC50050.1	conserved hypothetical protein
VQSWSVR	CCC46639.1	conserved hypothetical protein
	CCD18696.1	hypothetical protein, conserved
	CCD20722.1	hypothetical protein, conserved, partial
SPDSLFP	CCC47384.1	putative ubiquitin-protein ligase
	CCC51526.1	conserved hypothetical protein
	CCC50202.1	putative metallopeptidase
PQDPKQW	-	-
PSPSRFP	CCC54313.1	conserved hypothetical protein
	CCC48016.1	putative protein kinase
	CCC52276.1	conserved hypothetical protein
	CCC53034.1	conserved hypothetical protein
DSAFRLK	CCC53794.1	conserved hypothetical protein
	CCC48437.1	conserved hypothetical protein
	CCC52697.1	putative T-complex protein 1, beta subunit
AETVESC	CCC53168.1	putative protein transport protein Sec31
	CCC50844.1	putative ubiquitin-protein ligase, fragment
	CCC48244.1	conserved hypothetical protein
VYSALVE	CCC51432.1	putative GPI inositol deacylase precursor
	CCC50426.1	conserved hypothetical protein
	CCC47971.1	putative kinesin

	CCC47860.1	putative threonyl-tRNA synthetase
GYSALVE	CCC50347.1	conserved hypothetical protein
	CCC47351.1	putative coatomer alpha subunit
	CCC49376.1	putative NADH dehydrogenase
	CCC53461.1	putative serine/threonine protein kinase
DRRGYGL	CCC49297.1	conserved hypothetical protein
	CCC48332.1	putative phosphatase 2C
ACFDGVF		

Figure 1



Supplementary information

Figure S1

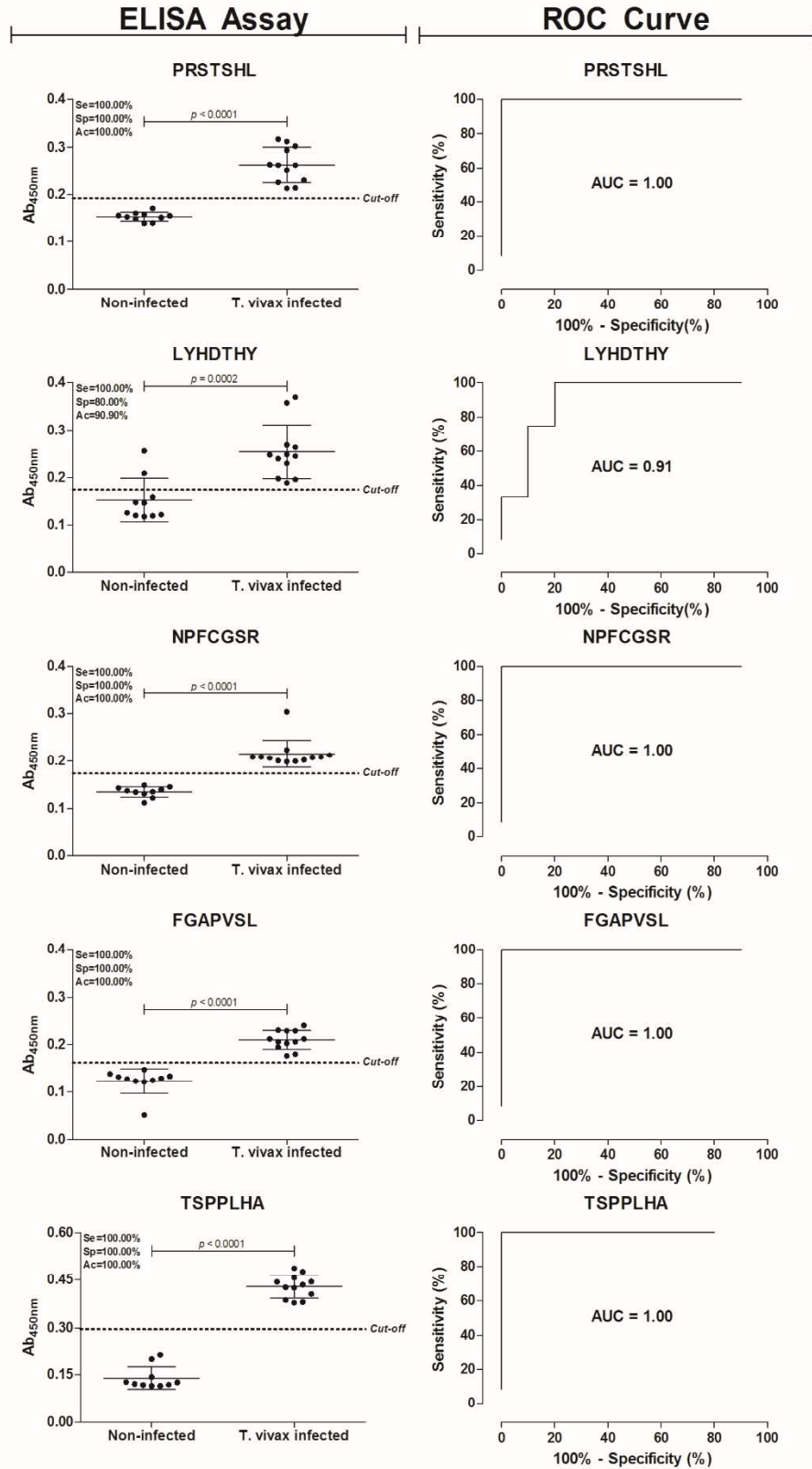


Figure S2

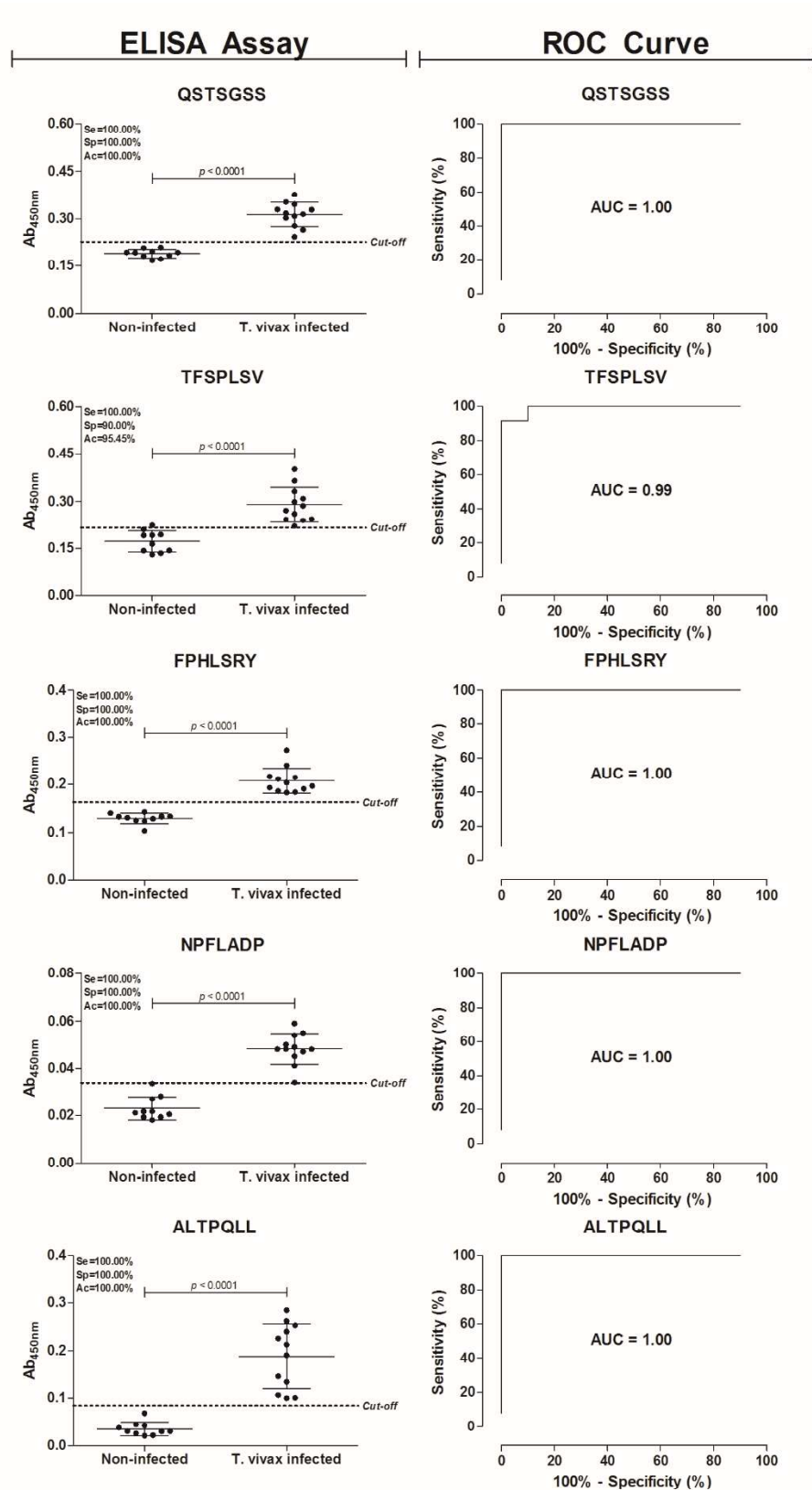


Figure S3

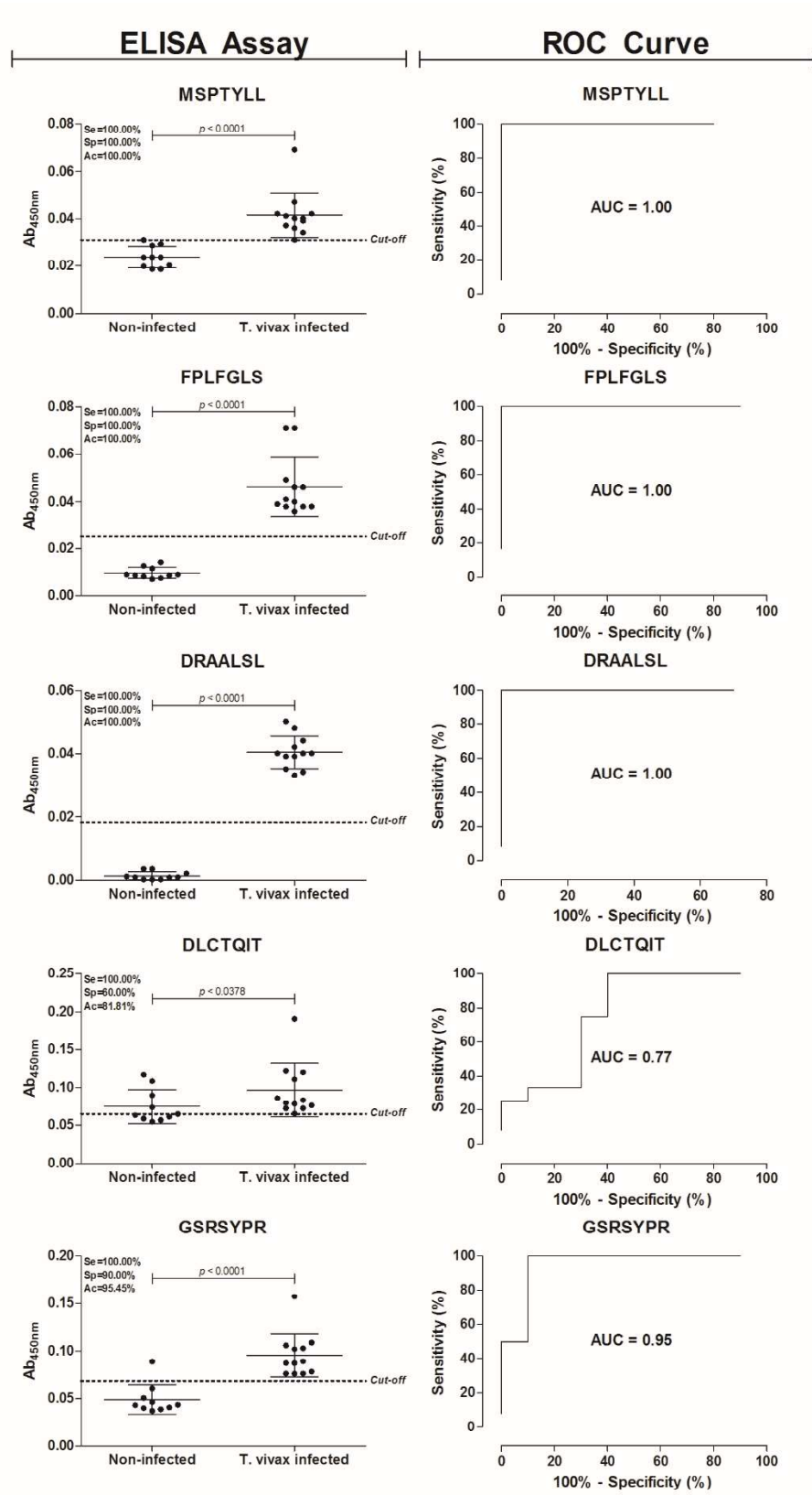


Figure S4

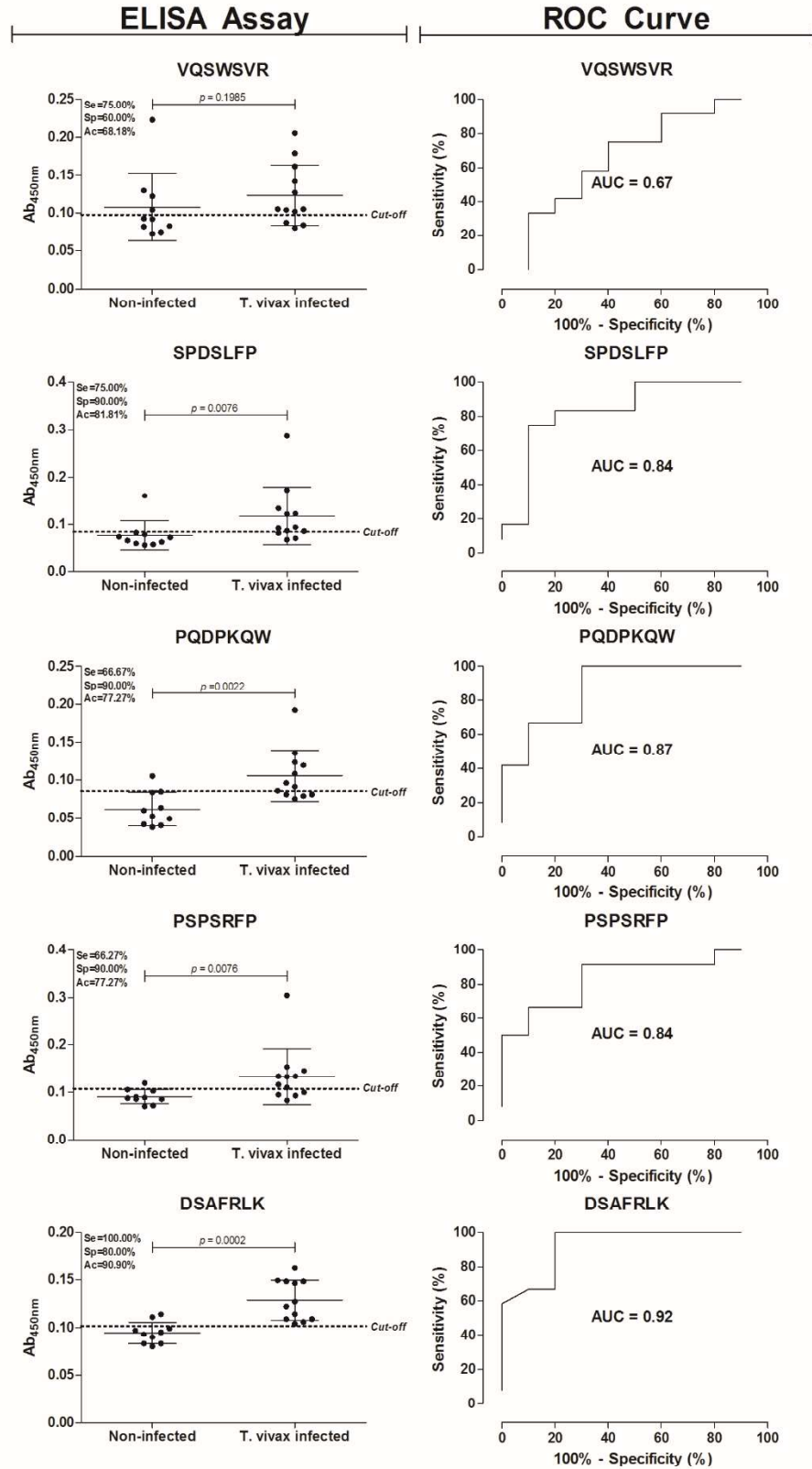
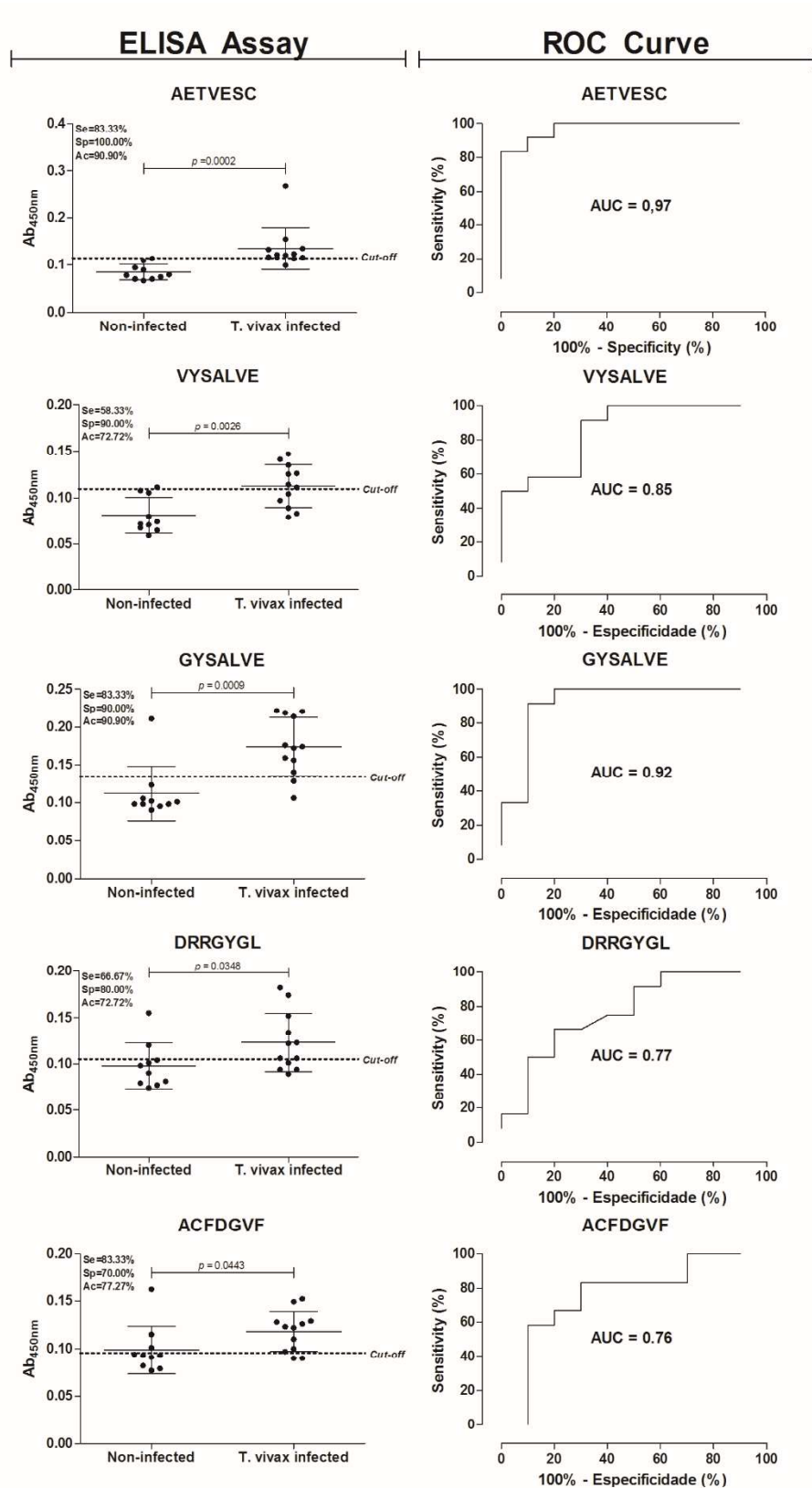


Figure S5



## 5. Capítulo 2

### 5.1. Introdução

Doenças que acometem os animais no ambiente pecuário atingem toda a população humana em seu entorno, impactando diretamente sobre fatores econômicos, aumentando a incidência de morte na população no caso de doenças zoonóticas, e comprometendo toda a estrutura de produção agrícola (Silva, 2002). A tripanossomíase é uma doença que acomete humanos e bovinos, tendo sua principal incidência no continente africano, onde atinge cerca de 45 mil pessoas por ano (Baral, 2010). As tripanossomoses estão listadas entre as 20 doenças que têm influência direta nos níveis de pobreza da população (Silva, 2002).

A tripanossomíase animal pode ser causada por um número maior de espécies de parasitos e é uma das maiores epidemias do continente americano (Baral, 2010). Protozoários como *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* e *T. vivax* são os principais responsáveis pelas infecções em animais, sendo último o mais agressivo, podendo levar o animal a quadros de febre hemorrágica e perda de peso (Osório, 2008; Fleming, 2016). O curso de uma infecção por tripanossomose varia consideravelmente e depende das espécies de tripanosoma e do hospedeiro envolvido (Osório, 2008). Existem duas maneiras diferentes de se transmitir a doença ao animal: a transmissão cíclica, em que o vetor biológico é a mosca tsé-tsé, que ocorre de maneira mais recorrente em países africanos e a transmissão mecânica, que se dá através de moscas hematófagas, como *Stomoxys* sp. e *Tabanus* sp., que acometem em maior proporção os rebanhos da América do Sul e Ásia (Batista, 2007; Batista, 2012; Dagnachew, 2014; Bastos, 2017). Por meio da transmissão mecânica a doença foi disseminada em várias regiões onde não há presença do vetor biológico, como América Central e do Sul (Fleming, 2016).

Apesar de demonstrar alguns sintomas em animais infectados em fase aguda, a sintomatologia da tripanossomíase bovina é inespecífica e em muito dos casos se torna uma doença silenciosa, corroborando para um diagnóstico e tratamento incorretos (Boulangé, 2017). As principais técnicas utilizadas para o diagnóstico ainda se baseiam na sintomatologia ou na detecção dos parasitos em esfregaços sanguíneos (Pillay, 2013). Como uma alternativa aos métodos parasitológicos, técnicas moleculares e imunológicas se inseriram no contexto da tripanossomíase na esperança de se obter um diagnóstico mais sofisticado. Entre as técnicas moleculares, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) que fornece resultados altamente específicos e com sensibilidade semelhante às

técnicas parasitológicas (Almeida, 2012). Contudo, os mecanismos moleculares demandam tecnologias onerosas e de uso técnico mais exigente relativo à manipulação das amostras e equipamentos (Bossard, 2010). Desenvolver um teste de diagnóstico capaz de atuar de maneira simples e direta melhoraria o tratamento e a remediação da infecção (Boulangé, 2017).

Análises sorológicas são ferramentas úteis para detecção de anticorpos anti-tripanosoma em estudos epidemiológicos de grande escala, facilitando campanhas de controle da doença (Bossard, 2010). O desenvolvimento de mecanismos para a detecção de diferentes estágios da doença depende da disponibilidade de ligantes de alta afinidade e especificidade para o tipo de alvo desejado, sendo em muito dos casos este o fator limitante (McGuire, 2009). Como medida alternativa, diversas proteínas recombinantes se apresentam como recurso propício para diagnóstico de doenças infecciosas. Em um estudo fusionou-se sequências de DNA responsáveis pela expressão diferentes proteínas preditas com alto potencial antigênico, produzindo assim proteínas quiméricas compostas de alto conteúdo de epítomos altamente capazes de reconhecer o alvo em testes sorológicos (Aguirre, 2006).

## 5.2. Materiais e Métodos

### 4.2.1 - Seleção dos peptídeos reativos por *phage display*

A seleção dos peptídeos reativos pela técnica *phage display* foi feita a partir dos resultados do capítulo anterior, em que se levou em conta parâmetros que avaliaram o potencial de diagnóstico de cada peptídeo. Selecionou-se os peptídeos que apresentaram máxima especificidade e sensibilidade, além de mimetizar potenciais epítomos lineares de célula B em proteínas do genoma de *T. vivax*.

### 4.2.2 - Extração de regiões codificadoras por PCR

A amplificação da região codificadora referente às sequências de proteínas a serem expressas em *Escherichia coli* foi realizada utilizando aproximadamente 100 ng de DNA de *T. vivax*, 0,5 mM dos iniciadores (Tabela 1) e a enzima *GoTaq* DNA polimerase, perfazendo um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador primeiramente a 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial e alternando em um total de 35 ciclos a temperatura de 95°C por 1 minuto para desnaturação, 55° C por 40 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, seguido por um passo de extensão a

72°C por 7 min. Em seguida, o sistema de amplificação obtido foi submetido à separação em gel de agarose 1% a 100 volts em tampão TAE 1X (4,8 g/L Tris-base pH 8,0, 1,14 mL ácido acético glacial e 2 mL EDTA 0,5 M), contendo brometo de etídio (0,3 µg/µL). Após a separação em gel de agarose, as bandas de tamanho esperado foram excisadas, utilizando uma lâmina de bisturi e o bloco de agarose obtido foi submetido à purificação do DNA amplificado utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega) para obtenção do DNA purificado. As amostras de DNA purificadas foram dosadas utilizando o equipamento Qubit 3.0 *Fluorometer* (Thermo Fischer Scientific).

**Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação dos genes selecionados.**

Oligonucleotídeo	Sequência
<b>0420_F</b>	GCTAGCATGCGGCGCGTTTTGC
<b>0420_R</b>	CTCGAGTCACGCAACGAACAACAGG
<b>0110_F</b>	GCTAGCATGAGTCGGCTGCACGG
<b>0110_R</b>	CTCGAGTCACACAACGACACTGGAC

#### 4.2.3 - Clonagem dos genes em vetor de expressão pET28a-TEV

Os amplicons purificados na etapa anterior foram inicialmente inseridos no vetor de clonagem pGEM-T *Easy Vector Systems*. Para cada reação de ligação, foi preparado um *mix* contendo 5 µL de *2X Rapid Ligation Buffer*, 1 µL de p-GEM-T *Easy Vector* e 1 µL de T4 DNA Ligase e adicionado em um tubo de 0,2 mL contendo 3 µL de produto de PCR purificado. Após ser homogeneizado, o tubo foi incubado a temperatura de 4°C por 16 horas para ocorrer a reação de ligação e posteriormente armazenado em freezer a -20°C. Na etapa de transformação, 5 µL do produto de ligação foi adicionado a 50 µL de células competentes XL1-Blue previamente armazenadas a -80°C. Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,1 cm, e submetidas a um pulso de 2,50 kV. Após a eletroporação, foram adicionados 250 µL do meio de cultura LB líquido, seguido por incubação durante uma hora a 37°C sob agitação em shaker a 180 rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar 1,5% contendo 50 µg/mL de ampicilina e distribuídos uniformemente pela placa utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas overnight a 37°C.

As colônias positivas foram inoculadas a 3 mL de meio de cultura LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas overnight a 37°C sob agitação em *shaker* a 200 rpm. A partir desta cultura foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Os plasmídeos

contendo os insertos, assim como o vetor de expressão pET28a-TEV foram submetidos a dupla digestão com enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*. A digestão ocorreu a 37 °C em 1 hora de reação. Em seguida as amostras digeridas foram submetidas à separação em gel de agarose, purificadas e dosadas em equipamento Qubit 3.0 *Fluorometer* (Thermo Fischer Scientific). Os insertos e o pET28a-TEV digeridos foram ligados utilizando a enzima T4 DNA Ligase de acordo com recomendações do fabricante. Na etapa de transformação, 5 µL do produto de ligação foi adicionado a 50 µL de células competentes *E. coli Artic Express*, previamente armazenadas a -80°C. Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,1 cm, e submetidas a um pulso de 2,50 kV. Após a eletroporação, foram adicionados 200 µL do meio de cultura LB líquido a cubeta, transferido para tubos de 1,5 mL e incubado durante uma hora a 37°C sob agitação em *shaker* a 200 rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar 1,5% contendo 50 µg/mL de Kanamicina. As colônias foram submetidas à reação de PCR utilizando 0,5 mM de iniciadores específicos para a região T7 do vetor para confirmar a presença do amplicon no sítio de clonagem.

#### 4.2.4 - Expressão das proteínas recombinantes

Para indução da expressão das proteínas recombinantes, colônias de bactérias isoladas em cada sistema de clonagem foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura LB (Kanamicina 50 µg/mL + Gentamicina 25 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, as culturas foram inoculadas em Erlenmeyer de 2000 mL contendo 500 mL de meio LB (Kanamicina 50 µg/mL) e cultivadas até densidade óptica (DO600) de 0,6-0,8 a 30° C sob agitação a 180 rpm. Após atingir a OD desejada, a expressão foi induzida com a adição de 0,4mM de IPTG por 24 horas a 18 °C sob agitação a 200 rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 6000 x g, 30 minutos a 4 °C e em seguida armazenada a -80 °C. Alíquotas da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução da expressão, foram também congeladas para serem utilizadas como controle de expressão.

#### 4.2.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras obtidas nos ensaios de expressão, teste de solubilidade e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 30%. O gel de separação 14% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração

foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8. As amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas tampão de amostra (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2- $\beta$ -mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), pré-aquecidas durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e posteriormente aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e pH 8,3) sob à voltagem constante de 120 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 12-16 horas com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) e em seguida descorados em solução etanol 30% e ácido acético 10%.

#### 4.2.6 - Teste de solubilidade das proteínas

Para testar a solubilidade das proteínas expressas, primeiramente lisou-se o extrato da expressão em 5 ciclos de sonicação à 65% de potência por 45 segundos, intercalados com 45 segundos de repouso em banho de gelo. Em seguida, centrifugou-se a amostra por 6000 x g por 30 min a 4° C, tanto o sobrenadante e o sedimento foram coletados. As amostras foram aquecidas à 95 °C por 7 minutos, e aplicadas em membranas de nitrocelulose em forma de *spots*. Em seguida, foi adicionada a solução de bloqueio 5% de BSA em PBS por 40 minutos a 37°C, posteriormente lavou-se a membrana por três vezes com solução tampão PBS-0.05% Tween 20. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo primário anti-His *Mouse* em proporção 1:5000, deixando a membrana incubada sob agitação por 1 hora. Procedeu-se com mais uma etapa de lavagem com solução tampão PBS-0,05% Tween 20. Após, foi adicionado o anticorpo secundário anti-*Mouse* acoplado com o substrato colorimétrico, peroxidase, deixando a solução incubado sob agitação por 1 hora. Por fim, foi preparada a solução de revelação contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 10 mg de DAB (tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina) e 10  $\mu$ L de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). A reação ocorre ao abrigo de luz e por aproximadamente 10 minutos.

#### 4.2.7 - *Western Blotting*

As amostras foram coletadas e submetidas as etapas descritas no item 4.2.5, inicialmente. Em seguida, transferiu-se as amostras do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose sob uma corrente de 400 mA. Posteriormente, adicionou-se a solução de bloqueio 5% de BSA em PBS por 1 hora a 37°C, posteriormente lavou-se a membrana por três vezes com solução tampão PBS-0.05% Tween 20. Em seguida, foi

adicionado o anticorpo primário anti-His *Mouse* em proporção 1:5000, deixando a membrana incubada sob agitação por 2 horas. Procedeu-se com mais uma etapa de lavagem com solução tampão PBS-0.05% Tween 20. Após, foi adicionado o anticorpo secundário anti-*Mouse* acoplado com o substrato colorimétrico, peroxidase, deixando a solução incubado sob agitação por 2 horas. Por fim, foi preparada a solução de revelação contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 10 mg de DAB (tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina) e 10 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). A reação ocorre ao abrigo de luz e por aproximadamente 10 minutos.

#### 4.2.8 - Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia manual

O sedimento da cultura obtido após a etapa de expressão foi ressuspendido em 100 mL de PBS contendo 30 mM de imizadol mais 8 M de ureia e incubado por 30 min em gelo. Em seguida, o extrato foi lisado em 6 ciclos de sonicação à 65% de potência por 45 segundos, intercalados com 45 segundos de repouso em banho de gelo. Em seguida a amostra foi centrifugada por 6000 x g por 20 min a 4° C e o sobrenadante foi coletado. A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em um sistema manual, em que a fração sobrenadante foi aplicada em uma coluna *HisTrap* (QIAGEN) de 5 mL. A coluna foi previamente lavada utilizando 5 vezes o seu volume com o tampão A (PBS contendo imidazol 30 mM + 8 mM ureia). A eluição foi realizada através da adição do tampão B (PBS contendo imidazol 500 mM + 8 mM ureia). Em seguida, as frações eluídas contendo a proteína recombinante passaram por um processo de diálise, de modo a concentrar a proteína em solução e diminuir a concentração de ureia, através de diluições seriadas sucessivas em amostras de PBS contendo 6 mM e 4 mM de ureia. As amostras de proteína recombinante purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA) utilizando o kit *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as frações obtidas serão analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 14%.

#### 4.2.9 - Soroteca de bovinos

Soros de bovinos infectados com *Tripanosoma vivax*, *Mycobacterium bovis*, *Neospora caninum*, leptospirose e não infectados, previamente caracterizados, foram cedidos pela Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar do Instituto Avançado de Veterinária da Universidade de Uberaba e pelo Dr. Daniel Menezes Souza do setor de Patologia Clínica do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 4.2.10 – ELISA

Realizou-se ensaios de ELISA em placas de PVC flexível de 96 poços (BD Falcon). Em cada poço, 1 µg de proteína recombinante ou de antígeno bruto diluídos em 50 µL de água Milli-Q foi adicionado e as placas incubadas a 4 °C. Em seguida, o bloqueio foi realizado tratando-se as placas com tampão de bloqueio 5% de BSA em PBS por 1 hora a 37°C. Proteínas e excesso da solução de bloqueio não ligados foram removidos lavando-se os poços três vezes com tampão PBS-0.05% Tween 20. Após a lavagem das placas, 50 µL dos soros diluídos 1:100 em tampão de bloqueio foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas por três vezes e anticorpo anti-IgG bovino conjugado a peroxidase diluído 1:5000 no tampão de bloqueio foi adicionado. Após incubação das placas por 1 hora a 37°C, um novo ciclo de três lavagens foi realizado e 100 µL da solução substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% foram então adicionadas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ao abrigo de luz por cerca de 15 minutos, quando se adicionou 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorbância lida em leitor de ELISA a 450 nm.

### 5.3. Resultados

#### 4.3.1 – Seleção do fago e mapeamento das proteínas antigênicas

O critério utilizado para seleção do fago baseou-se nos dados do ensaio de ELISA de fagos e da curva ROC do capítulo anterior (figura suplementar – página 36 a 40). Em seguida, buscou-se mapear proteínas do genoma do parasito que tivessem em sua sequência regiões com alta similaridade aos epítomos selecionados pelo *phage display*. Com isso, a partir dos dados obtidos na Tabela 2 (página 32) do capítulo anterior, selecionou-se as proteínas referentes ao fago P6 (QSTSGSS), que apresentou maior cobertura, identidade e score relativo para predição de epítomos lineares de células B. Além disso, buscou-se proteínas exclusivas do *Trypanosoma vivax*, ou que tivessem baixa similaridade com o genoma de organismos evolutivamente próximos ou pertencentes ao ambiente agropecuário, como *T. cruzi*, *T. evansi*, *Mycobacterium bovis*, *Neospora caninum*. Por consequência, as proteínas de código CCD19908.1 (Tv2) e CCC52526.1 (Tv1) foram as selecionadas para atuar como antígeno no diagnóstico da tripanossomíase. A sequência das duas proteínas segue representada abaixo pela Figura 1:

>CCC52526.1 (Tv1)

MSRLHGVVLRWVLRPLFTGRPLGTIAICRRMVASTDSCKAEEMLPISALKSDLDLLQKRWMRSFRVCISDA  
NVVVETSTDGKGLWLPITTELEVDVAVPQGLVSAVNASLDSAPSMELGQTVVDLRDRGEDLAAARKALAAQFPRL  
RLSVDHSGKGTDLQGNVTHSVSLSLQAHDPTNDLTAEEERVKETFFGEAIGVSYMGTVRRRAICEAFDAARLDQPQ  
RQPECDPGCSEMGMVYMGIASEAAAGEKLLVVTPEGEDNVQVVVKTHGGRQMGMLHGCRKNALSVALACVEK  
VAEEVNASATEAARKRIMNHPVVLALPSKGIRPKEILRRLHHTYGLTEERILLATSQGVGCTFVTAVKVELCWK  
NGAVDQETS~~GS~~SSAAPLVVTLAKAAGVNKRATESLACMEAIKDCFPRIFEDQLSFHTEVREIMQSSKATVSASICP  
HISKGILEQLRWAARSQMDKEVLIETAQLLPNSENEALGIRTRPMWAAQLFLVDKNDNREFVVLALDNKKSAS  
EQKAIAAALYKCFREHCKDGVQYAMKHGLIDGKGDVTPCEGVSPCGGPLPHNEAERAAECDPFIHLQLVSSQR  
IPVPPQRHSIIGVYRRGIQLYVNTLNETDTTGSSAWRLVEHIERTPTVHGSFKAQLFLKRAEGATGDGATIGAGEEE  
CGVSPMTMPLGEPYYSTTAVSALHGAMKCAFEKDSAIVKAQVDNAQVRDICTDTQERLSRLEQLPPQLPASTPL  
EAIAQCIMTKYGLTTELRICGEGKLVNVQIFGRGSPSPVESGEGDNTQPFFIAHGRGSSILKAVVSCQRAFATHE  
DTKEDMESLTERAVKTKSIQVPITRKGSLASRIDCVKKEVTENSDDPDAVLVYVTVVDVSSQSEKKYEAVLSVA  
DGRSVVELERTSSF~~TDLIAALLQLVENVNRELGRPSSDLEAVLHRC~~SGPRQCGALQDLVVS~~LF~~GFPVEVNTVLRD  
RQWYCHISVQISEELSYGIGYAVDGRKKEAVENASAAAMHRCFHAACENLRTCLPSSVTPGAEQYCGFVYHKP  
GVSSVVV

>CCD19908.1 (Tv2)

MRRVLLSPSVLASVGCWAAVPATAMAAHWVHKSHGGSPAVPPRSHKRKRKDERRSPHGHTASWGDPALDEVS  
TVFHAPIDTVSAPATPLVMNKLAQSTLSKRF~~SHRHGTAVAH~~SGGITAPTSTPNAPLQQPSTSPQSSLTAVRHLIKVH  
AIMRNNYTALGKNVHVLDCFSRACAEALMQLGLLERHDAAPDMEAGHYIEVRILSLEPPDDGG~~QSTSGSS~~FTIA  
PDAPLYSEPIKIPTLEVERLLFVA

Figura 1 - Sequência de aminoácidos das proteínas selecionadas. Em vermelho, estão representadas as regiões de alta similaridade com os peptídeos preditos no capítulo anterior.

#### 4.3.2 – Amplificação e clonagem dos genes

Após a seleção das proteínas imunogênicas, foram desenhados *primers* específicos que anelariam e amplificariam as regiões codificadoras. Na Figura 2 está representado o resultado da amplificação dos genes selecionados a partir da reação de PCR com o DNA do parasito. Para o gene responsável pela proteína Tv1, espera-se um fragmento de aproximadamente 3000 pb, enquanto para a proteína Tv2, o amplicon esperado é de aproximadamente 700 pb. Pode-se perceber, a partir da Figura 2, que apareceram bandas inespecíficas para ambos os pares de *primers*. Porém, apenas para o Tv2 apareceu a banda do tamanho esperado.

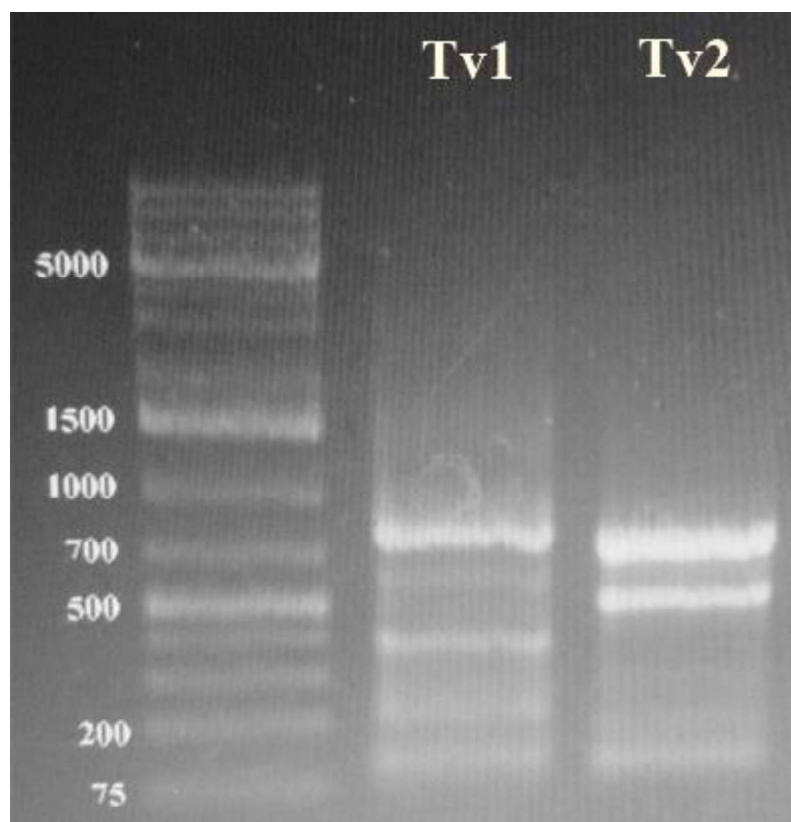


Figura 2 - PCR dos primers específicos desenhados para regiões codificantes de potenciais proteínas antigênicas de *T. vivax*. Na canaleta Tv1, esperava-se um fragmento em 3000 pb. Já na canaleta Tv2, esperava-se um fragmento de 700 pb. A primeira canaleta à esquerda refere-se o marcador molecular, com os valores representando a quantidade de pares de base do fragmento indicado.

Em seguida, deu-se sequência à purificação do fragmento esperado para a proteína Tv2 para ligação no vetor de clonagem pGEM-T *easy*. A confirmação da ligação é demonstrada na Figura 3a, em que se vê a banda próxima a 700 pb, referente à amplificação do fragmento com o par de primer 0420. Ao desenhar os *primers* específicos para cada região codificante, adicionou-se sítios de enzimas de restrições para corte específico do amplicon, utilizando, neste caso, as enzimas *NheI* e *XhoI*. Na Figura 3b, está representada a digestão do plasmídeo do pGEM contendo o amplicon com as enzimas acima citadas, liberando o fragmento esperado. Ainda nesta figura, utilizou-se as mesmas enzimas para cortar um plasmídeo do vetor pET28a contendo um fragmento inserido de aproximadamente 1000 pb, o que facilitou a visualização da reação de digestão. As bandas referentes ao pET28a aberto e ao fragmento de DNA clivado do pGEM foram excisadas do gel, purificadas e ligadas pela T4 DNA ligase. A partir de então, confirmou-se a inserção do fragmento no vetor de expressão por PCR. Utilizou-se os *primers* específicos do amplicon e o primer T7, que se anela diretamente à sequência do vetor, gerando uma banda de aproximadamente 300 pb que deve ser somada ao tamanho do fragmento esperado (Figura 3c e 3d).

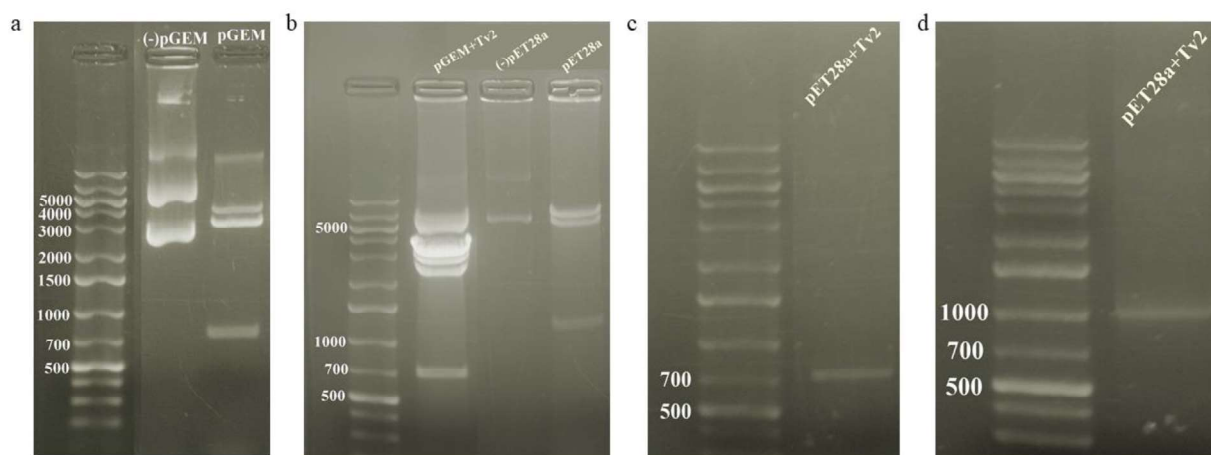


Figura 3 - a) PCR de confirmação da inserção do fragmento da proteína Tv2 no vetor de clonagem pGEM-T easy. b) Digestão da construção pGEM+Tv2 na segunda canaleta. Na terceira e quarta canaleta estão o controle do pET28a não digerido e do pET28a digerido, respectivamente. c) e d) PCR para confirmação da construção pET28a+Tv2 por meio dos primers específicos do fragmento (0420F e 0420R) e específico do vetor (T7). A primeira canaleta à esquerda em toda a figura refere-se ao marcador molecular, com os valores representando a quantidade de pares de base do fragmento indicado.

#### 4.3.3 – Expressão, solubilidade e purificação da proteína

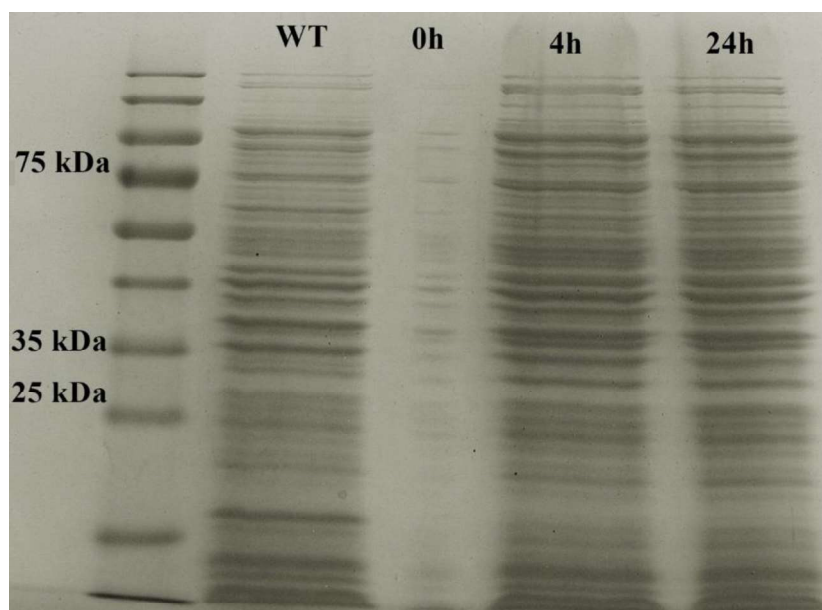


Figura 4 - Teste de expressão de proteínas avaliando a proteína selvagem, sem inserção de nenhum vetor (WT), e nos tempos 0, 4 e 24 horas. A primeira canaleta à esquerda refere-se ao marcador molecular, com os valores em kDa representando o fragmento indicado.

Foi avaliado se o sistema construído possuía capacidade de expressar a proteína esperada. Como demonstrado na Figura 4, pode-se perceber que o perfil de expressão de proteínas em 24 horas, quando comparado ao da bactéria selvagem (WT) e do tempo 4 h, não demonstrou diferença significativa, o que indica que não há expressão excessiva de

uma proteína de tamanho específico. Entretanto, buscou-se verificar se mesmo em menor quantidade, a proteína recombinante estava sendo expressa. Para isso, procedeu-se com um *western blotting*, visando identificar proteínas que tivessem em sua sequência a cauda de histidina. O resultado está representado na Figura 5, em que se percebe a presença de bandas apenas na canaleta do tempo 24 horas, além de uma leve marcação no tempo 0 e nenhum sinal de banda na canaleta da bactéria selvagem.

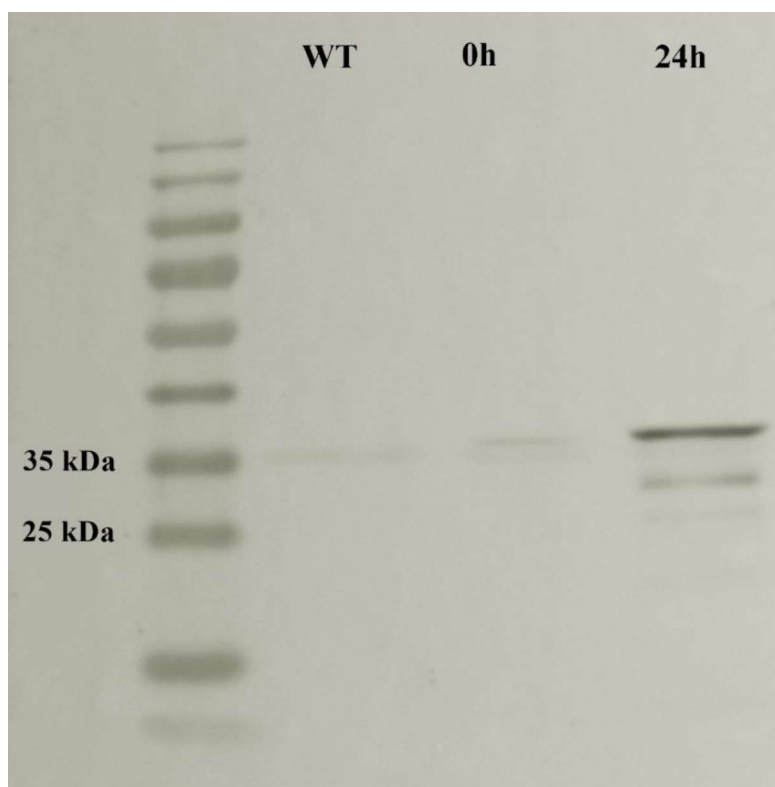


Figura 5 - Western Blotting para validação da expressão da proteína Tv2 pela interação com o anticorpo Anti-Histidina. A primeira canaleta à esquerda refere-se ao marcador molecular, com os valores em kDa representando o fragmento indicado.

Com o intuito de conhecer melhor o perfil da proteína, além da sua sequência linear de aminoácidos e seu potencial imunogênico, buscou-se investigar sua solubilidade em meio aquoso. Percebe-se na Figura 6 que a maioria das proteínas expressas se encontram na fração insolúvel. Este fato, alterou completamente o cenário de purificação da proteína, uma vez que requer soluções contendo um teor de ureia para desnaturar a proteína e aumentar sua solubilidade em sistemas aquosos. Planejando verificar a confiabilidade do teste de solubilidade, procedeu-se com a purificação utilizando tanto soluções contendo ureia, quanto a solução da fração solúvel. Entretanto, pode-se perceber que a proteína do tamanho esperado, aproximadamente 26 kDa, foi encontrada apenas na fração insolúvel

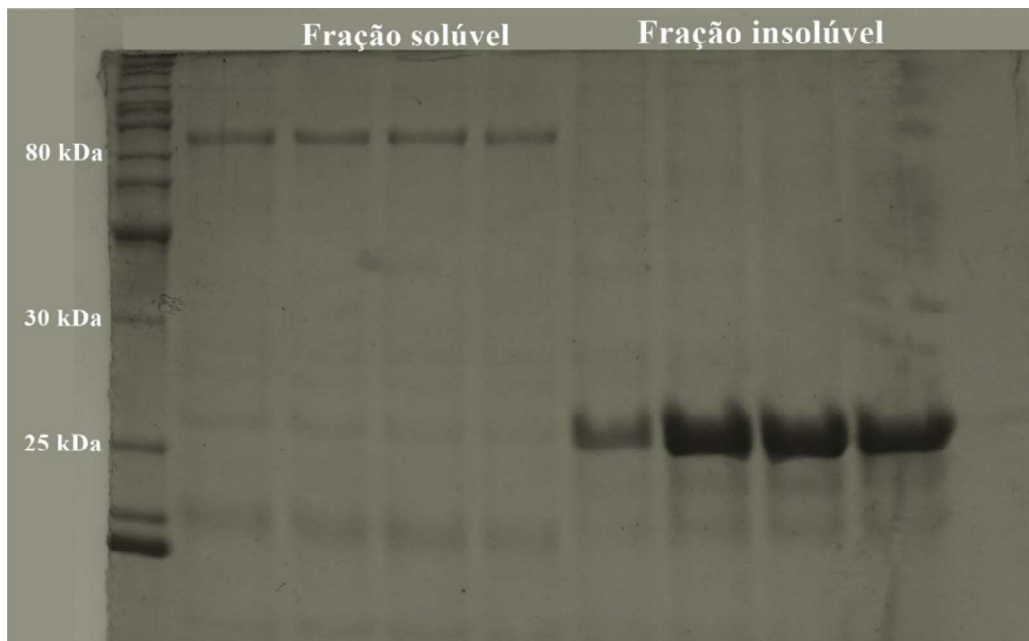


Figura 6 - Gel de poliacrilamida com as amostras referentes à purificação da porção solúvel (quatro primeiras canaletas) e da fração insolúvel (quatro últimas canaletas). A primeira canaleta à esquerda em todas as figuras refere-se ao marcador molecular, com os valores em kDa representando o fragmento indicado.

#### 4.3.4 – Titulação e ELISA

Com o objetivo de encontrar as melhores condições de utilização da proteína no diagnóstico sorológico da tripanossomíase bovina, fez-se uma titulação variando a concentração de antígeno (proteína), diluição do soro e do conjugado. Na Figura 7a, pode-se perceber que o melhor sinal está representado pela concentração de 10,0 mg/ml da proteína. Nas Figuras 7b percebe-se que o melhor sinal obtido para diluição de soro foi de 1:100. No entanto, na Figura 7c, apesar de o maior sinal ser visto na diluição de 1:5000, a maior diferença entre o positivo e o negativo se deu em 1:10000, o que é vantajoso por demandar um menor uso de anticorpo secundário.

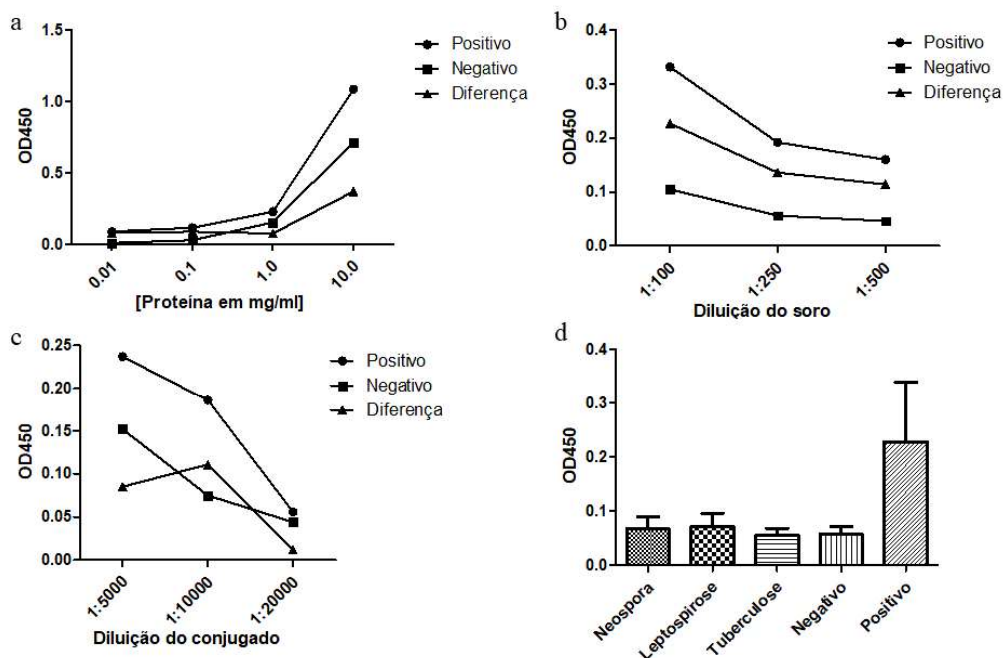


Figura 7 - Titulação para obtenção das condições otimizadas para o ensaio de ELISA. Em a) se avaliou a melhor concentração de proteínas. Em b) e c), se avaliou a melhor diluição de soro e de conjugado, respectivamente. d) representa um teste prévio do ensaio de ELISA para verificar a capacidade de discriminação dos soros pela proteína, sem utilizar as condições otimizadas.

Na Figura 7d, apresenta um resultado prévio do ensaio de ELISA, utilizando as quantidades próximas as otimizadas na titulação, pois a quantidade de proteína purificada não seria suficiente para testar em todos os soros. De acordo com o apresentado na figura, apesar da diferença perceptível entre as amostras negativas e de outras doenças, o resultado não se apresentou conclusivo significativamente na discriminação da doença. No entanto, espera-se repetir as etapas de purificação para se obter um volume maior de proteína purificada e, conseqüentemente, testar o potencial antigênico da proteína Tv2 nas condições otimizadas, de modo a aumentar o valor do sinal de leitura e aumentar seu poder de discriminação.

#### 5.4. Discussão

Com a expansão das ferramentas de sequenciamento, manipulação e estudo do genoma, o acesso a sequências de DNA de diversos organismos patogênicos se tornou algo comum. Dessa forma, o desenvolvimento de testes de diagnóstico para doenças infecciosas utilizando recursos que envolvem genômica, transcriptômica e, principalmente, proteômica vêm aumentando. As técnicas parasitológicas convencionais apresentam elevada especificidade, porém, são metodologias laboriosas e não são apropriadas para a atenção epidemiológica ou para o controle diário (Toledo-Machado, 2015).

Análises sorológicas são ferramentas úteis para detecção de anticorpos anti-tripanosoma em estudos epidemiológicos de grande escala, facilitando campanhas de

controle da doença (Bossard, 2010). Além de se apresentarem como testes bem estabelecidos, existem aplicações diretas no diagnóstico de doenças infecciosas, autoimunes, alérgicas, dentre outras (Fierz, 2004). Estes testes possibilitam a rápida detecção da infecção, não são invasivos, podem ser quantitativos e facilmente automatizados, permitindo a avaliação de inúmeras amostras simultaneamente (Menezes-Souza, 2015). Segundo Bakari (Bakari, 2017), os fatores bioquímicos e hematológicos presentes no soro se apresentam como ferramentas importantes para o diagnóstico e o prognóstico das doenças imunológicas. Portanto, desenvolver novos testes sorológicos baseados em tecnologias recombinantes, como moléculas não variantes do proteoma do parasito, abaixaria o custo da tecnologia, facilitaria a aplicação em grande escala e seria um recurso útil (Bossard, 2010).

Utilizar proteínas recombinantes, que atuarão como antígeno, para fins de diagnóstico, mostra-se uma estratégia interessante para doenças de animais de campo, como a tripanossomíase bovina. Proteínas envolvidas em processos de infecção intracelular dos parasitos no interior do hospedeiro são alvos significativos, uma vez que a expressão dessas proteínas se dá devido à infecção em mamíferos (Menezes-Souza, 2015). Desse modo, a etapa de seleção de antígenos para os métodos sorológicos é essencial, por estar diretamente relacionado com a especificidade e a sensibilidade do método. Logo, deve-se utilizar antígenos recombinantes em detrimento a antígenos brutos, pois é desnecessário o processamento do parasito vivo e permite o maior controle da especificidade, eliminando antígenos compartilhados com outros organismos (Menezes-Souza, 2015).

O presente trabalho vem como sequência do capítulo anterior, pois se utilizou dos resultados de seleção de fagos e mapeamento do proteoma para seleção das proteínas base desta proposta. Portanto, o objetivo foi selecionar potenciais antígenos capazes de identificar anticorpo anti-*T. vivax* em amostras de soro. No início, na fase de isolar o DNA responsável por codificar as proteínas, apenas a Tv2 teve seu fragmento amplificado no tamanho correto. O tamanho esperado para Tv2 era de aproximadamente 3000 pb, por este fato, e por se tratar de uma proteína hipotética (Tabela 3 do capítulo anterior, página 34), acredita-se que a sequência encontrada seja um artefato do genoma de *T. vivax*, e não uma região codificante. A afirmação anterior se justifica pois, após a purificação de ambos os genes de 700 pb, tanto do Tv1 quanto do Tv2, os *primers* foram invertidos propositalmente, e os fragmentos foram amplificados (dados não apresentados). Dado este fato, descartou-se seguir adiante com a proteína Tv1. Em contrapartida, a proteína Tv2 foi

facilmente inserida e confirmada nos vetores de clonagem e expressão, tanto por PCR com *primers* específicos quanto por enzimas de restrição (Figura 3). A expressão da proteína pôde ser confirmada pelo teste de expressão e pelo *Western Blotting* de interação com anticorpo anti-cauda de histidina. Um resultado inesperado, de certa forma, foi quando se testou a solubilidade da proteína e percebeu-se que ela se encontrava na fração insolúvel. De acordo com o manual da *E. coli Arctic Express*, a bactéria possui um sistema de chaperonas moleculares que auxiliam no dobramento e na consequente solubilidade das proteínas expressas por esta construção. Análises *in silico* (dados não apresentados), indicaram que, apesar de possuir uma região preditiva para peptídeo sinal, aproximadamente 25 aminoácidos presentes no início da sequência da proteína possuem elevado potencial transmembrana, fato que corrobora e explica o perfil de solubilidade encontrado. Entretanto, a questão da solubilidade foi contornada na etapa de purificação em que foi acrescentado 8 M de ureia, agente desnaturante, em todas as soluções. Em seguida, procedeu-se com a diálise para retirar o máximo possível de ureia, impedindo assim que a molécula interfira no sinal de leitura do ELISA e que a proteína precipite durante sua manipulação.

De acordo com a titulação, foi possível estabelecer uma quantidade mínima necessária para um teste de ELISA com bom sinal de detecção. A exceção se deu em relação a concentração de proteína, uma vez que o rendimento final da purificação foi de apenas 0,467 mg/ml de proteínas, o que impossibilitava utilizar a concentração de 10 mg/ml, melhor concentração estabelecida pela titulação. Porém, de acordo com a Figura 7d, pôde-se perceber que o sinal do ensaio não foi o suficiente alto para discriminar os soros contaminados por *T.vivax* dos demais grupos controle. Acredita-se que ou o tempo de incubação do antígeno com o soro foi baixo, ou será necessário aumentar a concentração de proteínas para aumentar a acurácia do método.

Para fins de comparação, um estudo utilizou um antígeno conhecido como GM6 para diagnosticar a doença em amostras de campo, e obteve sensibilidade de 91,5% e especificidade de 91,3% (Pillay, 2013). Um outro estudo, imobilizou o antígeno em um dispositivo portátil, que foi capaz de discriminar soros contaminados com sensibilidade e especificidade de 92 e 89,9%, respectivamente (Fleming, 2016). Em um novo estudo, um pesquisador utilizou de proteínas de superfície glicosiladas como antígeno e obteve valores de especificidade de 98,8% e sensibilidade de 71,6% (Uzcanga, 2016). Estes resultados indicam que o ensaio de ELISA precisa ser repetido, alterando as condições de reação, de modo a se obter um antígeno com potencial predito para detecção da doença. Portanto,

espera-se com a padronização e correção dos ensaios, otimizar as condições de ensaio para avaliar o potencial da proteína Tv2 como um antígeno eficiente no diagnóstico da tripanossomíase bovina.

## 6. Conclusões e perspectivas

O presente trabalho demonstrou que 11 peptídeos clonados em fagos podem ser usados, direta ou indiretamente, em testes para o diagnóstico da tripanossomíase bovina. Ademais, uma proteína de elevado potencial antigênico predito foi expressa e os ensaios preliminares indicaram seu potencial uso para detecção de anticorpos anti-*T.vivax*.

Para conclusão do trabalho, faz-se necessário mais testes acerca do potencial antigênico da proteína Tv2 comparando com uma maior quantidade de amostras de animais infectados e saudáveis. É necessário, também, comparar a afinidade entre a proteína e o peptídeo na interação com o anticorpo anti-*T.vivax*. Por fim, planeja-se sintetizar quimicamente uma proteína quimérica altamente antigênica, utilizando como molde fagos isolados no Capítulo 1.

## 7. Bibliografia

ABRÃO, D.C. et al. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. *Ciência animal brasileira*, p. 2006–2009, 2016.

ADAMU, S. et al. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary Parasitology*, v.143, p. 29–34. 2007

AGUIRRE, S. et al. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 10, p. 3768–3774, 2006.

ALMEIDA, K. D. S. et al. Acute phase proteins: a potential approach for diagnosing chronic infection by *Trypanosoma vivax*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, v. 21, n. 2, p. 97–100, 2012.

AQUINO, L.P.C. et al. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 2, p. 112-118. 2010

BARAL, T. N. Immunobiology of African trypanosomes: Need of alternative interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, 2010.

BAKARI, S. M. et al. Serum biochemical parameters and cytokine profiles associated with natural African trypanosome infections in cattle. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 312, 2017.

BASSI, P. B. et al. Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Experimental Parasitology*, v. 185, p. 98–106, 2018.

BASTOS, T. S. A. et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 2961, n. 2012, p. 366–371, 2017.

BATISTA, J. S. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 174–181, 2007.

BATISTA, J. S. et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: Epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitology Research*, v. 110, n. 1, p. 73–80, 2012.

BEZERRA, F. S. B.; BATISTA, J. S. Efeitos da Infecção por *Trypanosoma vivax* Sobre a Reprodução: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, p. 61–66, 2008.

BITTAR, J. F. F. et al. Evaluation of parameters related to libido and semen quality in Zebu bulls naturally infected with *Trypanosoma vivax*. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015.

BOSSARD, G. et al. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis based on HSP70/BiP inhibition ELISA. *Veterinary Parasitology*, v. 173, n. 1–2, p. 39–47, 2010.

BOULANGÉ, A. et al. Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*, v. 233, p. 32–38, 2017.

CADIOLI, F. A. et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 118–124, 2012.

CADIOLI, F. A. et al. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Veterinary Parasitology*, v. 214, n. 1–2, p. 174–177, 2015.

CARMONA, S. J. et al. Diagnostic Peptide Discovery: Prioritization of Pathogen Diagnostic Markers Using Multiple Features. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, 2012.

CARVALHO, et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, p.769–771. 2008

COSTA, L. E. et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic leishmania infantum antigens with potential serodiagnosis applications. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 21, n. 1, p. 96–106, 2014.

CUGLOVICI, D. A. et al. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 169, n. 3–4, p. 320–326, 2010.

DA SILVA, A. S. et al. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitology Research*, v. 108, n. 1, p. 23–30, 2011.

DAGNACHEW, S. et al. Comparative biochemical changes in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from tsetse infested and non-tsetse infested areas of northwest Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, v. 205, n. 3–4, p. 451–459, 2014.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation de séchantillonssanguins. Revue Élevage. Med. Vet. Des Pay. Tro., v. 49, p. 322-327, 1996.

FACK, F. et al. Epitope mapping by phage display: Random versus gene-fragment libraries. Journal of Immunological Methods, v. 206, n. 1-2, p. 43-52, 1997.

FIERZ, W. Basic problems of serological laboratory diagnosis. Methods in molecular medicine, v. 94, p. 393-427, 2004.

FLEMING, J. R. et al. Proteomic Identification of Immunodiagnostic Antigens for *Trypanosoma vivax* Infections in Cattle and Generation of a Proof-of-Concept Lateral Flow Test Diagnostic Device. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 9, p. 1-11, 2016.

GOMES, R.C., FEIJÓ, G.L.D., CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Nota Técnica. EMBRAPA. p. 2-5. Março, 2017.

GUERREIRO, L.T.A. Identificação e caracterização de minicírculos de *Trypanosoma vivax* através de geração e análise de GSS. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

HE, Y. et al. Epitope mapping by random peptide phage display reveals essential residues for vaccinia extracellular enveloped virion spread. Virology Journal, v. 9, p. 1-11, 2012.

JACKSON, A. P. et al. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 109, n. 9, p. 3416-3421, 2012.

LEGER, M., VIENNE, M. Epizootie a trypanosomes chez le<sup>s</sup> bovines de la Guayane Francais. Bull. Soc. Pathol. Exot. 12, 216- 258, 1919.

MADRUGA, C. R. et al. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 7, p. 801-807, 2006.

MANOUTCHARIAN, K. et al. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. Infect Immun, 67:4764-4770, 1999.

MASAKE, R. A. et al. The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. Veterinary Parasitology, v. 105, n. 3, p. 179-189, 2002.

MATTIOLI, R.C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. *Veterinary Parasitology*, v.95, p.25–35. 2001.

MCGUIRE, M. J.; LI, S.; BROWN, K. C. Biosensors and Biodetection. v. 504, p. 1–28, 2009.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2015.

NOYA, O. et al. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current protein & peptide science*, v. 4, p. 299–308, 2003.

OLIVEIRA, M. C. S. Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. Embrapa, 2006.

OSÓRIO, A. L. A. R. et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 1, p. 1–13, 2008.

PILLAY, D. et al. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 66, n. 1, p. 25–32, 1972.

SILVA, R. A. M. S. et al. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. *Veterinary Parasitology*, v. 85, n. 1, p. 87–93, 1999.

SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, Diagnóstico e Controle. 2002, p. 135, 2002.

SILVA, A. S. DA et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 39, n. 8, p. 2550–2554, 2009.

TOLEDO-MACHADO, C. M. et al. Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. *BioMed Research International*, v. 2015, n. Cv1, 2015.

TOLEDO-MACHADO, C. et al. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 133, 2015.

UZCANGA, G. L. et al. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. *Veterinary Parasitology*, v. 218, p. 31–42, 2016.

VENTURA, R. M. et al. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Experimental Parasitology*, v. 99, n. 1, p. 37–48, 2001.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. *Acta Tropica*, Basel, v. 27, p. 384–386, 1970;