

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Vinícius Marquioni Monteiro

**Avaliação de potenciais antígenos vacinais e
geração de aptâmeros por cell-SELEX em
*Erysipelothrix rhusiopathiae***

São Carlos
2018

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Vinícius Marquioni Monteiro

**Avaliação de potenciais antígenos vacinais e
geração de aptâmeros por cell-SELEX em
*Erysipelothrix rhusiopathiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur

São Carlos
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Vinícius Marquioni Monteiro, realizada em 28/02/2018:

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
UFSCar

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Emanuel Carrilho
IQSC/USP

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, pela orientação paciente e atenciosa, por todas as valiosas sugestões e por todas as oportunidades proporcionadas durante o Mestrado.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, pela parceria nesse projeto de pesquisa, por gentilmente ceder seu tempo e sua infraestrutura laboratorial e pelas instruções nos trabalhos de imunologia.

Ao Prof. Dr. Adilson José da Silva e à Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, por disponibilizarem os recursos de seus laboratórios para a realização desse projeto.

A todos os membros da banca, titulares e suplentes, por gentilmente se disporem a contribuir nesse trabalho com seu conhecimento.

A Patty Karina dos Santos, pela imensa ajuda com os experimentos de cromatografia e à Profa. Heloísa Sobreiro Selistre de Araujo, por me receber em seu laboratório tão prontamente.

Ao Prof. Flávio Henrique da Silva, por me permitir usar diversos equipamentos de seu laboratório e à Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama, por me permitir quantificar inúmeras amostras em seu laboratório.

A Katia Celina Santos Correa e Bruna Soares Dionizio, por toda a atenção e pela ajuda com os experimentos de cromatografia e à Profa. Dulce Helena Ferreira de Souza, por me permitir usar diversos equipamentos de seu laboratório.

A Karina Alves Feitosa e Ana Carolina Maragno Fattori, pela ajuda com os experimentos de titulação de anticorpos.

A todas as pessoas que me acompanharam e/ou me ajudaram com os experimentos no biotério: Ana Carolina Baptista Moreno Martin, Rebecka Tomasin, Naiane Lima Godoy, Paula Kern Novelli e Laiane Antunes Lopes.

Ao Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento, por me permitir usar o citômetro de seu laboratório e me ajudar com meus experimentos.

A todos os membros do laboratório, pelos momentos divertidos e por me aturarem em meus dias ruins (que não foram poucos).

À Fiocruz, por ceder as linhagens de microrganismos usados na SELEX.

À FAPESP, pela concessão da minha bolsa de Mestrado (Processo 2016/03746-1), e ao parecerista *ad hoc*, por avaliar a minha solicitação de bolsa (e recomendá-la para aprovação!) e pela avaliação e comentários do meu relatório parcial.

Resumo

Erysipelothrix rhusiopathiae é uma bactéria Gram-positiva que causa a doença conhecida como erisipela suína. As vacinas veterinárias disponíveis contra a doença possuem diversas limitações e os métodos para detecção da bactéria são demorados e dispendiosos. Em um trabalho anterior, foram identificadas proteínas candidatas a antígenos no sobrenadante de cultivos de *E. rhusiopathiae* por uma análise imunoproteômica. No presente trabalho, algumas das proteínas identificadas foram clonadas e expressas para avaliar sua antigenicidade e capacidade protetora contra *E. rhusiopathiae*. Em paralelo, pela técnica de cell-SELEX, foram selecionados aptâmeros capazes de se ligar a células de *E. rhusiopathiae*, os quais poderiam ser incorporados em sistemas de detecção da bactéria. Onze proteínas foram selecionadas para clonagem e expressão recombinante. As ORFs dessas proteínas foram amplificadas por PCR, clonadas em um vetor de propagação (pJET1.2/blunt) e sub-clonadas em um vetor de expressão (pET28a). Nove proteínas foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) e dessas, cinco foram suficientemente purificadas por cromatografia para uma titulação de anticorpos no soro de suínos imunizados contra a erisipela suína, das quais três foram confirmadas como antigênicas. Duas proteínas antigênicas e obtidas em quantidade e pureza suficientes, foram submetidas a um ensaio de imunização de camundongos e apresentaram um possível efeito protetor quando os animais foram desafiados com 1.000 células de *E. rhusiopathiae*. Já com um desafio de 10.000 células, praticamente todos os animais imunizados morreram, assim como aqueles vacinados com uma vacina comercial. A seleção de aptâmeros por cell-SELEX (SELEX feita com células inteiras) foi feita em sete ciclos, com uma stringência crescente, usando-se uma biblioteca com regiões 5' e 3' conservadas e uma região central com 40 nucleotídeos aleatórios. Após a clonagem, os aptâmeros foram reamplificados com um *primer* F marcado com o fluoróforo 6-FAM para caracterização da sua ligação às células por citometria de fluxo. Vinte clones de *E. coli* contendo aptâmeros clonados foram selecionados ao acaso para sequenciamento. Foram obtidas apenas seis sequências distintas, agrupadas em três famílias com não mais do que uma base de diferença entre sequências de uma mesma família, sugerindo que a cell-SELEX foi eficiente em enriquecer a biblioteca inicial em sequências capazes de se ligar a *E. rhusiopathiae*. Futuramente, o ensaio de imunização com as duas proteínas antigênicas selecionadas poderá ser repetido com uma carga bacteriana intermediária às testadas, permitindo que se avalie melhor sua capacidade protetora contra *E. rhusiopathiae*. Já os aptâmeros, agora com sequências conhecidas, poderão ser devidamente caracterizados. Este trabalho apontou duas proteínas de *E. rhusiopathiae* promissoras como antígenos vacinais, bem como aptâmeros possivelmente específicos para o patógeno, os quais poderão ser incorporados posteriormente em sistemas de detecção da bactéria.

Palavras-chave: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; erisipela suína; vacinas; antígenos; aptâmeros; cell-SELEX; proteínas recombinantes

Abstract

Erysipelothrix rhusiopathiae is a Gram-positive bacterium that causes the disease known as swine erysipelas. Available veterinary vaccines against the disease have several limitations and methods for detecting the bacterium are time consuming and expensive. In a previous work, candidate antigenic proteins were identified in the supernatant of *E. rhusiopathiae* cultures by an immunoproteomic analysis. In the present work, some of the identified proteins were cloned and expressed to assess their antigenicity and protective ability against *E. rhusiopathiae*. In parallel, by the cell-SELEX technique, aptamers capable of binding to *E. rhusiopathiae* cells were selected, which could be incorporated into bacterial detection systems. Eleven proteins were selected for cloning and recombinant expression. The ORFs of these proteins were amplified by PCR, cloned into a propagation vector (pJET1.2/blunt) and sub-cloned into an expression vector (pET28a). Nine proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3), five of which could be sufficiently purified by chromatography for an antibody titration using the serum of pigs immunized against swine erysipelas, of which three were confirmed as antigenic. Two antigenic proteins obtained in sufficient yield and purity were subjected to a mouse immunization assay and showed a possible protective effect when the animals were challenged with 1,000 *E. rhusiopathiae* cells. However, with a challenge of 10,000 cells, almost all immunized animals died, as well as those vaccinated with a commercial vaccine. Selection of aptamers by cell-SELEX (SELEX performed with whole cells) was carried out in seven cycles, with increasing stringency, using a library with conserved 5' and 3' regions and a central region with 40 random nucleotides. After cloning, the aptamers were reamplified with an F primer labeled with the fluorophore 6-FAM for characterization of their binding to cells by flow cytometry. Twenty *E. coli* clones containing cloned aptamers were randomly selected for sequencing. Only six distinct sequences were obtained which were grouped into three families, with no more than one base differing among sequences of the same family, suggesting that cell-SELEX was efficient in enriching the initial library in sequences capable of binding to *E. rhusiopathiae*. In the future, the immunization assay with the two selected antigenic proteins may be repeated with an amount of bacteria intermediate to those tested, allowing a better evaluation of their protective ability against *E. rhusiopathiae*. As for the aptamers, now with known sequences, it will be possible to properly characterize them. This work suggested two *E. rhusiopathiae* proteins as promising vaccine antigens, as well as aptamers that are possibly specific for the pathogen which could later be incorporated into bacterial detection systems.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; swine erysipelas; vaccines; antigens; aptamers; cell-SELEX; recombinant proteins

Índice de figuras

Figura 1. <i>E. rhusiopathiae</i> cultivada em ágar-sangue	13
Figura 2. <i>E. rhusiopathiae</i> corada com a coloração de Gram.....	13
Figura 3. Lesões típicas da erisipela suína	15
Figura 4. Experimentos de imunoproteômica (SERPA) para identificação de proteínas potencialmente antigênicas no sobrenadante de cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i>	19
Figura 5. Reconhecimento de um composto alvo por um aptâmero	21
Figura 6. SELEX.....	22
Figura 7. Desenho da placa para titulação de anticorpos.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 8. Clonagem <i>in silico</i> de um dos amplicons no software UGENE.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 9. Eletroforese dos produtos de PCR das ORFs das proteínas candidatas	Erro! Indicador não definido.
Figura 10. Digestão das construções pJET1.2/blunt_amplicon com as enzimas de restrição apropriadas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 11. Construções pET28a_amplicon não digeridas (ND) e digeridas (D) com as enzimas de restrição apropriadas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 12. SDS-PAGE de alíquotas da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas expressas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 13. Cromatogramas da purificação das proteínas expressas por cromatografia de exclusão molecular.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 14. Titulação de anticorpos contra as proteínas candidatas no soro de suínos imunizados.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 15. Curvas de sobrevivência dos camundongos nos dois ensaios de imunização. Erro!	Indicador não definido.
Figura 16. Eletroforese do produto de uma PCR convencional e da aPCR com a biblioteca	Erro! Indicador não definido.
Figura 17. Colônias de <i>E. coli</i> DH5α contendo o pJET1.2/blunt_aptâmero... Erro!	Indicador não definido.
Figura 18. Eletroforese do produto das PCRs feitas contra os pJET1.2/blunt_aptâmeros com os primers para amplificar os aptâmeros.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 19. Resultado da citometria de fluxo para o aptâmero 6	Erro! Indicador não definido.
Figura 20. Alinhamento e dendrograma da região variável dos 20 aptâmeros sequenciados	Erro! Indicador não definido.

Figura 21. Predição de estruturas secundárias para os aptâmeros sequenciados**Erro!**
Indicador não definido.

Índice de tabelas

Tabela 1. Taxonomia de <i>E. rhusiopathiae</i>	14
Tabela 2. Linhagens de <i>E. rhusiopathiae</i> com genoma sequenciado.....	17
Tabela 3. Composição do meio Feist modificado.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4. Proteínas de <i>E. rhusiopathiae</i> candidatas a antígenos escolhidas para expressão heteróloga.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5. Componentes da PCR para amplificação das ORFs das proteínas candidatas	Erro! Indicador não definido.
Tabela 6. Condições da PCR para amplificação das ORFs das proteínas candidatas.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7. Esquema de vacinação dos camundongos	Erro! Indicador não definido.
Tabela 8. Componentes da aPCR	Erro! Indicador não definido.
Tabela 9. Condições da aPCR.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 10. Condições usadas na seleção positiva da cell-SELEX	Erro! Indicador não definido.
Tabela 11. Linhagens usadas na seleção negativa da cell-SELEX	Erro! Indicador não definido.
Tabela 12. Primers desenhados para amplificação das ORFs das proteínas candidatas	Erro! Indicador não definido.
Tabela 13. Amplicons esperados para cada PCR.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 14. Condições otimizadas para as PCRs das ORFs das proteínas candidatas	Erro! Indicador não definido.
Tabela 15. Experimentos conduzidos com cada proteína candidata	Erro! Indicador não definido.
Tabela 16. Oligonucleotídeos desenhados para a cell-SELEX	Erro! Indicador não definido.
Tabela 17. Propriedades termodinâmicas das estruturas secundárias previstas para os aptâmeros sequenciados.....	Erro! Indicador não definido.

Sumário

Índice de figuras	9
Índice de tabelas.....	22
1 Introdução	13
1.1 <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> e a erisipela suína	13
1.2 Vacinas contra <i>E. rhusiopathiae</i>	17
1.3 Aptâmeros	19
2 Objetivos.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivos gerais	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
3 Materiais e métodos.....	Erro! Indicador não definido.
3.1 Proteínas candidatas a antígenos.....	Erro! Indicador não definido.
3.1.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	Erro! Indicador não definido.
3.1.2 Desenho dos <i>primers</i> para amplificação das ORFs das proteínas candidatas. Erro! Indicador não definido.	
3.1.3 Amplificação das ORFs das proteínas candidatas.....	Erro! Indicador não definido.
3.1.4 Clonagem em vetor de propagação (pJET1.2/blunt).....	Erro! Indicador não definido.
3.1.5 Sub-clonagem em vetor de expressão (pET28a)	Erro! Indicador não definido.
3.1.6 Expressão e purificação das proteínas candidatas	Erro! Indicador não definido.
3.1.7 Titulação de anticorpos no soro de suínos imunizados contra <i>E. rhusiopathiae</i>	Erro! Indicador não definido.
3.1.8 Ensaio de imunização de camundongos.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Aptâmeros	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Desenho da biblioteca	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 Otimização da obtenção de ssDNA por aPCR.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.3 Cell-SELEX	Erro! Indicador não definido.
3.2.4 Clonagem dos aptâmeros.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.5 Reamplificação dos aptâmeros monoclonais e caracterização por citometria de fluxo..	Erro! Indicador não definido.
3.2.6 Sequenciamento e predição de estruturas secundárias dos aptâmeros .	Erro! Indicador não definido.
4 Resultados	Erro! Indicador não definido.
4.1 Proteínas candidatas a antígenos.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	Erro! Indicador não definido.
4.1.2 Desenho dos <i>primers</i> para amplificação das ORFs das proteínas candidatas. Erro! Indicador não definido.	

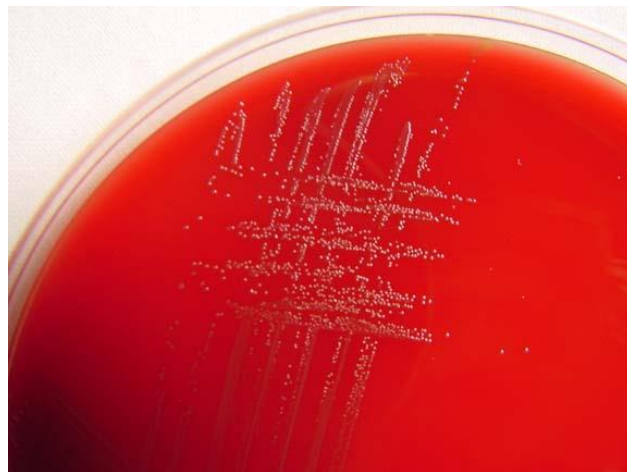
4.1.3 Amplificação das ORFs das proteínas candidatas	Erro! Indicador não definido.
4.1.4 Clonagem em vetor de propagação (pJET1.2/blunt)	Erro! Indicador não definido.
4.1.5 Sub-clonagem em vetor de expressão (pET28a).....	Erro! Indicador não definido.
4.1.6 Expressão e purificação das proteínas candidatas.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.7 Titulação de anticorpos no soro de suínos imunizados contra <i>E. rhusiopathiae</i>	Erro! Indicador não definido.
4.1.8 Ensaio de imunização de camundongos	Erro! Indicador não definido.
4.2 Aptâmeros.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.1 Desenho da biblioteca.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.2 Otimização da obtenção de ssDNA por aPCR	Erro! Indicador não definido.
4.2.3 Cell-SELEX.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.4 Clonagem e reamplificação dos aptâmeros.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.5 Reamplificação dos aptâmeros monoclonais e caracterização por citometria de fluxo .	Erro! Indicador não definido.
4.2.6 Sequenciamento e predição de estruturas secundárias dos aptâmeros..	Erro! Indicador não definido.
5 Discussão	Erro! Indicador não definido.
5.1 Proteínas candidatas a antígenos	Erro! Indicador não definido.
5.2 Aptâmeros.....	Erro! Indicador não definido.
6 Conclusões.....	24
7 Perspectivas.....	25
8 Referências bibliográficas	26
Apêndice A – Análise dos dados da titulação de anticorpos	Erro! Indicador não definido.
Apêndice B – Dados brutos da titulação de anticorpos.....	Erro! Indicador não definido.

1 Introdução

1.1 *Erysipelothrix rhusiopathiae* e a erisipela suína

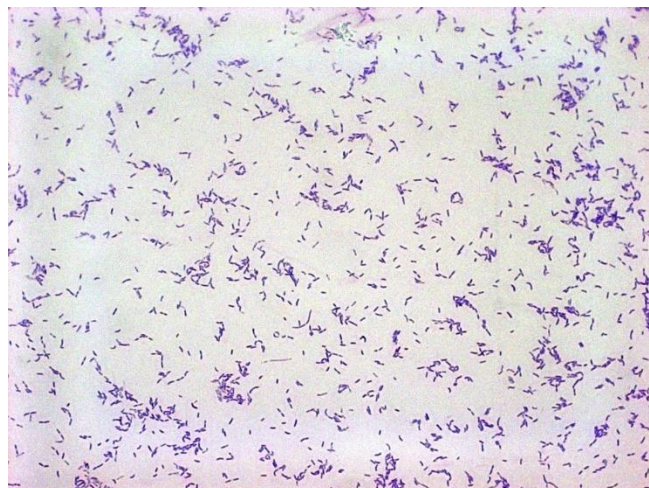
Erysipelothrix rhusiopathiae (mostrada nas Figuras 1 e 2 em ágar-sangue e corada com a coloração de Gram, respectivamente) é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, mesofílica, encapsulada, não móvel, não esporulante (Brooke and Riley, 1999). *E. rhusiopathiae* apresenta formato de bacilo, reto ou levemente curvado, em células individuais ou formando filamentos (Ogawa et al., 2011).

Figura 1. *E. rhusiopathiae* cultivada em ágar-sangue



Fonte: <http://people.upei.ca/jlewis/E.rhusiopathiae8.jpg>

Figura 2. *E. rhusiopathiae* corada com a coloração de Gram



Fonte: http://people.upei.ca/jlewis/E.rhusiopathiae_gram.jpg

O gênero *Erysipelothrix* foi tradicionalmente classificado em sorotipos, sendo 16 deles pertencentes à espécie *E. rhusiopathiae* (sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N) e outros 7, à espécie *E. tonsillarum* (sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23), além de outros 2 (13 e 18) não classificados em espécies (Takahaswi et al., 1992; Ingebritson et al., 2010). A taxonomia de *E. rhusiopathiae* é mostrada na Tabela 1. Tanto *E. rhusiopathiae* quanto *E. tonsillarum* foram isoladas de hospedeiros animais, mas apenas *E. rhusiopathiae* é patogênica. Mais recentemente, outras duas espécies foram propostas para esse gênero, *E. inopinata*, isolada como contaminante de um meio de cultura de base vegetal (Verborg et al., 2004), e *E. larvae*, isolada do sistema digestivo do inseto *Trypoxylus dichotomus* (Lim et al., 2016).

Tabela 1. Taxonomia de *E. rhusiopathiae*

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Classe	Erysipelotrichia
Ordem	Erysipelotrichales
Família	Erysipelotrichaceae
Gênero	<i>Erysipelothrix</i>
Espécie	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>

E. rhusiopathiae é capaz de infectar ou habitar como comensal uma grande gama de hospedeiros, incluindo suínos, humanos, camundongos, ovelhas, bovinos, cavalos, cachorros, ursos, pássaros, peixes, crustáceos, moluscos e insetos (Wood, 1992). Em seres humanos, a infecção por *E. rhusiopathiae* é considerada de caráter ocupacional, sendo que os indivíduos mais propensos são aqueles que lidam diretamente com animais, como veterinários, pescadores e açougueiros (Reboli e Farrar, 1989). Também há relatos de infecção causada pela manipulação de peixes de aquário e exposição à água de lagos, principalmente entre crianças e indivíduos imunossuprimidos (Tan et al., 2017; Asimaki et al., 2017; Alawdah et al., 2017). A infecção em seres humanos geralmente se inicia a partir de ferimentos na pele e pode se manifestar de três formas: uma forma cutânea localizada, chamada de erisipelóide, uma forma cutânea generalizada e uma forma septicêmica, geralmente associada com endocardite (Wang et al., 2010).

O hospedeiro de maior relevância econômica de *E. rhusiopathiae* são os suínos, em que a bactéria causa a doença chamada erisipela suína. Ressalta-se que a doença humana conhecida como erisipela não está relacionada a *E. rhusiopathiae*, sendo na realidade uma infecção cutânea ou subcutânea causada geralmente por bactérias do gênero *Streptococcus* (Bonnetblanc e Bédane, 2003). Em suínos, a infecção pode se manifestar de três formas: aguda, subaguda e crônica (Wang et al., 2010). A forma aguda é caracterizada por morte súbita e sinais de infecção generalizada. Na forma subaguda, os animais podem não parecer doentes, mas podem apresentar febre leve e o sinal mais característico da doença, que são lesões na pele em formato de losango (Figura 3) , as quais geralmente desaparecem alguns dias após a infecção. A forma crônica, que pode surgir após as outras duas, se caracteriza por sinais como artrite e endocardite, que podem levar a aumento e rigidez nas articulações. O patógeno pode ser disseminado para o ambiente por meio de fezes, urina, saliva e secreção nasal e contraído pela ingestão de água ou alimentos contaminados ou por ferimentos na pele (Stackebrandt et al., 2006).

Figura 3. Lesões típicas da erisipela suína



Fonte: <http://www.thepigsite.com/pighealth/article/181/erysipelas/>

Os mecanismos de patogenicidade de *E. rhusiopathiae* não são bem conhecidos. Enzimas como a neuraminidase e a hialuronidase, que degradam compostos da parede celular de mamíferos, parecem estar associadas com a patogenicidade (Wang et al., 2010), assim como proteínas de superfície com papel de adesinas (Zhu et al., 2018). A enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase, que também se comporta adesina, foi a primeira proteína *moonlighting* a ser apontada como um fator de patogenicidade de *E. rhusiopathiae* (Zhu et al., 2017). Outras proteínas com função de adesina e de transporte também foram apontadas como potenciais fatores de patogenicidade em um trabalho de proteômica comparativa entre uma linhagem mais virulenta e outra menos virulenta (Wang et al., 2017). A cápsula de *E. rhusiopathiae* também parece ser um fator de patogenicidade, pois mutantes incapazes de produzi-la se mostraram menos virulentos em camundongos por serem capazes de resistir à fagocitose por macrófagos (Shimoji et al., 1994). Entretanto, um trabalho de transcriptômica e proteômica em que foram comparadas uma linhagem altamente virulenta e uma atenuada sugeriu que a virulência de *E. rhusiopathiae* está associada à neuraminidase, mas não à hialuronidase ou à cápsula (Li et al., 2016).

Os genomas de 5 linhagens de *E. rhusiopathiae* já foram sequenciados e 4 deles foram montados e anotados, enquanto o quinto é um “*permanent draft*”, ainda separado em *contigs* (Tabela 2). O sequenciamento do genoma de *E. rhusiopathiae* mostrou que o patógeno possui um genoma com cerca de 1,8 Mb, com um conteúdo de GC de cerca de 36,5% e cerca de 1700 ORFs. *E. rhusiopathiae* não possui os genes necessários à síntese de ácidos graxos saturados ou insaturados, característica incomum para o filo Firmicutes, além de não possuir vários genes necessários à síntese de aminoácidos e cofatores enzimáticos (Ogawa et al., 2011; Kwok et al., 2014). Foram encontrados diversos genes de enzimas antioxidantes e fosfolipases, que podem permitir que o patógeno resista à fagocitose por macrófagos. Fosfolipases poderiam ainda permitir que o patógeno obtenha ácidos graxos do hospedeiro, já que ele não apresenta genes para sua biossíntese (Ogawa et al., 2011; Kwok et al., 2014). *E. rhusiopathiae* também apresenta diversos genes de resistência a antibióticos, como canamicina e vancomicina. Não foram encontrados plasmídeos nas linhagens sequenciadas, embora a presença de plasmídeos (um deles contendo um gene de resistência a macrolídeos) já tenha sido relatada em linhagens não sequenciadas (Xu et al., 2015; Noguchi et al., 1993).

Tabela 2. Linhagens de *E. rhusiopathiae* com genoma sequenciado

Linhagem	Accession number (NCBI)	Status	Tamanho (Mb)	GC%	ORFs	Similaridade com a linhagem Fujisawa (%)	Referência
Fujisawa (referência)	NC_015601	Completo	1,79	36,6	1661	100,00	Ogawa et al., 2011
SY1027	NC_021354	Completo	1,75	36,4	1408	97,24	Kwok et al., 2014
GXBY-1	NZ_CP014861	Completo	1,88	36,5	1734	97,54	Tang et al., 2016
ATCC 19414	NZ_ACLK000000000	4 contigs	1,75	36,5	1613	94,71	Não publicado
WH13013	CP017116	Completo	1,78	36,5	1662	99,63	Não publicado

1.2 Vacinas contra *E. rhusiopathiae*

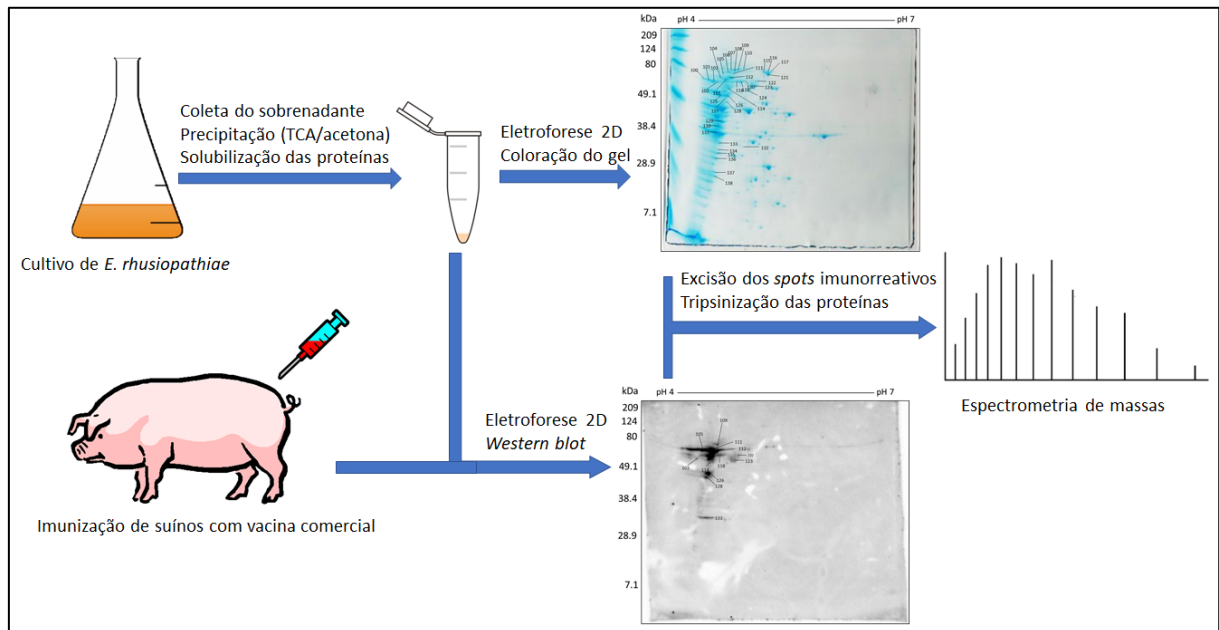
Os sorotipos mais virulentos e mais comumente detectado em surtos de erisipela suína são 1a, 1b e 2 (Bender et al., 2010; Bender et al., 2011; Imada et al., 2004; Eamens et al., 2006). Infecções por *E. rhusiopathiae* são comuns no mundo todo e estima-se que de 30% a 50% dos suínos aparentemente saudáveis sejam portadores da bactéria, que se aloja nas amídalas e em outros tecidos linfoides. O controle da bactéria pode ser feito com medidas de manejo dos rebanhos, manutenção de boas condições de higiene nos criadouros e vacinação dos animais (Wood, 1992).

Vacinas veterinárias contra *E. rhusiopathiae* estão disponíveis desde os anos 1950 e são fabricadas a partir de células inativadas por formalina ou com linhagens atenuadas (Wood, 1992). Entretanto, as vacinas disponíveis oferecem proteção por 6 a 12 meses, o que exige vacinações constantes, e nem todos os animais vacinados ficam imunizados. Além disso, as vacinas protegem apenas contra a forma aguda da doença e sabe-se que a exposição dos animais a células inteiras pode agravar os sinais da forma crônica (Wood, 1992; Swan e Lindsey, 1998). Surtos de erisipela suína aguda têm diminuído graças às vacinas disponíveis, mas casos da forma crônica da doença têm se tornado mais frequentes (To et al., 2012; Nagai et al., 2008). Países como China, Japão e EUA têm registrado surtos da doença, inclusive entre animais vacinados (Zou et al., 2015; Opriessnig et al., 2004; To et al., 2012). Assim, surge a necessidade de se desenvolverem novas vacinas contra *E. rhusiopathiae*, preferencialmente baseadas em antígenos individuais por questões de biossegurança.

O antígeno de *E. rhusiopathiae* mais bem caracterizado é uma proteína chamada SpaA (*Surface protective antigen A*), que se mostrou protetora em camundongos e suínos (Makino et al., 1998; Imada et al., 1999; Nazierbieke et al., 2010). Essa proteína possui a capacidade de se ligar a células endoteliais de suínos (Zhu et al., 2017), além de recrutar plasminogênio (Zhu et al., 2017) e inibir a ação do sistema complemento do hospedeiro (Borrathybay et al., 2015), atuando, portanto, como um fator de patogenicidade. Cheun et al. (2004) geraram uma linhagem de *Lactococcus lactis* capaz de expressar SpaA e que apresentou capacidade protetora em camundongos. Outras proteínas da família da SpaA, como a SpaB e a SpaC também se mostraram protetoras em camundongos (To e Nagai, 2007). Também foi demonstrado que a proteína CbpB (*choline-binding protein B*) tem poder imunizante em camundongos e suínos (Shi et al., 2013).

Sabe-se que o sobrenadante de cultivos de *E. rhusiopathiae* concentrado é capaz de induzir proteção contra a bactéria, mas os antígenos responsáveis por esse efeito não são conhecidos (Shi et al., 2013). Para tentar identificar alguns desses antígenos, o sobrenadante de cultivos de *E. rhusiopathiae* foi investigado usando-se uma abordagem imunoproteômica chamada SERPA (*SERological Proteome Analysis*) (Marquioni, 2015). O procedimento, que é mostrado esquematicamente na Figura 4, consistiu em precipitar as proteínas presentes no sobrenadante de cultivos *in vitro* de *E. rhusiopathiae*, separá-las por eletroforese 2D e submeter os géis bidimensionais a um *western blot*, usando como fonte de anticorpos o soro de suínos imunizados contra a erisipela com uma vacina comercial. Os *spots* imunorreativos deviam conter proteínas antigênicas da bactéria, que foram então identificadas por espectrometria de massas.

Figura 4. Experimentos de imunoproteômica (SERPA) para identificação de proteínas potencialmente antigênicas no sobrenadante de cultivos de *E. rhusiopathiae*



Fonte: autor

Esses experimentos permitiram que se obtivesse uma lista de proteínas candidatas a antígenos, as quais podem ser clonadas e expressas em um sistema heterólogo. Cada proteína expressa e purificada pode então ser avaliada quanto ao seu caráter antigênico e protetor contra *E. rhusiopathiae*. Aquelas que apresentarem efeito protetor podem ser incorporadas em uma nova vacina contra o patógeno.

1.3 Aptâmeros

A identificação de *E. rhusiopathiae* em amostras ambientais e clínicas (não apenas de suínos e seres humanos, mas também de outros animais de criação e selvagens) pode ser feita por métodos microbiológicos, como o cultivo em meios seletivos e a avaliação de características bioquímicas (Reboli e Farrar, 1992). Diversos meios de cultura foram propostos para o isolamento e identificação da bactéria: ESB (*Erysipelothrix Selective Broth*), MBA (*Modified Blood Azide medium*), BHI (*Brain Heart Infusion*), meio de Packer, meio de Bohm, meio de Shimoji, entre outros (Wang et al., 2010; Tang et al., 2016). A maioria dos meios de cultivo para *E. rhusiopathiae* inclui antibióticos como canamicina, vancomicina e neomicina, aos

quais a bactéria é resistente. *E. rhusiopathiae* é alfa-hemolítica em ágar-sangue (mas nunca beta-hemolítica), e catalase e oxidase negativa, e a maioria das linhagens é capaz de produzir H₂S (Reboli e Farrar, 1992; Jones, 1986; Vickers e Bierer, 1958).

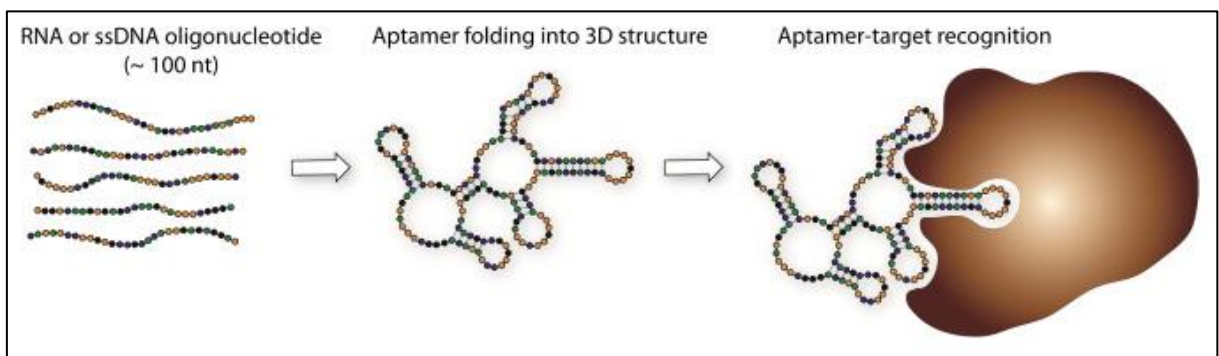
E. rhusiopathiae também pode ser detectada por métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em PCR. O método de PCR desenvolvido por Makino et al. (1994) possui um limite de detecção de 20 células, mas não é capaz de diferenciar *E. rhusiopathiae* de *E. tonsillarum*, ao contrário do método de Yamazaki (2006), que usa PCR multiplex. Foram desenvolvidos métodos de PCR capazes de distinguir entre diferentes linhagens de *E. rhusiopathiae* (Shiraiwa et al., 2015; Shiraiwa et al., 2017), sendo que alguns deles utilizam PCR em tempo real (Pal et al., 2010; Shen et al., 2010). Também foi desenvolvido um método para detecção de *E. rhusiopathiae* baseado na técnica LAMP (*Loop-mediated isothermal AMPLification*), que dispensa o uso de um termociclador (Yamazaki et al., 2014).

Por fim, *E. rhusiopathiae* ainda pode ser detectada por métodos sorológicos, principalmente baseados em ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Foram desenvolvidos vários métodos para detecção de *E. rhusiopathiae* por ELISA em suínos e aves de criação (Jenvey et al., 2015; Kurian et al., 2012; Takahashi et al., 2000). Shimizu et al. (2016) usaram um método baseado em ELISA para estudar a presença de *E. rhusiopathiae* em cervos e javalis no Japão, evidenciando-os como reservatórios naturais da bactéria. Também já foram desenvolvidos ensaios que utilizam *microbeads* fluorescentes para a detecção de *E. rhusiopathiae* em suínos e em cetáceos (Melero et al., 2016; Giménez-Lirola et al., 2012).

Os métodos descritos acima são relativamente demorados e exigem para sua implantação uma infraestrutura laboratorial sofisticada e profissionais treinados: a bactéria não é particularmente fastidiosa, mas métodos microbiológicos exigem o preparo de meios de cultura e manipulação em condições assépticas; o uso de métodos moleculares exige equipamentos e reagentes de alto custo; e métodos sorológicos costumam ser indiretos, detectando não o patógeno em si, mas anticorpos contra o mesmo. Há a necessidade de se desenvolverem novos métodos de detecção de *E. rhusiopathiae*, preferencialmente rápidos e de baixo custo.

Uma tecnologia que poderia ser utilizada no desenvolvimento de novos sistemas de detecção para *E. rhusiopathiae* são os aptâmeros. Aptâmeros (do latim, *aptus*, “ajuste”, e do grego, *meros*, “parte”) são pequenas moléculas de DNA ou RNA em fita simples capazes de assumir uma conformação tridimensional que permite sua interação com um composto alvo, com alta afinidade e especificidade (Stoltenburg et al., 2007) (Figura 5).

Figura 5. Reconhecimento de um composto alvo por um aptâmero



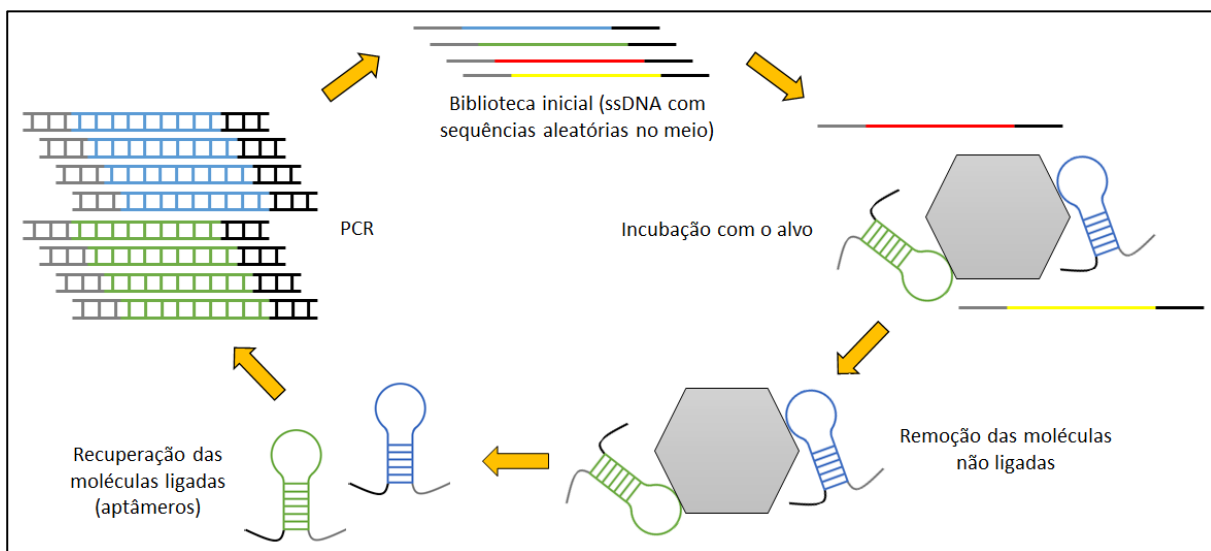
Fonte: Darmostuk et al., 2015

Aptâmeros são gerados *in vitro* por meio de uma técnica chamada SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). A SELEX foi relatada na literatura pela primeira vez em 1990, em duas publicações independentes, nas quais os autores trabalharam com aptâmeros de RNA (Tuerk e Gold, 1990; Ellington e Szostak, 1990). Na SELEX feita com DNA, usa-se uma biblioteca de ssDNA (*single-stranded DNA*) com cerca de 100 nt, contendo sequências fixas nas extremidades 5' e 3' e uma sequência aleatória na região central. Graças à diversidade de sequências dessa região, as moléculas da biblioteca podem se dobrar em diferentes estruturas tridimensionais, algumas das quais devem ser capazes de interagir com o composto alvo de interesse. Já as regiões fixas nas extremidades 5' e 3' permitem que a biblioteca seja amplificada por PCR.

A biblioteca é incubada com o composto alvo de interesse, permitindo que algumas de suas moléculas se liguem a ele. As moléculas não ligantes são então removidas e as ligantes, recuperadas e amplificadas por PCR. Esses procedimentos constituem o primeiro ciclo da SELEX. O produto de PCR deve ser então convertido novamente em fita simples e usado para iniciar o ciclo seguinte (Figura 6). Após 5-

15 ciclos, a biblioteca deve ter sido enriquecida em moléculas com capacidade de se ligar ao alvo, que são os aptâmeros. Após a amplificação do último ciclo, os aptâmeros são clonados em *E. coli*, o que permite sua individualização. Cada clone obtido deve conter um aptâmero “monoclonal” (em oposição aos aptâmeros “policlonais” obtidos ao final da SELEX) que pode então ser re-amplificado, sequenciado e caracterizado (Stoltenburg et al., 2007).

Figura 6. SELEX



Fonte: autor

Aptâmeros apresentam várias vantagens em relação a anticorpos: são gerados em menor tempo e *in vitro*, ou seja, não exigem hospedeiros animais para sua produção; possuem maior uniformidade entre lotes; podem ser facilmente marcados com fluoróforos ou *tags* para captura (biotina, digoxigenina, etc); podem ser selecionados em condições ajustáveis (pH, temperatura, força iônica); podem ser clonados e sequenciados; e podem ser gerados contra alvos tóxicos ou não antigênicos (Ku et al., 2015). De fato, já foram gerados aptâmeros contra íons inorgânicos, como Na^+ (Zhou et al., 2016), pequenos compostos orgânicos, como dopamina (Azadbakht et al., 2016), nucleotídeos, como cAMP (Zhao et al., 2015), aminoácidos, como L-triptofano (Yang et al., 2015), antibióticos, como canamicina (Ha et al., 2017), proteínas, como a metiltransferase do vírus da encefalite japonesa (Han e Lee, 2017), e células inteiras.

No caso da SELEX feita contra células inteiras, a técnica recebe o nome de cell-SELEX (Sefah et al., 2010) e os alvos são compostos inicialmente desconhecidos presentes na superfície celular. A separação das moléculas não ligadas pode ser feita por centrifugação das células incubadas com o ssDNA: as moléculas não ligadas permanecem no sobrenadante, enquanto que as ligadas podem ser recuperadas do *pellet*. Para garantir a especificidade dos aptâmeros selecionados, podem ser conduzidos ciclos de seleção negativa, ou seja, usando-se células diferentes da linhagem de interesse. Nesses ciclos, coleta-se o sobrenadante da centrifugação, não o *pellet*.

A técnica de cell-SELEX foi usada para desenvolver aptâmeros para diversas bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus* (Ramlal et al., 2018), *Neisseria meningitidis* (Mirzakhani et al., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (Soundy e Day, 2017), *Escherichia coli* O157:H7 (Amraee et al., 2017), *Salmonella enterica* Typhimurium (Lavu et al., 2016), *Haemophilus influenzae* (Bitaraf et al., 2016), *Streptococcus pyogenes* (Hamula et al., 2016), entre outros. Entretanto, não foram encontrados na literatura relatos de aptâmeros selecionados contra *E. rhusiopathiae*. Aptâmeros podem ser utilizados em substituição a anticorpos em diversos procedimentos analíticos: *western blot*, ELISA, dispositivos imunocromatográficos, biossensores, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (Forier et al., 2017; Castro et al., 2017; Lee et al., 2015; Kim et al., 2016; Chen e Yang, 2015). Aptâmeros capazes de se ligar a *E. rhusiopathiae* poderiam ser incorporados futuramente em dispositivos para detecção rápida do patógeno.

6 Conclusões

Este trabalho teve como objetivos a expressão recombinante de proteínas da bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* candidatas a antígenos e a seleção de aptâmeros contra esse patógeno por cell-SELEX.

Dentre as 11 proteínas candidatas a antígenos selecionadas, 5 puderam ser expressas e purificadas para uma avaliação de seu caráter antigênico e 2 delas apresentaram um provável efeito protetor em ensaios de imunização de camundongos, o que as torna promissoras como antígenos vacinais contra a erisipela suína. Além disso, os resultados obtidos apontam que a abordagem imunoproteômica utilizada é válida para a busca por proteínas antigênicas.

A seleção de aptâmeros parece ter sido altamente estrigente, pois apenas 6 sequências foram obtidas após o sequenciamento de 20 clones selecionados aleatoriamente, os quais puderam ser agrupados em apenas 3 famílias, com sequências altamente similares dentre as sequências de uma mesma família.

7 Perspectivas

Futuramente, o ensaio de imunização de camundongos poderá ser repetido usando-se no desafio um inóculo intermediário entre os que foram utilizados aqui (1.000 e 10.000 células por animal), permitindo que se observe melhor o efeito protetor dessas proteínas. Caso se confirme a capacidade imunizante dessas proteínas contra *E. rhusiopathiae*, estas poderão ser incorporadas no futuro em uma nova vacina veterinária contra a erisipela suína. Também poderão ser realizados estudos de otimização dessa vacina, variando-se a quantidade de proteína e o número de doses e testando-se combinações entre as duas proteínas.

Quanto aos aptâmeros, agora que suas sequências são conhecidas, eles poderão ser sintetizados novamente e então caracterizados por citometria de fluxo ou outro método, como PCR em tempo real. Aptâmeros que se mostrarem promissores poderão ser utilizados em novos dispositivos para a detecção de *E. rhusiopathiae*.

8 Referências bibliográficas

- Alawdah, Laila S., Jaime N. Campbell, Nira Pollock, and Paula I. Watnick. 2017. "Erysipelothrix Rhusiopathiae Suppurative Arthritis in a 12-Year-Old Boy After an Unusual Fresh Water Exposure." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 36 (4):431–33. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001461>.
- Amraee, Masoum, Mana Oloomi, Afsaneh Yavari, and Saeid Bouzari. 2017. "DNA Aptamer Identification and Characterization for E. Coli O157 Detection Using Cell Based SELEX Method." *Analytical Biochemistry* 536 (November):36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.08.005>.
- Asimaki, E., O. Nolte, G. Overesch, and C. Strahm. 2017. "A Dangerous Hobby? Erysipelothrix Rhusiopathiae Bacteremia Most Probably Acquired from Freshwater Aquarium Fish Handling." *Infection* 45 (4):557–62. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0966-z>.
- Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), Relatório Anual 2017. Disponível em http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf
- Azadbakht, Azadeh, Mahmoud Roushani, Amir Reza Abbasi, and Zohreh Derikvand. 2016. "Design and Characterization of Electrochemical Dopamine-Aptamer as Convenient and Integrated Sensing Platform." *Analytical Biochemistry* 507:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.04.022>.
- Bender, J. S., H. G. Shen, C. K. Irwin, K. J. Schwartz, and T. Opriessnig. 2010. "Characterization of Erysipelothrix Species Isolates from Clinically Affected Pigs, Environmental Samples, and Vaccine Strains from Six Recent Swine Erysipelas Outbreaks in the United States." *Clinical and Vaccine Immunology* 17 (10):1605–11. <https://doi.org/10.1128/CVI.00206-10>.
- Bender, Joseph S., Christa K. Irwin, Hui-Gang Shen, Kent J. Schwartz, and Tanja Opriessnig. 2011. "Erysipelothrix Spp. Genotypes, Serotypes, and Surface Protective Antigen Types Associated with Abattoir Condemnations." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23 (1):139–42. <https://doi.org/10.1177/104063871102300126>.
- Bitaraf, F. S., I. Rasooli, and S. L. Mousavi Gargari. 2016. "DNA Aptamers for the Detection of Haemophilus Influenzae Type B by Cell SELEX." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 35 (3):503–10. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2567-7>.
- Bonnetblanc, Jean-Marie, and Christophe Bédane. 2003. "Erysipelas: Recognition and Management." *American Journal of Clinical Dermatology* 4 (3):157–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12627991>.
- Borathybay, Entomack, Feng-Juan Gong, Lei Zhang, and Wulumuhan Nazierbieke. 2015. "Role of Surface Protective Antigen A in the Pathogenesis of Erysipelothrix Rhusiopathiae Strain C43065." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (2):206–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25223326>.
- Brooke, C. Josephine, and Thomas V. Riley. 1999. "Erysipelothrix Rhusiopathiae: Bacteriology, Epidemiology and Clinical Manifestations of an Occupational Pathogen." *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-9-789>.
- Chen, Ailiang, and Shuming Yang. 2015. "Replacing Antibodies with Aptamers in Lateral Flow Immunoassay." *Biosensors and Bioelectronics* 71 (September):230–42. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.041>.
- Cheun, H. I., K. Kawamoto, M. Hiramatsu, H. Tamaoki, T. Shirahata, S. Igimi, and S. I. Makino. 2004. "Protective Immunity of SpaA-Antigen Producing Lactococcus Lactis against Erysipelothrix Rhusiopathiae Infection." *Journal of Applied Microbiology* 96 (6):1347–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02283.x>.
- Darmostuk, Mariia, Silvie Rimpelova, Helena Gbelcova, and Tomas Ruml. 2015. "Current Approaches in SELEX: An Update to Aptamer Selection Technology." *Biotechnology Advances* 33 (6):1141–61. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>.
- Ding, Yi, Dongmei Zhu, Jianmin Zhang, Longsheng Yang, Xiangru Wang, Huanchun Chen, and Chen Tan. 2015. "Virulence Determinants, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Profiles of Erysipelothrix Rhusiopathiae Strains Isolated from China." *Emerging Microbes and Infections* 4. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.69>.
- Eamens, G, W Forbes, and S Djordjevic. 2006. "Characterisation of Erysipelothrix Rhusiopathiae Isolates from Pigs Associated with Vaccine Breakdowns." *Veterinary Microbiology* 115 (4):329–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.015>.
- Eamens, G J. 1988. "Pathogenicity of Field Isolates of Erysipelothrix Rhusiopathiae in Mice, Rats and Pigs." *Australian Veterinary Journal* 65 (9):280–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3190598>.
- Ellington, Andrew D., and Jack W. Szostak. 1990. "In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific

- Ligands." *Nature* 346 (6287):818–22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- Forier, Cynthia, Egisto Boschetti, Mohamed Ouhammouch, Agnès Cibiel, Frédéric Ducongé, Michel Nogr , Michel Tellier, et al. 2017. "DNA Aptamer Affinity Ligands for Highly Selective Purification of Human Plasma-Related Proteins from Multiple Sources." *Journal of Chromatography A* 1489 (March):39–50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.031>.
- Gim nez-Lirola, L.G., C.T. Xiao, P.G. Halbur, and T. Opriessnig. 2012. "Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Recombinant SpaA Protein (rSpaA415) for Detection of Anti-Erysipelothrix Spp. IgG Antibodies in Pigs." *Journal of Microbiological Methods* 91 (1):191–97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.011>.
- Gomes de Castro, Maria Angela, Claudia H bartner, and Felipe Opazo. 2017. "Aptamers Provide Superior Stainings of Cellular Receptors Studied under Super-Resolution Microscopy." Edited by Vittorio de Franciscis. *PLOS ONE* 12 (2). Public Library of Science:e0173050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173050>.
- Groschup, M H, and J F Timoney. 1990. "Modified Feist Broth as a Serum-Free Alternative for Enhanced Production of Protective Antigen of Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Journal of Clinical Microbiology* 28 (11). American Society for Microbiology (ASM):2573–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2254434>.
- Ha, Na-Reum, In-Pil Jung, Im-Joung La, Ho-Sup Jung, and Moon-Young Yoon. 2017. "Ultra-Sensitive Detection of Kanamycin for Food Safety Using a Reduced Graphene Oxide-Based Fluorescent Aptasensor." *Scientific Reports* 7 (January). Nature Publishing Group:40305. <https://doi.org/10.1038/srep40305>.
- Hamula, Camille L.A., Hanyong Peng, Zhixin Wang, Gregory J. Tyrrell, Xing-Fang Li, and X. Chris Le. 2016. "An Improved SELEX Technique for Selection of DNA Aptamers Binding to M-Type 11 of Streptococcus Pyogenes." *Methods* 97 (March):51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.12.005>.
- Han, Seung Ryul, and Seong Wook Lee. 2017. "Inhibition of Japanese Encephalitis Virus (JEV) Replication by Specific RNA Aptamer against JEV Methyltransferase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483 (1):687–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.081>.
- Imada, Y, N Goji, H Ishikawa, M Kishima, and T Sekizaki. 1999. "Truncated Surface Protective Antigen (SpaA) of Erysipelothrix Rhusiopathiae Serotype 1a Elicits Protection against Challenge with Serotypes 1a and 2b in Pigs." *Infection and Immunity* 67 (9):4376–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456877>.
- Imada, Yumiko, Ai Takase, Reiko Kikuma, Yoshifumi Iwamaru, Shigehiro Akachi, and Y ji Hayakawa. 2004. "Serotyping of 800 Strains of Erysipelothrix Isolated from Pigs Affected with Erysipelas and Discrimination of Attenuated Live Vaccine Strain by Genotyping." *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5):2121–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131179>.
- Ingebritson, Alaina L., James A. Roth, and Paul J. Hauer. 2010. "Erysipelothrix Rhusiopathiae: Association of Spa-Type with Serotype and Role in Protective Immunity." *Vaccine* 28 (13):2490–96. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.041>.
- Jenvey, Caitlin J., Michael P. Reichel, and Peter D. Cockcroft. 2015. "Erysipelothrix Rhusiopathiae and Mycoplasma Hyopneumoniae." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27 (2):211–16. <https://doi.org/10.1177/1040638714568111>.
- Jones, D., 1986. Genus Erysipelothrix Rosenbach 367a. In: Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1245–1249.
- Ku, Ti Hsuan, Tiantian Zhang, Hua Luo, Tony M. Yen, Ping Wei Chen, Yuanyuan Han, and Yu Hwa Lo. 2015. "Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing." *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s150716281>.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular Biology and Evolution* 33 (7):1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Kurian, A, EJ Neumann, WF Hall, and N Christensen. 2012. "Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Serological Detection of Exposure of Poultry in New Zealand to Erysipelothrix Rhusiopathiae and Their Serological Response to Vaccination." *New Zealand Veterinary Journal* 60 (2):100–105. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.639057>.
- Kwok, Amy Hy, Yufeng Li, Jingwei Jiang, Ping Jiang, and Frederick C. Leung. 2014. "Complete Genome Assembly and Characterization of an Outbreak Strain of the Causative Agent of Swine Erysipelas - Erysipelothrix Rhusiopathiae SY1027." *BMC Microbiology* 14 (1):1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-176>.

- Lavu, Padma Sudha Rani, Bhairab Mondal, Shylaja Ramlal, Harishchandra Sreepathy Murali, and Harsh Vardhan Batra. 2016. "Selection and Characterization of Aptamers Using a Modified Whole Cell Bacterium SELEX for the Detection of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium." *ACS Combinatorial Science* 18 (6):292–301. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.5b00123>.
- Lee, Kyeong-Ah, Ji-Young Ahn, Sang-Hee Lee, Simranjeet Singh Sekhon, Dae-Ghon Kim, Jiho Min, and Yang-Hoon Kim. 2015. "Aptamer-Based Sandwich Assay and Its Clinical Outlooks for Detecting Lipocalin-2 in Hepatocellular Carcinoma (HCC)." *Scientific Reports* 5 (June). Nature Publishing Group:10897. <https://doi.org/10.1038/srep10897>.
- Li, Yufeng, Yao Zou, Yuting Xia, Juan Bai, Xianwei Wang, and Ping Jiang. 2016. "Proteomic and Transcriptomic Analyses of Swine Pathogen *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Reveal Virulence Repertoire." Edited by Michael Hensel. *PLOS ONE* 11 (8):e0159462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159462>.
- Lim, Sooyeon, Moon Soo Rhee, Dong Ho Chang, and Byoung Chan Kim. 2016. "Whole-Genome Sequence of *Erysipelothrix Larvae* LV19T(=KCTC 33523T), a Useful Strain for Arsenic Detoxification, from the Larval Gut of the Rhinoceros Beetle, *Trypoxylus Dichotomus*." *Journal of Biotechnology* 223. Elsevier B.V.:40–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.030>.
- Makino, S, Y Okada, T Maruyama, K Ishikawa, T Takahashi, M Nakamura, T Ezaki, and H Morita. 1994. "Direct and Rapid Detection of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* DNA in Animals by PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 32 (6). American Society for Microbiology (ASM):1526–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521358>.
- Makino, S, K Yamamoto, S Murakami, T Shirahata, K Uemura, T Sawada, H Wakamoto, H Morita, and Y Morita. 1998. "Properties of Repeat Domain Found in a Novel Protective Antigen, SpaA, of *Erysipelothrix Rhusiopathiae*." *Microbial Pathogenesis* 25 (2):101–9. <https://doi.org/10.1006/mpat.1998.0216>.
- Marquioni, Vinicius. 2015. Immunoproteomics of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: search for new antigens for recombinant vaccines. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de São Carlos.
- Marton, Soledad, Fernanda Cleto, Marco Aurélio Krieger, and Josiane Cardoso. 2016. "Isolation of an Aptamer That Binds Specifically to *E. Coli*." *PLoS ONE* 11 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153637>.
- Melero, M, LG Giménez-Lirola, C Rubio-Guerri, JL Crespo-Picazo, E Sierra, D García-Párraga, FJ García-Peña, et al. 2016. "Fluorescent Microbead-Based Immunoassay for Anti-*Erysipelothrix Rhusiopathiae* Antibody Detection in Cetaceans." *Diseases of Aquatic Organisms* 117 (3):237–43. <https://doi.org/10.3354/dao02948>.
- Mirzakhani, Kimia, Seyed Latif Mousavi Gargari, Iraj Rasooli, and Samaneh Rasoulnejad. 2017. "Development of a DNA Aptamer for Screening *Neisseria Meningitidis* Serogroup B by Cell SELEX." *Iranian Biomedical Journal*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28941453>.
- Moon, Jihea, Giyoung Kim, Sangdae Lee, and Saetbyeol Park. 2013. "Identification of *Salmonella Typhimurium*-Specific DNA Aptamers Developed Using Whole-Cell SELEX and FACS Analysis." *Journal of Microbiological Methods* 95 (2). Elsevier B.V.:162–66. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.005>.
- Moon, Jihea, Giyoung Kim, Saet Byeol Park, Jongguk Lim, and Changyeun Mo. 2015. "Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of *Staphylococcus Aureus*-Specific DNA Aptamers." *Sensors (Switzerland)* 15 (4):8884–97. <https://doi.org/10.3390/s150408884>.
- Nagai, Shinya, Ho To, and Akira Kanda. 2008. "Differentiation of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Strains by Nucleotide Sequence Analysis of a Hypervariable Region in the *spaA* Gene: Discrimination of a Live Vaccine Strain from Field Isolates." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20 (3):336–42. <https://doi.org/10.1177/104063870802000313>.
- Nazierbieke, Wulumuhan, Lei Zhang, Cui He, Qingzhong Peng, and Entomack Borrathybay. 2010. "[Immunity of Native SpaA and Recombinant SpaA-N against *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Infection in Mice]." *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica* 50 (3):367–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20499642>.
- Noguchi, N, M Sasatsu, T Takahashi, K Ohmae, N Terakado, and M Kono. 1993. "Detection of Plasmid DNA in *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Isolated from Pigs with Chronic Swine Erysipelas." *The Journal of Veterinary Medical Science* 55 (2):349–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8513023>.
- Ogawa, Yohsuke, Tadasuke Ooka, Fang Shi, Yoshitoshi Ogura, Keisuke Nakayama, Tetsuya Hayashi, and Yoshihiro Shimoji. 2011. "The Genome of *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, the Causative Agent of Swine Erysipelas, Reveals New Insights into the Evolution of Firmicutes and the Organism's Intracellular Adaptations." *Journal of Bacteriology* 193 (12):2959–71. <https://doi.org/10.1128/JB.01500-10>.
- Ogawa, Yohsuke, Kazumasa Shiraiwa, Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Sayaka Nishikawa, Masahiro Eguchi, Tetsuya Hayashi, and Yoshihiro Shimoji. n.d. "Clonal Lineages of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Responsible

- for Acute Swine Erysipelas in Japan Identified by Using Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Analysis." Accessed January 11, 2018. <https://doi.org/10.1128/AEM>.
- Okonechnikov, Konstantin, Olga Golosova, and Mikhail Fursov. 2012. "Unipro UGENE: A Unified Bioinformatics Toolkit." *Bioinformatics* 28 (8). Oxford University Press:1166–67. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- Opriessnig, T., L. J. Hoffman, D. L. Harris, S. B. Gaul, and P. G. Halbur. 2004. "Erysipelothrix Rhusiopathiae: Genetic Characterization of Midwest US Isolates and Live Commercial Vaccines Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16 (2):101–7. <https://doi.org/10.1177/104063870401600202>.
- Pal, N., J.S. Bender, and T. Opriessnig. 2010. "Rapid Detection and Differentiation of Erysipelothrix Spp. by a Novel Multiplex Real-Time PCR Assay." *Journal of Applied Microbiology* 108 (3):1083–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04560.x>.
- Petersen, Thomas Nordahl, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, and Henrik Nielsen. 2011. "SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions." *Nature Methods* 8 (10):785–86. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- Polz, M F, and C M Cavanaugh. 1998. "Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10):3724–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9758791>.
- Ramlal, Shylaja, Bhairab Mondal, Padma Sudharani Lavu, Bhavanashri N., and Joseph Kingston. 2018. "Capture and Detection of Staphylococcus Aureus with Dual Labeled Aptamers to Cell Surface Components." *International Journal of Food Microbiology* 265 (January):74–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.002>.
- Rawlings, Neil D, Alan J Barrett, and Robert Finn. 2016. "Twenty Years of the MEROPS Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors." *Nucleic Acids Research* 44 (D1). Oxford University Press:D343–50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118>.
- Reboli, A. C., and W. E. Farrar. 1989. "Erysipelothrix Rhusiopathiae: An Occupational Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.354>.
- Reboli, A.C., Farrar, W.E., 1992. The genus Erysipelothrix. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. (Eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer-Verlag, New York, pp. 1629–1642.
- Sefah, Kwame, Dihua Shangguan, Xiangling Xiong, Meghan B. O'Donoghue, and Weihong Tan. 2010. "Development of DNA Aptamers Using Cell-SeleX." *Nature Protocols* 5 (6):1169–85. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.66>.
- Seok Kim, Yeon, Nurul Hanun Ahmad Raston, and Man Bock Gu. 2016. "Aptamer-Based Nanobiosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 76 (February):2–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040>.
- Shen, H.G., J.S. Bender, and T. Opriessnig. 2010. "Identification of Surface Protective Antigen (Spa) Types in Erysipelothrix Reference Strains and Diagnostic Samples by Spa Multiplex Real-Time and Conventional PCR Assays." *Journal of Applied Microbiology* 109 (4):1227–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04746.x>.
- Shi, Fang, Yohsuke Ogawa, Akiyuki Sano, Tomoyuki Harada, Jiro Hirota, Masahiro Eguchi, Eiji Oishi, and Yoshihiro Shimoji. 2013. "Characterization and Identification of a Novel Candidate Vaccine Protein through Systematic Analysis of Extracellular Proteins of Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Infection and Immunity* 81 (12):4333–40. <https://doi.org/10.1128/IAI.00549-13>.
- Shimizu, Takae, Chiaki Okamoto, Hiroshi Aoki, Kazuki Harada, Yasushi Kataoka, Fumiko Ono, Mutsuyo Kadohira, and Shinji Takai. 2016. "Serological Surveillance for Antibodies against Erysipelothrix Species in Wild Boar and Deer in Japan." *The Japanese Journal of Veterinary Research* 64 (1):91–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27348892>.
- Shimoji, Y., Y. Yokomizo, T. Sekizaki, Y. Mori, and M. Kubo. 1994. "Presence of a Capsule in Erysipelothrix Rhusiopathiae and Its Relationship to Virulence for Mice." *Infection and Immunity* 62 (7):2806–10.
- Shimoji, Y, Y Mori, T Sekizaki, T Shibahara, and Y Yokomizo. 1998. "Construction and Vaccine Potential of Acapsular Mutants of Erysipelothrix Rhusiopathiae: Use of Excision of Tn916 to Inactivate a Target Gene." *Infection and Immunity* 66 (7):3250–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632592>.
- Shiraiwa, Kazumasa, Yohsuke Ogawa, Masahiro Eguchi, Hirokazu Hikono, Masahiro Kusumoto, and Yoshihiro Shimoji. 2015. "Development of an SNP-Based PCR Assay for Rapid Differentiation of a Japanese Live Vaccine Strain from Field Isolates of Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Journal of Microbiological Methods* 117

(October):11–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.07.001>.

- Shiraiwa, Kazumasa, Yohsuke Ogawa, Sayaka Nishikawa, Masahiro Eguchi, and Yoshihiro Shimoji. 2017. "Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection and Differentiation of Clonal Lineages of *Erysipelothrix Rhusiopathiae*; Serovar 1a Strains Currently Circulating in Japan." *Journal of Veterinary Medical Science* 79 (8):1318–22. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0255>.
- Soundy, Jennifer, and Darren Day. 2017. "Selection of DNA Aptamers Specific for Live *Pseudomonas Aeruginosa*." Edited by Abdelwahab Omri. *PLOS ONE* 12 (9):e0185385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185385>.
- Stackebrandt E, Reboli AC, Farrar WE. The genus *Erysipelothrix*. In: *Prokaryotes*, 4^a ed., 492–510, 2006.
- Stoltenburg, Regina, Christine Reinemann, and Beate Strehlitz. 2007. "SELEX-A (R)evolutionary Method to Generate High-Affinity Nucleic Acid Ligands." *Biomolecular Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>.
- Suh, Soo Hwan, Hari P. Dwivedi, Soo Jung Choi, and Lee Ann Jaykus. 2014. "Selection and Characterization of DNA Aptamers Specific for *Listeria* Species." *Analytical Biochemistry* 459. Elsevier Inc.:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.006>.
- Suh, Soo Hwan, and Lee-Ann Jaykus. 2013. "Nucleic Acid Aptamers for Capture and Detection of *Listeria* Spp." *Journal of Biotechnology* 167 (4). Elsevier B.V.:454–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.027>.
- Swan, R A, and M J Lindsey. 1998. "Treatment and Control by Vaccination of Erysipelas in Farmed Emus (*Dromaius Novohollandiae*)." *Australian Veterinary Journal* 76 (5):325–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631698>.
- Takahashi, T, M Takagi, K Yamamoto, and M Nakamura. 2000. "A Serological Survey on Erysipelas in Chickens by Growth Agglutination Test." *Journal of Veterinary Medicine, B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47 (10):797–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204134>.
- Takahaswi, Toshio, Tomohiko Fujisawa, Yutaka Tamura, Shoko Suzuki, Masatake Muramatsu, Takuo Sawl, ! Wa, and Yoshimi Benn0. 1992. "Erysipelothrix Tonsillarum." *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* 42 (3):469–73. <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/42/3/ijms-42-3-469.pdf?expires=1515718648&id=id&accname=guest&checksum=E8329FC880DE5BCD5DB12A4286342580>.
- Tan, E. M., J. R. Marcelin, N. Adeel, R. J. Lewis, M. J. Enzler, and P. K. Tosh. 2017. "Erysipelothrix Rhusiopathiae Bloodstream Infection - A 22-Year Experience at Mayo Clinic, Minnesota." *Zoonoses and Public Health* 64 (7):e65–72. <https://doi.org/10.1111/zph.12348>.
- Tang, Hai bo, Jiang Xie, Libo Wang, Fang Liu, and Jianmin Wu. 2016. "Complete Genome Sequence of Erysipelothrix Rhusiopathiae Strain GXBY-1 Isolated from Acute Swine Erysipelas Outbreaks in South China." *Genomics Data* 8. The Authors:70–71. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.04.006>.
- To, Ho, and Shinya Nagai. 2007. "Genetic and Antigenic Diversity of the Surface Protective Antigen Proteins of Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Clinical and Vaccine Immunology* 14 (7):813–20. <https://doi.org/10.1128/CVI.00099-07>.
- To, Ho, Hiroko Sato, Akihiro Tazumi, Nobuyuki Tsutsumi, Shinya Nagai, Akira Iwata, and Tetsuji Nagano. 2012. "Characterization of Erysipelothrix Rhusiopathiae Strains Isolated from Recent Swine Erysipelas Outbreaks in Japan." *The Journal of Veterinary Medical Science* 74 (7):949–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22446396>.
- Tuerk, C, and L Gold. 1990. "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase." *Science (New York, N.Y.)* 249 (4968):505–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200121>.
- Uchiyama, Mariko, Yohko Shimazaki, Yukari Isshiki, Akemi Kojima, Fumiya Hirano, Kinya Yamamoto, Mayumi Kijima, and Hidetaka Nagai. n.d. "Pathogenic Characterization of Erysipelothrix Rhusiopathiae Met-203 Type SpaA Strains from Chronic and Subacute Swine Erysipelas in Japan." Accessed January 14, 2018. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0164>.
- Verbarg, S., Holger Rheims, Sabine Emus, Anja Frühling, Reiner M Kroppenstedt, Erko Stackebrandt, and Peter Schumann. 2004. "Erysipelothrix Inopinata Sp. Nov., Isolated in the Course of Sterile Filtration of Vegetable Peptone Broth, and Description of Erysipelotrichaceae Fam. Nov." *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 54 (1):221–25. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02898-0>.

- Vickers, C L, and B W Bierer. 1958. "Triple Sugar Iron Agar as an Aid in the Diagnosis of Erysipelas." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 133 (11 Part 1):543–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13598680>.
- Wang, Qinning, Barbara J. Chang, and Thomas V. Riley. 2010. "Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.012>.
- Wang, Ya, Jingtao Li, Anding Zhang, Weifeng Zhu, Qiang Zhang, Zhongmin Xu, Shuxian Yan, Xiaomei Sun, Huanchun Chen, and Meilin Jin. 2017. "iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis Reveals Potential Virulence Factors of Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Journal of Proteomics* 160 (May):28–37. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.004>.
- Wood RL. Erysipelas. In: *Diseases of Swine*, 7th ed., 475–486, 1992.
- Xu, Chang-Wen, An-Yun Zhang, Chun-Mei Yang, Yun Pan, Zhong-Bin Guan, Chang-Wei Lei, Lin-Yao Peng, Qing-Zhou Li, and Hong-Ning Wang. 2015. "First Report of Macrolide Resistance Gene *Erm* (T) Harbored by a Novel Small Plasmid from Erysipelothrix Rhusiopathiae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (4):2462–65. <https://doi.org/10.1128/AAC.00228-15>.
- Yamazaki, Y., E. Oba, N. Kashiwagi, K. Sugita, K. Shiiba, Y. Baba, Y. Shimoji, and W. Yamazaki. 2014. "Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Simple Detection of *Erysipelothrix Rhusiopathiae*." *Letters in Applied Microbiology* 58 (4):362–69. <https://doi.org/10.1111/lam.12198>.
- Yamazaki, Yoshinao. 2006. "A Multiplex Polymerase Chain Reaction for Discriminating *Erysipelothrix Rhusiopathiae* from *Erysipelothrix Tonsillarum*." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18 (4):384–87. <https://doi.org/10.1177/104063870601800411>.
- Yang, Xiaojuan, Qingxin Han, Yange Zhang, Jiang Wu, Xiaoliang Tang, Chunxu Dong, and Weisheng Liu. 2015. "Determination of Free Tryptophan in Serum with Aptamer-Comparison of Two Aptasensors." *Talanta* 131:672–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.023>.
- Zhao, Fulin, Qingyun Xie, Mingfei Xu, Shouyu Wang, Jiyong Zhou, and Fei Liu. 2015. "RNA Aptamer Based Electrochemical Biosensor for Sensitive and Selective Detection of cAMP." *Biosensors and Bioelectronics* 66:238–43. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.024>.
- Zhou, Wenhui, Jinsong Ding, and Juewen Liu. 2016. "A Highly Specific Sodium Aptamer Probed by 2-Aminopurine for Robust Na⁺sensing." *Nucleic Acids Research* 44 (21):10377–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw845>.
- Zhu, Weifeng, Chengzhi Cai, Jingjing Huang, Liang Liu, Zhongmin Xu, Xiaomei Sun, and Meilin Jin. 2018. "Characterization of Pathogenic Roles of Two Erysipelothrix Rhusiopathiae Surface Proteins." *Microbial Pathogenesis* 114 (January):166–68. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.057>.
- Zhu, Weifeng, Chengzhi Cai, Ya Wang, Jingtao Li, Chao Wu, Chao Kang, Xiaomei Sun, and Meilin Jin. 2017. "Characterization of Roles of SpaA in Erysipelothrix Rhusiopathiae Adhesion to Porcine Endothelial Cells." *Microbial Pathogenesis* 113 (December):176–80. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.020>.
- Zhu, Weifeng, Ya Wang, Chengzhi Cai, Jingtao Li, Chao Wu, Chao Kang, and Meilin Jin. 2017. "Erysipelothrix Rhusiopathiae Recruits Host Plasminogen via the Major Protective Antigen SpaA." *FEMS Microbiology Letters* 364 (5):1–5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx036>.
- Zhu, Weifeng, Qiang Zhang, Jingtao Li, Yanmin Wei, Chengzhi Cai, Liang Liu, Zhongmin Xu, and Meilin Jin. 2017. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Acts as an Adhesin in Erysipelothrix Rhusiopathiae Adhesion to Porcine Endothelial Cells and as a Receptor in Recruitment of Host Fibronectin and Plasminogen." *Veterinary Research* 48 (1):16. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0421-x>.
- Zou, Yao, Xiaoming Zhu, Hassan Mushtaq Muhammad, Ping Jiang, and Yufeng Li. 2015. "Characterization of Erysipelothrix Rhusiopathiae Strains Isolated from Acute Swine Erysipelas Outbreaks in Eastern China." *J. Vet. Med. Sci* 77 (6):14–589. <https://doi.org/10.1292/>.
- Zuker, Michael. 2003. "Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction." *Nucleic Acids Research* 31 (13):3406–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>.