

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**CAROLINA LESSA AQUINO**

Identificação de antígenos imunodominantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni através de microarranjo de proteínas

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadores:** Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros  
Prof. Dr. Ricardo Galler

**RIO DE JANEIRO**

2013

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A657 Aquino, Carolina Lessa

Identificação de antígenos imunodominantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni através de microarranjo de proteínas / Carolina Lessa Aquino. – Rio de Janeiro, 2013.

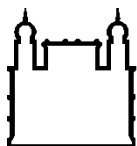
vii, 41 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 35-37

1. Leptospirose. 2. Diagnóstico. 3. Microarranjo de proteínas. 4. Sensibilidade e especificidade. I. Título.

CDD 616.959



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**CAROLINA LESSA AQUINO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNODOMINANTES EM *Leptospira interrogans* SOROVAR COPENHAGENI ATRAVÉS DE MICROARRANJO DE PROTEÍNAS**

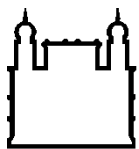
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros**  
**Prof. Dr. Ricardo Galler**

**Aprovada em: 17/12/2013**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marco Aurelio Krieger - Presidente**  
**Prof. Dr. Odir Dellagostin – Revisor e membro**  
**Prof. Dr. Fábio Faria da Mota - Membro**  
**Profa. Dra. Ana Gisele da Costa Neves Ferreira - Suplente**  
**Prof. Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza – Suplente**

Rio de Janeiro, 17 de dezembro de 2013

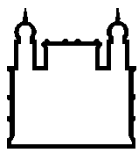


Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Aos meus pais, avós e esposo.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

#### **AGRADECIMENTOS**

Às instituições envolvidas nesse projeto: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos/Fiocruz; Instituto Oswaldo Cruz, IOC/Fiocruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, CPqGM/Fiocruz; Yale University, New Haven/EUA e University of California Irvine, Irvine/EUA .

Aos orientadores Dr. Marco Alberto Medeiros e Dr. Ricardo Galler, pela amizade, orientação, apoio e confiança.

Aos Drs. Guilherme Ribeiro e Albert Ko, também pela orientação e confiança.

Ao Dr. Philip Felgner, pela orientação, receptividade e conhecimentos passados durante o período em que estive em seu laboratório.

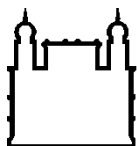
À toda a equipe do Dr. Felgner, em especial a Jozelyn Pablo, Rie Sasaki and Christopher Hung por toda ajuda, amizade e adorável convivência.

À equipe do Laboratório de Tecnologia Recombinante, pela amizade e agradável convivência desde que entrei no laboratório.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e se fizeram presentes ao longo dessa trajetória mesmo quando distantes fisicamente.

Aos meus pais e avós, por acreditarem em mim, pela confiança, investimento, por todo amor e carinho e por superarem a saudade em prol do meu crescimento profissional.

Ao meu marido, pelo amor, carinho, compreensão, por ser minha fortaleza ao longo desses quase 3 anos.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

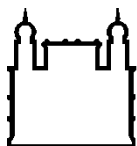
### **IDENTIFICACAO DE ANTIGENOS IMUNODOMINANTES EM *Leptospira interrogans* SOROVAR COPENHAGENI ATRAVES DE MICROARRANJO DE PROTEÍNAS**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carolina Lessa Aquino**

A leptospirose é uma doença zoonótica causada por bactérias do gênero *Leptospira* sp. A ausência de um teste diagnóstico rápido e confiável dificulta o diagnóstico precoce e o acesso ao impacto da leptospirose na saúde pública. O Teste de Microaglutinação, considerado padrão-ouro pela Organização Mundial de Saúde, é realizado em poucos laboratórios de referência no mundo e, apesar de altamente específico, apresenta baixa sensibilidade na fase inicial da doença. O objetivo do presente estudo foi identificar novos alvos proteicos a serem empregados como marcadores diagnósticos para leptospirose. Para tal, foi construído um microarranjo de proteínas compreendendo 61% do genoma codificante de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e investigou-se a resposta por anticorpos IgG de 274 indivíduos, sendo 80 pacientes em fase aguda da doença, 80 em fase convalescente e 114 indivíduos saudáveis provenientes de área com transmissão endêmica e não endêmica para doença. Foram encontrados 16 antígenos capazes de identificar casos agudos de leptospirose e 18 capazes identificar casos convalescentes. Entre estes, antígenos como LipL32 e os domínios das proteínas Lig já foram previamente descritos como sendo reconhecidos por soros de pacientes humanos, atuando como prova de conceito para a plataforma de microarranjo proteico. Novos antígenos também foram identificados no estudo, como a proteína hipotética LIC10215, que mostrou alta acurácia na identificação de casos agudos e convalescentes de leptospirose. Os antígenos imunodominantes identificados demonstram potencial uso no desenvolvimento de novos ensaios diagnósticos e no melhoramento dos testes diagnósticos disponíveis no mercado. Estudos complementares serão realizados para avaliar o desempenho desses antígenos nos formatos de ELISA e/ou de teste rápido.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

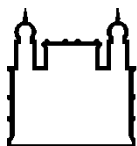
### **IDENTIFICATION OF IMMUNODOMINANT ANTIGENS IN *Leptospira interrogans* SEROVAR COPENHAGENI USING A PROTEIN MICROARRAY APPROACH**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carolina Lessa Aquino**

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Leptospira* sp. The lack of a rapid and reliable point-of-care diagnostic test is a major barrier not only to assess the global burden of the disease but also to provide an early diagnosis. Despite the high specificity of the microagglutination test, which is the gold standard test for diagnosing leptospirosis according to the World Health Organization, it presents low sensitivity and is performed in few reference laboratories worldwide. Therefore, the aim of this work was to identify new protein targets to be used as diagnostic markers for leptospirosis. Accordingly, we developed a protein microarray chip comprising 61% of the *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni coding genome and investigated the IgG response of 274 individuals, including 80 convalescent- and 80 acute-phase patients and 114 healthy individuals from areas with endemic and non-endemic transmission of the disease. We found 16 antigens that identified acute leptospirosis cases and 18 antigens that identified convalescent cases. Among these antigens are LipL32 and the unique domains of the Lig proteins, which have already been described as seroreactive antigens among leptospirosis patients, thus acting as a proof-of-concept for the protein microarray platform. Novel antigens were also identified in this study, such as the hypothetical protein LIC10215, that showed high diagnostic accuracy for both acute and convalescent cases. The immunodominant antigens identified here are potential candidates for the development of new diagnostic assays as well as for the improvement of currently available tests. Further studies are needed to evaluate their performance in ELISA and rapid test platforms.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **SUMÁRIO**

Introdução.....	01
Classificação e biologia do micro-organismo.....	01
Patogenia e imunidade do hospedeiro.....	02
Aspectos epidemiológicos.....	04
Manifestações clínicas e impacto na saúde pública.....	06
Vacina e diagnóstico para leptospirose.....	08
Sítio de estudo da leptospirose em Salvador/BA, Brasil.....	12
Análises de proteínas em larga escala para estudos sorológicos.....	13
Objetivos.....	15
Capítulo I.....	16
Discussão.....	30
Conclusões.....	34
Referências bibliográficas.....	35
Anexo I.....	38
Anexo II.....	39



## I. INTRODUÇÃO

### I.a) Classificação e biologia do micro-organismo

O gênero *Leptospira* pertence ao filo Spirochaetes e inclui espécies saprofitas e patogênicas. Espécies saprofitas, como *Leptospira biflexa*, são organismos de vida livre encontrados no solo e na água e, diferentemente das espécies patogênicas, não infectam hospedeiros animais (1, 2). A classificação das espécies empregada atualmente baseia-se na relação genética e indica a existência de pelo menos 19 espécies de leptospira: 13 patogênicas e 6 saprofitas. Sete das espécies patogênicas constituem os principais agentes da leptospirose humana e animal, são elas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* and *L. alexanderi* (2).

As espécies reconhecidas atualmente são categorizadas em 24 sorogrupos e mais de 200 sorovares. Tal classificação leva em consideração a heterogeneidade estrutural do carboidrato do lipopolissacarídeo (LPS). As diferenças estruturais no carboidrato do LPS determina a diversidade antigênica entre os inúmeros grupos de sorovar e sorovares contendo determinantes antigênicos semelhantes são classificados em um mesmo sorogrupo (2). Embora os sorogrupos não apresentem relação taxonômica, são extremamente úteis para o entendimento de aspectos epidemiológicos da leptospirose (2, 3).

As leptospiras são bactérias delgadas (6 a 20 µm de extensão por 0,15 µm de diâmetro), que compartilham características de bactérias Gram negativas – como presença de membrana externa, espaço periplasmático e LPS – e de bactérias Gram positivas – como associação da membrana citoplasmática à uma espessa camada de peptidoglicano (2-5). São micro-organismos aeróbios estritos, com crescimento lento e ótimo a 30°C e que apresentam intensa motilidade através da ação de 2 flagelos, um em cada extremidade da bactéria, os quais permitem 3 diferentes tipos de movimento: progressivo, circular e ao redor do eixo central (3, 5). Podem ser diferenciadas de outras espiroquetas através da sua morfologia característica, com extremidade em forma de gancho ou ponto de interrogação (1-4).

Leptospiras são filogeneticamente relacionadas a outras espiroquetas. Em geral, o genoma compreende aproximadamente 5 Mb divididos em 2 cromossomos circulares,

um maior, com aproximadamente 4.4 Mb, e um menor, com aproximadamente 350 kb. Plasmídeos não foram reportados (4). Trata-se de um genoma relativamente extenso comparado a outras espiroquetas como *Treponema* spp. e *Borrelia* spp., indicando a habilidade das leptospiros em viverem em condições ambientais e hospedeiros diversos, como dentro do hospedeiro animal e livre no ambiente (5). No caso da cepa empregada nesse estudo, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130, o genoma foi sequenciado e anotado pelo nosso grupo (6), evidenciando um cromossomo maior, com aproximadamente 4,3 Mb e 3399 sequências codificantes (CDS, do inglês, “coding sequences”) e o cromossomo menor, com aproximadamente 350 kb com 268 CDSs.

### **I.b) Patogenia e imunidade do hospedeiro**

A leptospira penetra na pele lesionada ou nas membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta e rapidamente estabelece uma infecção sistêmica, superando as barreiras teciduais e disseminando-se por via hematogênica (1, 2, 5). São organismos extracelulares, aeróbios obrigatórios (1, 2, 5). O processo pelo qual as leptospiros penetram na célula do hospedeiro ainda não é bem compreendido, porém a observação de leptospiros no citoplasma e nos compartimentos fagocíticos sugere que a entrada na célula hospedeira e a rápida translocação sejam possíveis mecanismos de disseminação até os órgãos alvos e de evasão da resposta imune (1, 2, 5). A presença de motilidade, quimiotaxia e determinantes de virulência como proteínas de superfície e de secreção e LPS, já foram caracterizados e estão relacionados à entrada de leptospiros patogênicas no tecido hospedeiro durante infecção e a colonização (5, 7).

Diversos candidatos a fatores de virulência já foram identificados, com potencial contribuição para a patogênese da infecção e doença. Preparados de LPS exibiram atividade biológica em ensaios para endotoxina, porém a toxicidade do LPS de leptospira é inferior a de outras bactérias Gram negativas (2, 3). A adesão de leptospiros a componentes do tecido hospedeiro e a componentes da matriz extracelular é tida como uma etapa inicial necessária à infecção e à patogênese (2, 3). Tal etapa é provavelmente necessária para as leptospiros penetrarem, disseminarem e persistirem nos tecidos do hospedeiro. Além disso, as leptospiros possuem a habilidade de atravessar os tecidos hospedeiros. O genoma desses organismos codifica uma grande variedade de hemolisinas e proteases que provavelmente facilitam esse processo (1, 7). É importante

destacar que a capacidade de hemolisinas em lisar eritrócitos e outras membranas celulares faz dessa classe de proteínas um dos potenciais fatores de virulência (2).

Os fatores de virulência identificados até o momento, com demonstração experimental, são primariamente proteínas de superfície, as quais provavelmente estão relacionadas à interação entre a bactéria e os tecidos do hospedeiro (1, 2, 8). De fato, leptospirosas patogênicas expressam um grande número de proteínas que são pelo menos parcialmente expostas na superfície e que reconhecem moléculas da matriz extracelular, incluindo, entre outras, as proteínas LigA e LigB (do inglês, “Leptospiral ImmunoGlobulin-like”), Loa22 e LipL32 (1, 2). Essas proteínas encontram-se expostas na superfície bacteriana, ligam-se a componentes da matriz extracelular do hospedeiro e são reconhecidas por soro de pacientes humanos com leptospirose. São proteínas presentes exclusivamente em espécies patogênicas de leptospirosas, à exceção de Loa22 que, embora possua um gene ortólogo na espécie saprofítica *L. biflexa*, este possui um perfil de expressão diferenciado em leptospirosas patogênicas (1, 2). A LipL32 é a proteína de superfície mais abundante na célula bacteriana, correspondendo a 75% do conjunto de proteínas de superfície do patógeno e sendo altamente conservada entre as espécies patogênicas (1, 2). As proteínas Lig, por sua vez, contêm 12 a 13 domínios imunoglobulina-símile repetidos *in tandem* (9) e também possuem alto grau de conservação entre as espécies. Seus genes correspondentes encontram-se regulados positivamente quando a bactéria é cultivada em condições fisiológicas de osmolaridade (10), reforçando sua potencial ação como determinante da virulência durante a infecção natural.

O mecanismo de resistência na infecção natural por leptospirosas é mediado principalmente pela resposta imune humoral, sendo essa resposta o mecanismo primário de imunidade na leptospirose (1-3). Essa evidência é observada através da presença de anticorpos das classes IgM e IgG no soro de pacientes que convalesceram de formas graves da doença até 6 anos após a infecção inicial (2).

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, desempenhando papel crucial no reconhecimento e eliminação de leptospirosas. Duas famílias principais de receptores desempenham papel decisivo no reconhecimento do patógeno pelo sistema imune inato hospedeiro: os receptores semelhantes ao Toll (TLR, do inglês “Toll-like receptor”) e os receptores semelhantes ao Nod (NLR, do inglês Nod-like receptor) (2, 3). Em geral, LPS de bactérias Gram negativas são capazes de ativar

TLR4, resultando em uma resposta pró-inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas. Porém, o LPS de leptospira ativa macrófagos humanos através de TLR2 ao invés de TLR4. Esse reconhecimento diferenciado é atribuído à composição incomum do lipídeo A e pode ser uma estratégia da bactéria patogênica para evitar a ativação adequada de células do sistema imune, contribuindo para o estabelecimento da infecção em humanos (3, 7).

Como as leptospiras são micro-organismos extracelulares, a imunidade adquirida depende da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento. A produção de anticorpos é importante na fagocitose da bactéria por neutrófilos e macrófagos. A fagocitose é efetiva somente quando o patógeno encontra-se opsonizado por anticorpos IgG específicos, sugerindo que o envelope externo das leptospiras possui um componente antifagocítico (1, 3). Tais anticorpos podem, ainda, aglutinar bactérias e ativar a via clássica do sistema complemento. A ativação do sistema complemento é um dos mecanismos efetores mais importantes durante as primeiras horas de infecção e as opsoninas geradas após ativação desse sistema podem também intensificar o processo de fagocitose pelas células do sistema imune inato (3).

Assim como ocorre para outras bactérias Gram negativas, os anticorpos produzidos durante a infecção por leptospira são aglutinantes e direcionados principalmente contra o LPS bacteriano (1-3). Tal fato pode ser evidenciado pela relação entre proteção e os níveis de anticorpos anti-LPS na transferência de imunidade passiva através de soro hiperimune ou de anticorpos monoclonais. Entretanto, a imunidade anti-LPS é limitada aos sorovares homólogos ou intimamente relacionados e não se sabe se a resposta por anticorpos contra outros antígenos além do LPS também conferem proteção (1, 3, 4).

As leptospiras virulentas, apesar de serem patógenos extracelulares, são micro-organismos com grande capacidade invasiva e de adesão, penetrando na célula hospedeira mais eficientemente do que as cepas não virulentas ou não patogênicas. Além disso, elas podem escapar do fagolisossomo para o citosol de macrófagos humanos, comportamento clássico de patógenos intracelulares (1, 3). Conseqüentemente, peptídeos bacterianos podem ser apresentados via MHC de classe I para linfócitos T CD8. De fato, linfócitos T CD8 específicos para peptídeos derivados de LigA foram identificados em humanos. No entanto, o papel da imunidade celular na leptospirose permanece pouco compreendido (3, 7).

### **I.c) Aspectos epidemiológicos**

A leptospirose é possivelmente a zoonose de mais ampla distribuição ao redor do mundo (4). A infecção por cepas patogênicas de leptospira geralmente ocorre através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, sendo o contato indireto geralmente através de água ou solo contaminados, onde a bactéria pode sobreviver por semanas e até meses (1, 4, 5, 8). Agregados celulares e formação de biofilme podem contribuir para sua sobrevivência no ambiente, fora do organismo hospedeiro (1). Contaminações no suprimento de água e inalação de aerossóis contaminados podem resultar em infecção através das membranas mucosas do trato respiratório superior. Em casos raros, a infecção pode ser causada por mordida de animais (4).

A incidência de leptospirose é significativamente maior em países com clima tropical do que em países com clima temperado, devido ao fato de a bactéria sobreviver por períodos mais longos em ambientes com temperatura e umidade mais elevadas. A doença é sazonal, com pico de incidência ocorrendo no verão ou no outono, nas regiões temperadas – onde a temperatura é um fator limitante para o patógeno – e durante a estação das chuvas, nas regiões tropicais (4).

A infecção humana pode ocorrer através da exposição recreativa ou ocupacional. A exposição recreativa está associada principalmente à prática de esportes aquáticos e viagens a áreas de risco (4, 8, 11). A exposição ocupacional é um fator de risco significativo para humanos. O contato indireto com animais é importante para trabalhadores da rede de esgoto, mineradores e limpadores de caixas-d'água, por exemplo. Já o contato direto se destaca como responsável pela maior parte das infecções em fazendeiros, veterinários, trabalhadores de controle de roedores, entre outros (4).

Quase todos os mamíferos podem ser portadores de leptospira, carregando a espiroqueta nos túbulos renais proximais e eliminando-as na urina (4, 5, 8). O componente essencial do ciclo de vida das cepas patogênicas de leptospira é a habilidade de estabelecerem o estado persistente de portador nos animais reservatórios. Os ratos constituem o reservatório principal na leptospirose humana, excretando altas concentrações da bactéria até meses após a infecção inicial (7). Neles, as leptospiras podem causar infecção sistêmica mas são, em seguida, eliminadas de todos os órgãos, com exceção dos túbulos renais, que são um sítio imunoprivilegiado, característica essa que contribui para o alto grau de persistência do patógeno (1).

Humanos, por outro lado, são considerados hospedeiros acidentais, desenvolvendo sinais e sintomas de leptospirose aguda e, algumas vezes, formas fatais da doença (3, 4). No entanto, não desenvolvem o estado de carreador necessário à transmissão. Raramente ocorre a transmissão direta entre humanos, porém, embora a excreção de leptospiras na urina humana tenha sido detectada meses após a recuperação do paciente. Acredita-se que o baixo pH reduza a sobrevivência da bactéria excretada (4).

A transmissão da leptospirose requer circulação contínua do patógeno entre os animais reservatórios que, por esse motivo, são comumente chamados de hospedeiros de manutenção (1), ou seja, espécie na qual a infecção é endêmica e geralmente transferida de animal para animal por contato direto. Os animais podem atuar como hospedeiros de manutenção para determinados sorovares e como hospedeiros acidentais para outros sorovares, podendo, nesse último caso, desenvolver leptospirose grave e até mesmo fatal (4).

Alguns sorovares de leptospira demonstram preferências específicas por determinados hospedeiros. É o caso, por exemplo, das cepas do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, que colonizam preferencialmente ratos (*Rattus norvegicus*) e das bactérias do sorogrupo Ballum, que colonizam preferencialmente camundongos (*Mus musculus*). Além disso, os diferentes sorovares, em geral, não causam doença nos reservatórios aos quais estão altamente adaptados (1, 5). O conhecimento da prevalência de sorovares e seus hospedeiros de manutenção é essencial para o entendimento da epidemiologia da leptospirose em uma determinada região (4).

Três padrões epidemiológicos distintos foram definidos para leptospirose (4). O primeiro ocorre nos países de clima temperado e envolve poucos sorovares de leptospira. A infecção humana quase que invariavelmente ocorre pelo contato direto com animais infectados e, nesse caso, o controle por imunização dos animais e/ou humanos seria potencialmente possível. O segundo perfil epidemiológico ocorre em áreas tropicais, com a circulação simultânea de inúmeros sorovares e a infecção humana e animal relacionada a um maior número de animais reservatórios, incluindo roedores, gado e cães. A exposição humana não é limitada por atividades ocupacionais mas sim, resultante da contaminação ambiental, particularmente durante a temporada de chuvas. Nesse caso, o controle da população de roedores, drenagem das áreas de inundação e higiene ocupacional são necessários para prevenção da leptospirose humana. Essa

categoria inclui, ainda, os surtos causados por desastres naturais, como enchentes e furacões. Na terceira configuração epidemiológica, a doença é causada principalmente por roedores no ambiente urbano. Embora esse perfil seja de menor importância na maior parte do mundo, é potencialmente importante quando a infraestrutura urbana é precária. Por esse motivo, tal tipo de infecção raramente é visto em países desenvolvidos, mas é muito comum em áreas onde há altas concentrações de favelas em países em desenvolvimento, como o Brasil (4).

#### **I.d) Manifestações clínicas e impacto na saúde pública**

A leptospirose pode apresentar uma enorme variedade de manifestações clínicas, sendo a severidade dependente da amostra do micro-organismo – como a espécie, sorovar envolvido e tamanho do inóculo – e de características do hospedeiro – como idade, saúde e situação imunológica. A infecção produz um largo espectro de manifestações clínicas, de uma doença febril auto-limitada à doença de Weil, a forma grave clássica da leptospirose. O aparecimento da doença no homem pode variar de 1 dia a 4 semanas após exposição ao patógeno e, em sobreviventes, a infecção pode persistir por meses (3-5, 12).

A apresentação clínica da leptospirose costuma ser bifásica, com uma fase aguda septicêmica que dura aproximadamente uma semana, seguida de uma fase imune, que é caracterizada pela produção de anticorpos e excreção da bactéria pela urina e desaparecimento dos sintomas (3-5, 7, 12). A maior parte das complicações, no entanto, está associada à localização do micro-organismo nos tecidos durante a fase imune e, portanto, ocorrem geralmente durante a segunda semana da infecção (4).

Os sintomas incluem dor de cabeça, calafrios, náusea e vômitos, mialgia e, menos comumente, “rash” cutâneo. No entanto, muitos dos casos documentados são brandos e autolimitados, sendo difícil o diagnóstico clínico diferencial com outras doenças infecciosas. A Síndrome de Weil, forma mais severa da doença, é caracterizada por complicações sistêmicas em vários órgãos simultaneamente, incluindo icterícia, meningite, hemorragias, disfunção hepática e renal e colapso cardiovascular. Dano vascular e lesões endoteliais foram observados em todos os órgãos afetados (2). Outra complicação é a Síndrome Pulmonar Hemorrágica, que foi associada à leptospirose em um surto na Nicarágua em 1995 e, desde então, vem sendo descrita como complicação

grave da leptospirose e importante causa de febre hemorrágica em várias regiões do mundo (13-16). A letalidade da Síndrome de Weil varia entre 5% e 15% e da Síndrome Pulmonar Hemorrágica é maior do que 50% (5, 15).

A leptospirose tem um impacto significativo na saúde pública, particularmente nos países da Ásia e Américas e possivelmente nos países da África. Estimativas recentes indicam que há mais de 500.000 casos de leptospirose por ano ao redor do mundo (11). No Brasil, 1194 casos confirmados de leptospirose foram registrados entre os meses de janeiro e maio de 2012, distribuídos pelas 5 regiões do país nas seguintes proporções: norte (184 casos), nordeste (90 casos), sudeste (536 casos), sul (367 casos) e centro-oeste (17 casos) (17). Estes números, porém, subestimam significativamente o impacto global da doença, já que a maioria dos casos reportados é relativa a manifestações graves da doença, pois a notificação é baseada na identificação de casos graves. Além disso, a leptospirose é comumente confundida com outras doenças febris de origem infecciosa devido ao amplo espectro de sinais e sintomas inespecíficos e ao fato de poucos laboratórios no mundo estarem capacitados para realizar os testes diagnósticos padronizados (8, 11).

Estudos não publicados pelo nosso grupo em Salvador/BA, Brasil, encontrou que 151 infecções ocorrem na comunidade para cada caso hospitalizado identificado por vigilância ativa. Estudos na Tailândia mostraram que a leptospirose pode representar até 20% dos casos de doença febril aguda de origem desconhecida (18). Portanto, é preciso considerar que o impacto total da leptospirose é significativamente maior que o indicado por estimativas baseadas em vigilância passiva.

Atualmente, a leptospirose é vista como uma doença emergente e vem tornando-se uma ameaça à saúde pública em países desenvolvidos. Atividades recreativas, como natação, esportes aquáticos e viagens, tornaram-se as exposições de risco predominantes (4, 8, 11, 19). Com o aumento da globalização, a doença emergiu como um importante problema de saúde relacionado a viagens. Além disso, o Painel Intergovernamental sobre as Alterações Climáticas sugeriu que muitas regiões estão susceptíveis a enchentes mais fortes e frequentes devido às mudanças climáticas que vêm ocorrendo como consequência do aquecimento global (11).

A leptospirose é uma doença negligenciada (20), o que faz com que o seu maior impacto ocorra nas populações mais pobres de países em desenvolvimento. Tradicionalmente, a leptospirose é a principal causa de mortalidade e morbidade entre



agricultores rurais de subsistência (8, 11) e vem emergindo como um problema de saúde urbana. Atualmente, 1 bilhão de pessoas reside em favelas (21), onde a falta de saneamento básico produziu condições para transmissão a partir dos ratos (22). Estima-se que a população residente em favelas duplique nos próximos 25 anos (21). Com o crescimento da população dos grandes centros urbanos, que é marginalizada e não possui acesso a serviços básicos de saúde e saneamento, é esperado que a leptospirose seja um problema de saúde global de importância crescente no futuro (11).

### **I.e) Vacina e diagnóstico para leptospirose**

A prioridade para a saúde pública é a prevenção dos desfechos graves de leptospirose. Tal prevenção pode ser alcançada, em teoria, pela erradicação das fontes de transmissão ambiental, pelo controle de animais reservatórios, por vacinação e pelo diagnóstico precoce. No entanto, apesar dos esforços, não existe, até o presente, uma prevenção efetiva para a leptospirose.

Em países onde há vacinas disponíveis, a imunização deve ser considerada quando há um problema significativo de saúde pública (8, 23). Contudo, as vacinas fornecem proteção sorovar-específica, de modo que é necessária a combinação de inúmeros antígenos representando os sorovares circulantes na população a ser imunizada (4, 7, 8, 23). Atualmente, não há uma vacina humana eficaz contra leptospirose, mas vacinas baseadas em preparações do patógeno inativado por calor ou formol são empregadas há anos na vacinação de animais domésticos (4), prevenindo o desenvolvimento da doença no animal, mas sem efeito sobre o estado de carreador renal (1, 23). Os efeitos adversos associados a essas vacinas limitam seu uso humano. No entanto, vacinas humanas foram licenciadas e são administradas atualmente na China, em Cuba e na França (3).

Em geral, as vacinas disponíveis atualmente apresentam sucesso limitado, produzindo imunidade incompleta de curta duração (4, 7, 8) e não conferem proteção cruzada aos sorovares que não estejam incluídos na formulação vacinal. Sabe-se que a imunidade sorovar-específica está relacionada ao LPS e que extratos proteicos, por sua vez, podem induzir proteções homóloga e heteróloga, o que faz com que as proteínas do patógeno sejam alvos mais apropriados para o desenvolvimento de uma vacina capaz de induzir imunidade cruzada (7). Muitas proteínas de membrana externa e lipoproteínas

foram identificadas. Porém, o desenvolvimento de vacinas recombinantes foi demonstrado apenas com certas proteínas de membrana externa, como LipL32, OmpL1, LipL41, LigA e LigB (1, 7). Em geral, a eficácia de tais candidatos vacinais é relativamente baixa em modelos animais e a necessidade de uma vacina para auxiliar no controle da leptospirose ainda persiste.

Atualmente, a principal barreira para o controle dos desfechos graves da leptospirose é a falta de um teste diagnóstico adequado (7). A terapia antimicrobiana, quando administrada aos pacientes precocemente, pode prevenir a progressão da doença e a alta mortalidade (10-50%) (8, 24). Embora a doença tardia grave possa ser reconhecida pelas manifestações clássicas da leptospirose, a identificação de casos é dificultada devido a sua apresentação não específica nas fases iniciais (5, 8), de modo que a leptospirose é frequentemente confundida com outras causas de doença febril aguda. O diagnóstico equivocado tem se tornado ainda mais crítico em regiões onde há transmissão endêmica dessas doenças infecciosas com manifestações clínicas semelhantes a leptospirose, como a dengue, por exemplo. Por esse motivo, a identificação de casos é, portanto, dependente da anamnese do paciente e do alto grau de suspeita clínica pelos médicos, sendo necessário, para o diagnóstico precoce, um teste laboratorial que possa ser usado nas unidades primárias de saúde.

Em teoria, a leptospirose pode ser diagnosticada pelo exame direto do sangue durante a primeira semana após o aparecimento dos sintomas, quando há leptospiremia. Devido ao seu pequeno tamanho, a observação direta de leptospiras é possível apenas por microscopia de campo escuro ou por imunofluorescência (4, 12). Cem a 1 milhão de bactérias/mL de sangue podem ser observadas durante a fase aguda da doença, porém o limite de detecção do exame direto é aproximadamente  $10^4$  bactérias/mL de sangue (4, 12). Embora um microscópio de campo escuro seja necessário, o exame direto é um método barato, porém o risco de resultados falso-positivos devido à presença de debris celulares, fibrinas ou outros artefatos deve ser considerado (4, 12). A observação direta apresenta, portanto, baixa sensibilidade e especificidade (4, 7).

Na maior parte dos casos, a leptospirose é diagnosticada por sorologia pois, em geral, anticorpos podem ser detectados no sangue em aproximadamente 5 a 7 dias após o aparecimento dos sintomas (3, 5, 8). O teste de microaglutinação *in vitro* (MAT) é o teste sorológico mais empregado atualmente e consiste na reação do soro do paciente com um painel de suspensões de leptospira vivas de diferentes sorovares (4, 7, 12).

Após incubação, as misturas soro-antígeno são examinadas microscopicamente quanto à presença de aglutinação e os títulos são determinados através de diluições seriadas da amostra de soro (4, 23). O espectro de antígenos deve incluir sorovares representativos de todos os sorogrupos, além de todos os sorovares circulantes localmente. A interpretação do resultado, porém, é subjetiva, pois varia com o técnico que está desempenhando o teste e, por esse motivo, requer treinamento e pessoas especializadas. Além disso, o crescimento lento do micro-organismo dificulta o teste, que é demorado principalmente quando o painel de leptospiras é extenso (5, 11, 12). O MAT tem a vantagem de ser altamente específico para os sorovares, embora reatividade cruzada possa ocorrer entre os diferentes sorogrupos, especialmente em amostras de fase aguda. Por outro lado, a sensibilidade do MAT nas amostras de fase aguda é baixa, sendo necessárias amostras pareadas de soro para um diagnóstico definitivo. Entretanto, pacientes com leptospirose fulminante podem morrer antes da soroconversão. O MAT também é o teste mais apropriado para se empregar em inquéritos sorológicos, já que pode ser aplicado ao soro de muitas espécies animais e o espectro de antígenos usado pode ser expandido ou reduzido de acordo com a necessidade (4, 5).

Métodos sorológicos convencionais, como ensaios imunoenzimáticos no formato ELISA, são amplamente empregados no diagnóstico da leptospirose. Anticorpos IgM anti-leptospira podem ser detectados 4 a 5 dias após o aparecimento dos sintomas - antes da detecção de IgG e de anticorpos aglutinantes - e persistem por pelo menos 5 meses nos pacientes (4, 12). Inúmeros ELISAs para detecção de IgM estão disponíveis no mercado e baseiam-se na detecção de anticorpos contra o extrato total da bactéria. Geralmente, a cepa saprofítica *L. biflexa* compartilha muitos antígenos de superfície com cepas patogênicas e, por esse motivo, o fundo de reatividade desses testes pode ser alto. A especificidade e sensibilidade desses testes são bastante variáveis, dependendo da população estudada e da exposição prévia a cepas patogênicas ou saprofíticas de leptospira (8, 12). Outro fator que pode influenciar esses resultados diversos é o fato de a definição de casos ser realizada usando o MAT como teste de referência (12).

Muitos outros testes podem ser usados para detecção de anticorpos específicos, incluindo testes de macro-aglutinação, fixação de complemento, hemaglutinação, entre outros. Embora alguns estejam atualmente disponíveis no mercado, apresentam baixa sensibilidade ou especificidade. Mais recentemente, testes imuno-cromatográficos de

fluxo lateral vem sendo desenvolvidos em vários laboratórios e podem ser usados nas unidades de atendimento primárias de saúde com apenas uma gota de sangue e resultado disponível em 10 minutos. Tais testes consistem na migração do complexo antígeno-anticorpo por capilaridade em membranas cobertas com extrato total da bactéria ou proteínas recombinantes. O anticorpo capturado é visualizado colorimetricamente através de proteína A conjugada a ouro coloidal (12, 25). Tais testes, em geral, apresentam desempenho característico de outros ensaios com baixa sensibilidade na fase inicial da doença (8).

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem apresentado uso crescente no diagnóstico da leptospirose. Embora haja uma tendência de que o PCR substitua os métodos sorológicos em regiões onde há transmissão endêmica da doença devido à alta sensibilidade e capacidade de fornecer um diagnóstico precoce, tal abordagem permanece restrita a laboratórios de referência, sendo improvável seu emprego em larga escala nos países em desenvolvimento, onde o diagnóstico imediato é mais necessário (8, 12). Muitos métodos de PCR convencional e PCR em tempo real foram desenvolvidos para detecção do micro-organismo a partir de amostras clínicas, com limite de detecção usualmente entre 10 a 100 bactérias/mL de sangue ou urina. O gene alvo amplificado deve ser específico para cepas patogênicas e, embora um resultado positivo revele a presença do agente infeccioso na amostra, não permite a identificação do sorovar (12).

Atualmente, o critério para o diagnóstico da leptospirose, definido pelo grupo de referência em epidemiologia e impacto da leptospirose (LERG), é a presença de sinais clínicos compatíveis com leptospirose associado a: (i) um aumento de 4 ou mais vezes no título de anticorpos entre as amostras de soro pareadas; ou (ii) um título único de 1:400 em áreas com transmissão endêmica de leptospirose ou 1:100 em áreas sem endemicidade; ou (iii) isolamento da bactéria a partir de amostras clínicas provenientes de sítios geralmente estéreis, como sangue; ou (iv) detecção de material genético do micro-organismo em amostras clínicas através de PCR. Um caso presuntivo de leptospirose seria determinado pela presença de IgM nos ensaios de ELISA ou fitas indicadoras (“dipstick”) ou presença de IgM ou IgG em microscopia de imunofluorescência (11).

## **I.f) Sítio de estudo da leptospirose em Salvador/BA, Brasil**

Há mais de 40 anos, universidades dos Estados Unidos, como a Universidade de Cornell, têm colaborado com instituições em Salvador, cidade de 2,6 milhões de habitantes e capital do estado da Bahia, nordeste do país. Essa colaboração incentivou o desenvolvimento de pesquisas e treinamentos direcionados a doenças tropicais tradicionais e tem recebido suporte contínuo do Instituto de Saúde dos Estados Unidos, NIH (do inglês, “National Institutes of Health”).

Em 1996, foi criado um programa na Fiocruz para o estudo de doenças infecciosas urbanas que emergiram devido ao crescimento das favelas e a leptospirose foi escolhida como um modelo de doença-problema reconhecido primeiramente em Salvador pelo Dr. Warren Johnson Júnior na década de 70 (26). Pesquisas sobre o surto de 1996 em Salvador (27) convenceram o governo brasileiro a priorizar a leptospirose. Estes esforços, coordenados pelo Dr. Albert Ko e pelo Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, levaram ao sequenciamento do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (6). Essa iniciativa nacional levou ao surgimento de projetos de desenvolvimento de um teste para o diagnóstico rápido, vacinas e pesquisas com base em uma comunidade carente em Salvador, a comunidade de Pau da Lima.

Como consequência desta longa colaboração, uma infraestrutura foi criada, incluindo (i) o estabelecimento de uma rede de vigilância ativa, de base populacional, que é conduzida em conjunto com a Secretaria Municipal de Saúde desde 1996, recebendo as admissões de uma rede de seis hospitais, avaliando critérios para leptospirose e realizando acompanhamento domiciliar para mapear os locais das residências dos pacientes; (ii) um laboratório de referência em leptospirose, na Fiocruz/BA, que realiza MAT, isolamento por cultura, detecção molecular e tipagem de *Leptospira*; (iii) um centro de gerenciamento de dados, também na Fiocruz/BA, cuja equipe desenvolveu protocolos padronizados, identificação por código de barras para documentos e amostras e um servidor de uso exclusivo para banco de dados; e (iv) um local para estudos prospectivos na comunidade de Pau da Lima, com a união de 9 associações de moradores em um único conselho urbano que implementa iniciativas deliberadas pela comunidade para problemas de saúde urbana além da leptospirose.

O conhecimento acumulado como fruto das pesquisas realizado pelo nosso grupo ao longo desses anos permitiu o maior entendimento das características epidemiológicas associadas à transmissão da leptospirose urbana em Salvador, como,

por exemplo, a prevalência de 90% de *L. interrogans* sorovar Copenhageni nos casos identificados na região e a relação entre a transmissão da doença e a presença de ratos domésticos do gênero *Rattus*, reservatório comumente associado a esse sorovar (22, 27). Essa homogeneidade de exposição ao patógeno e a disponibilidade da sequência completa do genoma da linhagem Fiocruz L1-130, isolada a partir de um caso local de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, associados a infraestrutura instalada na Fiocruz/BA, fazem de Salvador e da comunidade de Pau da Lima um excelente sítio para o estudo da leptospirose urbana no Brasil.

### **I.g) Análises de proteínas em larga escala para estudos sorológicos**

As pesquisas sobre doenças infecciosas avançaram rapidamente com o acúmulo de sequências completas do genoma de patógenos e o uso subsequente de microarranjos de DNA em escala genômica para o estudo dos perfis de expressão genica do patógeno em diferentes condições *in vitro* ou mimetizando o ambiente *in vivo* (28-30). Tais estudos foram desenvolvidos, em sua maioria, a partir de experimentação animal e em instalações laboratoriais. No entanto, pouco se sabe sobre as proteínas expressas durante uma infecção natural em humanos ou outros animais hospedeiros (31).

A detecção de anticorpos específicos no soro de um indivíduo infectado evidencia indiretamente a expressão *in vivo* da proteína pelo patógeno. Entretanto, o emprego dessa abordagem no estudo de um grande número de proteínas é limitado pela técnica de eletroforese em gel, uni ou bidimensional. Em geral, os extratos celulares utilizados nessa técnica são de origem *in vitro* e a identificação dos antígenos mais abundantes é feita por determinação da estrutura primária da proteína através do sequenciamento de aminoácidos da banda mais abundante no gel, seguida da pesquisa em bancos de dados. Uma alternativa ao uso de extratos células do patógeno como fonte de proteínas é a produção de proteínas recombinantes, baseada na predição de sequências codificantes a partir do genoma do micro-organismo e a determinação se essas proteínas são possíveis alvos pelo reconhecimento por anticorpos de pacientes. Uma desvantagem da seleção e expressão de proteínas recombinantes é o fato de que algumas proteínas podem não ser expressas ou ser expressas em quantidade insuficiente nos diferentes sistemas de expressão disponíveis atualmente, como procariotos (ex. *Escherichia coli*), leveduras e plantas.

O grupo do Dr. Felgner desenvolveu uma metodologia de clonagem e expressão de proteínas recombinantes com alta eficiência e diminuição dos custos através de uma metodologia de alto desempenho, que emprega sistema de transcrição-tradução *in vitro* em sistema livre de células. Centenas a milhares de proteínas recombinantes são impressas em lâminas de microarranjo, que são utilizadas na captura de anticorpos específicos presentes no soro de indivíduos infectados ou outros animais. A quantidade de anticorpo capturada pode ser quantificada através do uso de um anticorpo secundário marcado (32).

Microarranjos de proteínas são uma abordagem efetiva no desenvolvimento de estudos sorológicos de larga escala, definindo a reposta imune por anticorpos específicos contra agentes infecciosos em escala proteômica e permitindo o acesso ao repertório completo de anticorpos produzidos em resposta a infecções ou imunizações em uma grande coleção de amostras de soros. Podem, ainda, ser usados em inquéritos epidemiológicos em larga escala, consumindo pequenas quantidades da amostra. Sua produção e hibridização com amostras de soros em uma metodologia de alto desempenho permite o estudo de centenas de amostras, melhorando, dessa forma, o poder estatístico do ensaio e gerando resultados mais confiáveis (33). Adicionalmente, diferentemente de extratos celulares, um conjunto de antígenos pode ser identificado com alta sensibilidade e especificidade. Além disso, os microarranjos proteicos podem representar um grande repertório das proteínas de um agente infeccioso, possibilitando a identificação de novos antígenos não detectáveis por outras metodologias, que são altamente limitantes pelo padrão de expressão de proteínas do micro-organismo. Microarranjos de proteínas vêm sendo empregados no estudo de infecções experimentais e naturais de uma série de micro-organismos (31, 34-37).

## **II. OBJETIVOS**

### **II.a) OBJETIVO GERAL**

Encontrar novos marcadores diagnósticos para leptospirose humana utilizando a plataforma de microarranjo proteico desenvolvida no Laboratório de Microarranjo de Proteínas, Universidade da Califórnia Irvine.

### **II.b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Selecionar os genes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni para clonagem;
- 2- Amplificar e clonar os genes selecionados;
- 3- Expressar os genes clonados;
- 4- Confeccionar as lâminas de microarranjo;
- 5- Hibridizar o microarranjo com soros humanos;
- 6- Realizar a análise estatística dos dados gerados;
- 7- Avaliar o desempenho dos antígenos diferencialmente reativos na plataforma Multi-antigen Print Immunoassay (MAPIA);
- 8- Verificar a sequência nucleotídica dos clones correspondentes aos antígenos diferencialmente reativos.



### III. CAPÍTULO 1

Artigo publicado em 17 de outubro de 2013, na revista “**PLoS Neglected Tropical Diseases**”, compilando todos os achados referentes aos objetivos da presente dissertação de mestrado.

#### **Identification of seroreactive proteins of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni using a high-density protein microarray approach**

Carolina Lessa-Aquino<sup>1,2</sup>, Camila Borges Rodrigues<sup>1,2</sup>, Jozelyn Pablo<sup>2,3</sup>, Rie Sasaki<sup>2</sup>, Algis Jasinskas<sup>2</sup>, Li Liang<sup>2</sup>, Elcio A. Wunder Jr.<sup>4</sup>, Guilherme S. Ribeiro<sup>5,6</sup>, Adam Vigil<sup>2</sup>, Ricardo Galler<sup>1,7</sup>, Douglas Molina<sup>3</sup>, Xiaowu Liang<sup>3</sup>, Mitermayer G. Reis<sup>5</sup>, Albert I. Ko<sup>4,5</sup>, Marco Alberto Medeiros<sup>1</sup>, Philip L. Felgner<sup>2\*</sup>.

1-Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. 2-Department of Medicine, Division of Infectious Disease, University of California Irvine, Irvine, CA, USA. 3-Antigen Discovery Inc, Irvine, CA, USA. 4-Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale University, New Haven, CT, USA. 5-Gonçalo Moniz Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, BA, Brazil, 6-Institute of Collective Health, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil, 7-Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

doi: 10.1371/journal.pntd.00024

# Identification of Seroreactive Proteins of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni Using a High-Density Protein Microarray Approach

Carolina Lessa-Aquino<sup>1,2</sup>, Camila Borges Rodrigues<sup>1,2</sup>, Jozelyn Pablo<sup>2,3</sup>, Rie Sasaki<sup>2</sup>, Algis Jasinskas<sup>2</sup>, Li Liang<sup>2</sup>, Elsie A. Wunder, Jr.<sup>4</sup>, Guilherme S. Ribeiro<sup>5,6</sup>, Adam Vigil<sup>2</sup>, Ricardo Galler<sup>1,7</sup>, Douglas Molina<sup>3</sup>, Xiaowu Liang<sup>3</sup>, Mitermayer G. Reis<sup>5</sup>, Albert I. Ko<sup>4,5</sup>, Marco Alberto Medeiros<sup>1</sup>, Philip L. Felgner<sup>2\*</sup>

**1** Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Department of Medicine, Division of Infectious Disease, University of California Irvine, Irvine, California, United States of America, **3** Antigen Discovery Inc, Irvine, California, United States of America, **4** Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale University, New Haven, Connecticut, United States of America, **5** Gonçalo Moniz Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil, **6** Institute of Collective Health, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, **7** Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

**Background:** Leptospirosis is a widespread zoonotic disease worldwide. The lack of an adequate laboratory test is a major barrier for diagnosis, especially during the early stages of illness, when antibiotic therapy is most effective. Therefore, there is a critical need for an efficient diagnostic test for this life threatening disease.

**Methodology:** In order to identify new targets that could be used as diagnostic makers for leptospirosis, we constructed a protein microarray chip comprising 61% of *Leptospira interrogans* proteome and investigated the IgG response from 274 individuals, including 80 acute-phase, 80 convalescent-phase patients and 114 healthy control subjects from regions with endemic, high endemic, and no endemic transmission of leptospirosis. A nitrocellulose line blot assay was performed to validate the accuracy of the protein microarray results.

**Principal findings:** We found 16 antigens that can discriminate between acute cases and healthy individuals from a region with high endemic transmission of leptospirosis, and 18 antigens that distinguish convalescent cases. Some of the antigens identified in this study, such as LipL32, the non-identical domains of the Lig proteins, GroEL, and Loa22 are already known to be recognized by sera from human patients, thus serving as proof-of-concept for the serodiagnostic antigen discovery approach. Several novel antigens were identified, including the hypothetical protein LIC10215 which showed good sensitivity and specificity rates for both acute- and convalescent-phase patients.

**Conclusions:** Our study is the first large-scale evaluation of immunodominant antigens associated with naturally acquired leptospiral infection, and novel as well as known serodiagnostic leptospiral antigens that are recognized by antibodies in the sera of leptospirosis cases were identified. The novel antigens identified here may have potential use in both the development of new tests and the improvement of currently available assays for diagnosing this neglected tropical disease. Further research is needed to assess the utility of these antigens in more deployable diagnostic platforms.

**Citation:** Lessa-Aquino C, Borges Rodrigues C, Pablo J, Sasaki R, Jasinskas A, et al. (2013) Identification of Seroreactive Proteins of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni Using a High-Density Protein Microarray Approach. PLoS Negl Trop Dis 7(10): e2499. doi:10.1371/journal.pntd.0002499

**Editor:** Pamela L. C. Small, University of Tennessee, United States of America

**Received:** December 4, 2012; **Accepted:** September 10, 2013; **Published:** October 17, 2013

**Copyright:** © 2013 Lessa-Aquino et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was funded by the following grants: NIAID R01 AI052473, NIAID U01AI088752, FIC D43 TW00919 and NIAID R44 AI072856. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** I have read the journal's policy and have the following conflicts: Dr. Philip Felgner has an equity interest in Antigen Discovery, Inc. (ADI), which is developing products related to the research described in this paper. In addition, the author serves on the advisory board of ADI and receives compensation for these services. The terms of this arrangement have been reviewed and approved by the University of California, Irvine in accordance with its conflict of interest policies. This does not alter our adherence to all PLOS policies on sharing data and materials.

\* E-mail: pfelgner@uci.edu

## Introduction

Leptospirosis is one of the most common zoonotic infectious diseases worldwide. Humans usually become infected through occupational, recreational or domestic contact with the urine of reservoir animals, either directly or through contaminated soil or water [1–3]. Pathogenic leptospires frequently produce an asymptomatic infection in wild rodents and other reservoirs; however, in

humans and other accidental hosts, it can cause hepato-renal failure, pulmonary hemorrhage syndrome and even death depending on bacterial virulence and the host immune response [1,2]. Such complications can be prevented if the proper antibiotic therapy is initiated at the onset of the disease [3–6]. Nevertheless, the lack of a rapid and reliable diagnostic test is a major barrier to providing an early diagnosis.

Clinical diagnosis of leptospirosis is hindered by the overlapping clinical manifestations with other febrile illnesses [2,4,7].

## Author Summary

Leptospirosis is an infectious zoonotic disease that causes non-specific signs and symptoms in humans, which hampers the clinical diagnosis and treatment by physicians. Complications can occur if the proper treatment is not initiated early in the course of illness. Although the early diagnosis is critical for preventing unnecessary complications, currently available tests do not exhibit sufficient diagnostic sensitivity in the beginning of disease. We took advantage of high throughput techniques to perform an embracing study of the humoral immune response to the bacteria in order to identify antigens that could be used in a new test for the diagnosis of leptospirosis. A protein microarray chip containing 2,241 leptospiral proteins was constructed and probed with serum samples from patients and healthy individuals. We identified 24 proteins that are recognized by patients' sera but not by healthy individuals. These proteins are potential diagnostic markers, especially the ones identified for acute-phase patients, which can discriminate between a positive and a negative leptospirosis case within a few days after onset of symptoms. This work establishes the protein microarray approach for improving our understanding of the serological response to leptospirosis. Further research is needed to assess the performance of these antigens in the clinical setting.

Therefore, the diagnosis depends upon laboratory tests and different methods have been developed. Recovery of leptospires from clinical specimens such as tissue and blood by culture is considered a definitive diagnosis. This diagnosis is hampered, however, by the slow growth rate, the long incubation period until culture is established, low sensitivity and high cost due to the human and laboratory resources required [2]. Nucleic acid-based amplification techniques to detecting leptospiral DNA in biological specimens have also been developed but sensitivity usually decreases as patient progresses to the late stages of disease [2,4]. Hence, serology is the most frequently used diagnostic approach for leptospirosis.

The gold standard assay is the microagglutination test (MAT), which may use a panel of 19 live leptospires representing the major serogroups for the detection of agglutinating antibodies [2–4,7,8]. Despite the high specificity, the MAT usually requires paired acute- and convalescent-phase samples, thus being insensitive in the beginning of the disease. To overcome the drawbacks of MAT, numerous serological assays have been developed, particularly ELISA tests based on either whole cell extracts or recombinant proteins [3,4,7]. However, these assays have similar performance characteristics, with sensitivity and specificity rates that match those of MAT. Among other serological approaches whose accuracy has been described are agglutination, dipstick, and lateral flow assays [7]. Together, these assays demonstrated low sensitivity during acute phase, so the need for an efficient method to diagnose early infection remains urgent.

High-density protein microarrays are an effective approach to perform large scale serological studies and define antigen-specific antibody responses to infectious agents on a whole proteome scale. They can be produced and probed in a high-throughput manner, allowing for the screening of hundreds of serum samples thus improving the statistical power and generating more accurate conclusions. Additionally, unlike cell extracts, a set of antigens can be identified with optimal sensitivity and specificity. The aims of this research approach are to understand the breadth, intensity and diversity of the antibody response to leptospirosis disease and

to discover novel antigens that can be employed in diagnostic tests and subunit vaccines.

Here we report the results of a study probing more than 250 human serum samples, including healthy controls and leptospirosis cases from the state of Bahia, Brazil, against a partial proteome microarray chip containing 2,421 proteins from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain L1–130, which was isolated in Bahia, Brazil in 1996. The reason for choosing this specific strain relies on the availability of *L. interrogans* serovar Copenhageni complete genome sequence. Moreover, leptospirosis is an emerging health problem in developing countries. In Brazil, 4832 laboratory-confirmed cases were reported in 2011, distributed among the North (484 cases), Northeast (890 cases), Southeast (1762 cases), South (1673 cases) and Central-West (23 cases) regions [9]. Our group has shown that urban transmission of leptospirosis in Brazil is related to the presence of domestic rats in the environment [10–12]. Accordingly, >90% of the leptospirosis cases there are caused by *L. interrogans* serovar Copenhageni, which is commonly associated with *Rattus* species reservoirs [10,11]. The homogeneity of pathogen exposure and availability of sequenced genomic material from a related strain makes this clinical setting ideal for an initial proteomic study.

## Materials and Methods

### Ethics statement

The study protocol was approved by the institutional review board committees of Yale University and Oswaldo Cruz Foundation. Samples from infected patients and healthy individuals living in a community with high endemic transmission of leptospirosis came from the following projects: “Epidemic Urban Leptospirosis in Salvador, Brazil: A Study of the Clinical Presentation and Development of Rapid Diagnostic Methods” and “Natural History of Urban Leptospirosis”. The participants involved in both projects provided written informed consent. Blood donors from the city of Salvador were anonymous. Sera from U.S. healthy individuals were obtained from anonymous volunteers at the General Clinical Research Center at the University of California, Irvine. After collection, a code number was designated to each patient so that all samples were rendered anonymized for researchers before its use.

### Human sera samples

The evaluation was performed with a collection of 114 control human serum samples and 160 laboratory-confirmed sera of leptospirosis cases. Control samples were (i) 29 sera from healthy volunteers from California/US, where endemic transmission of leptospirosis does not exist; (ii) 35 sera from blood donors from Salvador/Brazil, city with endemic transmission of leptospirosis and (iii) 50 sera from healthy subjects who were enrolled in a cohort study in a high risk urban slum community in the same city [12]. Cases were identified during active hospital-based surveillance in the same state of the slum community, including patients from the city of Salvador and from the country side, from April 1996 to August 2010. During this period, 1529 MAT-confirmed cases of severe leptospirosis were identified, of which we selected 80 acute- and 80 convalescent-phase sera to conduct this study. Serum samples were randomly selected and therefore acute and convalescent samples are not necessarily paired. Acute-phase samples were collected upon patient admittance at the hospital and convalescent-phase samples were collected from recovering patients at least 14 days after hospital admittance and that may or may not have received standard antibiotic therapy. Laboratory confirmation was defined according to the criteria for

seroconversion, a four-fold rise in titer or a single titer of 1:800 in the MAT.

### Microarray targets' selection

Selection of the ORFs that would compose the array was performed considering the *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 genome annotations available at National Center for Biotechnology Information (NCBI) and at John Craig Venter Institute (JCVI) databases. The criteria used included proteins with potentially biological importance [13,14] and also with potential antigenic features [15-18] (Table S1).

### PCR amplification and high throughput recombination cloning

The selected ORFs were attempted to be amplified by PCR and cloned into pXI vector using a high-throughput PCR recombination cloning method described elsewhere [19]. Briefly, ORFs were amplified using 5 ng of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 with Accuprime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Cycling conditions were as follows: 94°C-2 min, 31 cycles of 94°C-90 s, 55°C-15 s, 50°C-15 s, 68°C-2 min and a final extension of 68°C-10 min. Primers contained a 20 bp ORF-specific sequence and a unique 20 bp "adapter" sequence, which becomes incorporated into the 5' and 3' termini flanking the amplified gene and is homologous to the cloning sites of the linearized pXI vector (ACGACAAGCATATGCTCGAG and TCCGGAACATCG-TATGGGTA, respectively). Genes larger than 3 kb were cloned as smaller segments, maintaining an overlap of at least 150 nt between the sequences, since high throughput cloning efficiency declines when genes are larger than ~2,500 bp. The segmented ORFs were named with the gene ID followed by the letter "s" and the number of the segment, e.g. LIC10502-s4. The *ligA* and *ligB* genes (LIC10465 and LIC10464, respectively) were fragmented considering the repeated Big domains present in the proteins' structures (LigB Repeats 7-12, LigA Repeats 7-13 and LigA/B Repeats 1-6) [20], which have been previously described as diagnostic markers and/or vaccine candidates [21-24]. Up to 3 additional rounds of amplification were attempted for failures, which were usually recovered by adjusting the PCR conditions. All PCR reactions were confirmed for correct insert size by gel electrophoresis before cloning.

The pXI plasmid encodes an N-terminal 6×His-tag and a C-terminal hemagglutinin (HA) tag. The plasmid was linearized by digestion with *Bam*HI and amplified by PCR to generate the acceptor vector as described previously [19]. A reaction containing 40 ng of linearized pXI vector, 1 µL of ORF PCR reaction and 10 µL of super-competent *Escherichia coli* DH5-α cells (McLab) was incubated on ice for 30 min, heat-shocked at 42°C for 1 min and chilled on ice for 1 min. One hundred and eighty microliters of S.O.C medium were added and cells were cultured for 1 hour at 37°C. The entire reaction mixture was added to 1.1 mL of LB supplemented with kanamycin 50 µg/mL and incubated overnight at 37°C with vigorous aeration. Plasmids were extracted with QIAprep 96 Turbo Kit (Qiagen) without colony selection and analyzed by gel electrophoresis to confirm insert size. Up to 2 additional rounds of cloning were performed to increase efficiency and were resumed by doubling the PCR volume for transformation. All plasmids carrying inserts <500 bp and some randomly selected ones were confirmed for insert presence by PCR using the insert specific primers. After probing the microarrays with the serum samples, the seroreactive antigens were identified and the corresponding plasmids were sequenced. The insert was confirmed in all cases.

### Microarray fabrication and probing

For array fabrication, purified minipreparations of DNA were used for expression in an *E. coli* based *in vitro* transcription-translation (IVTT) reaction system (RTS Kit, Roche) according to the manufacturer's instructions. Ten-microliter reactions were performed in 384-well plates and incubated for 16 hours at 26°C under 300 rpm shaking. Control reactions were performed in the absence of DNA ("NoDNA" controls) to assess the background given by the IVTT reaction itself. Protease inhibitor mixture (Complete, Roche) and Tween-20 to a final concentration of 0.5% v/v were added to the reactions, which were then mixed and centrifuged to pellet any precipitates and remove bubbles prior to printing. Unpurified supernatants were immediately printed onto nitrocellulose coated glass FAST slides using an Omni Grid 100 microarray printer (Genomic Solutions). In addition, arrays were printed with multiple negative control reactions, positive control spots of an IgG mix containing mouse, rat and human IgGs (Jackson ImmunoResearch) and purified Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) protein, which is recognized by the majority of humans thus serving as a marker for serum quality.

Protein expression was verified by probing the array with monoclonal anti-polyhistidine (Sigma Aldrich) and anti-hemagglutinin (Roche Applied Science) against the respective tags. First, arrays were blocked for 30 min with Protein Array Blocking Buffer (Whatman) and probed overnight with anti-tag antibodies diluted 1/400 in Blocking Buffer. Arrays were then incubated for one hour in biotinylated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) diluted 1/1000 followed by one-hour incubation with streptavidin-conjugated SureLight P3 (Columbia Biosciences). After each incubation, slides were washed 3 times with Tris-buffered saline containing Tween-20 0.05% v/v (TTBS). Additional washes with TBS and distilled water were performed and the slides were air-dried by brief centrifugation before scanning. Slides were scanned in a Perkin Elmer ScanArray confocal laser and intensities were quantified using QuantArray package.

For probing with human serum, samples were diluted 1/100 in Protein Array Blocking Buffer containing *E. coli* lysate 10 mg/mL (McLab) at a final concentration of 10% v/v and incubated for 30 min at room temperature under constant mixing to remove background reactivity to *E. coli* proteins in the IVTT reactions. *E. coli* protein-antibody complexes were removed from the sample dilution mix via centrifugation prior to addition to the microarray. Arrays were blocked for 30 min with Protein Array Blocking Buffer and then incubated with diluted samples overnight at 4°C, with gentle rocking. Biotinylated anti-human immunoglobulin G (Fc-γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch) was diluted 1/2000 in Blocking Buffer and added to the arrays for one-hour incubation at room temperature. Slides were washed 3 times with TTBS after each incubation and bound antibodies were detected by one-hour incubation with streptavidin-conjugated SureLight P3, as described above. Finally, slides were scanned for intensity quantification.

### Immunostrips probing

Eleven clones, corresponding to the 10 most differentially reactive antigens for either acute or convalescent groups (see results), were submitted to a five-hour IVTT reaction (RTS, Roche) according to the manufacturer's instructions. Protease inhibitor mixture (Complete, Roche), Tween-20 and methanol were added to final concentrations of 0.5% and 10% v/v respectively. The reactions were mixed and centrifuged to remove bubbles. Unpurified supernatants were printed on Hi-Flow Plus HF240 membrane (Millipore) using a BioJet dispenser (BioDot) at 1 µL/cm and cut into 3 mm strips. Individual strips were then

blocked in TTBS 5% non-fat milk for 30 min. Sera samples were diluted 1/250 in TTBS 5% nonfat milk containing *E. coli* lysate at a final concentration of 20% v/v and incubated for 30 min at room temperature under agitation. Blocked strips were then incubated with diluted sera during 1 hour and washed 6 times with TTBS. Alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch) was diluted 1/5000 in TTBS 5% nonfat milk and applied to each strip for 1 hour at room temperature under agitation. After washing 6 times with TTBS, 3 additional washes with TBS were performed and reactive bands were visualized by incubation with 1-step Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt (NBT/BCIP) developing buffer (Thermo Fisher Scientific) for 2 min at room temperature. Enzymatic reaction was stopped with tap water and the strips were air-dried before scanning at 2,400 dpi (Hewlett-Packard scanner). Images were converted to gray scale and band intensities were quantified using the ImageJ software (found at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

## Data analysis

Spot intensities were quantified using QuantArray software. Raw data were obtained as the mean pixel signal intensity for each spot and all intensities were automatically corrected for spot-specific background. For each array, the average of control IVTT reactions (NoDNA controls) was subtracted from spots' signal intensities in order to minimize background reactivity. Proteins were considered to be expressed when signal intensity for either tags was above the NoDNA control reactions mean plus 2.5 standard deviations. The same cut-off was applied to identify the reactive proteins using the sera collection. Data analysis was performed using the R statistical software (found at <http://www.r-project.org>). To stabilize the variance, VSN normalization was applied to the raw data and groups were compared by a Bayes regularized *t* test adapted from Cyber-T for protein arrays [25,26]. Benjamini and Hochberg (BH) method was used to control the false discovery rate [27] so that *p*-value smaller than 0.05 was considered significant and the corresponding protein was considered differentially reactive. For plotting the histogram, BH corrected *p*-values smaller than 1E-14 were assigned as 1E-16. Multiplex classifiers were generated using linear and nonlinear Support Vector Machines (SVMs) using the "e1071" R package. SVM is a supervised learning method that has been successfully applied to microarray data characterized by small samples sizes and a large number of attributes. The SVM approach, as any other supervised classification approach, uses a training dataset to build a classification model and a testing set to validate the model. To generate unbiased training and testing sets, leave one out cross-validation (LOOCV) was used. With this

methodology, each data point is tested with a classifier trained using all of the remaining data points. Plots of receiver operating characteristic (ROC) curves were made with the "ROCR" R package. Sensitivity and specificity were determined from the resulting ROC curves. Clinical characteristics of the leptospirosis patients whose acute and/or convalescent serum samples were selected for this study were described using frequencies and medians with interquartile (IQR) ranges (Table S2). The Chi square test or the Mann-Whitney/Wilcoxon test was used to compare clinical presentations of acute-phase leptospirosis patients with convalescent-phase patients. An association between patients' clinical characteristics and the intensity of acute sera signal against the three antigens that presented the best performance in the protein microarray were evaluated by the Kruskal-Wallis test.

## Microarray data accession number

The raw and normalized array data used in this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), accession number GSE42720.

## Results

### Protein microarray antigen selection

Characterization of the serological response to *Leptospira* exposure and infection on a whole proteome scale with protein microarrays has not been previously done. To evaluate the feasibility of this approach for leptospirosis, we identified a subset of proteome more likely to be immunoreactive. The selection criteria used to choose the proteins included in the array provided 2,241 ORFs, which corresponded to 61% of *Leptospira interrogans* proteome. The basis for selecting this particular subset of proteins took advantage of empirical mass spectrometry and RNA expression data available for *Leptospira interrogans* [13,14] and also from proteome microarray data from other Gram negative bacteria [17,18] (Supplementary Table S1).

In total, the array contained 2361 antigens, including full length proteins and protein segments. Protein expression was evaluated by probing the array with anti-His and anti-HA, and over 97% of protein spots were confirmed positive for either His or HA tags (Figure S1A).

### Human IgG antibody profile

Sera used in this study were classified into 5 groups, summarized in Table 1 and described in the methods section. Table S2 shows the clinical characteristics of the leptospirosis patients who provided sera for this study. The majority of them (88%) were male and the median age was 34 (IQR: 24–45) years old. Median duration of

**Table 1.** Sera collection used in this study.

Group	# sera probed	MAT median titer	MAT titer range*
U.S. volunteers	29	NA	NA
Blood donors from endemic area	35	NA	NA
Healthy individuals from highly endemic area	50	0	0
Acute phase patients	80	800	0–12,800
Convalescent phase patients	80	3200	0–204,800

NA = not applicable.

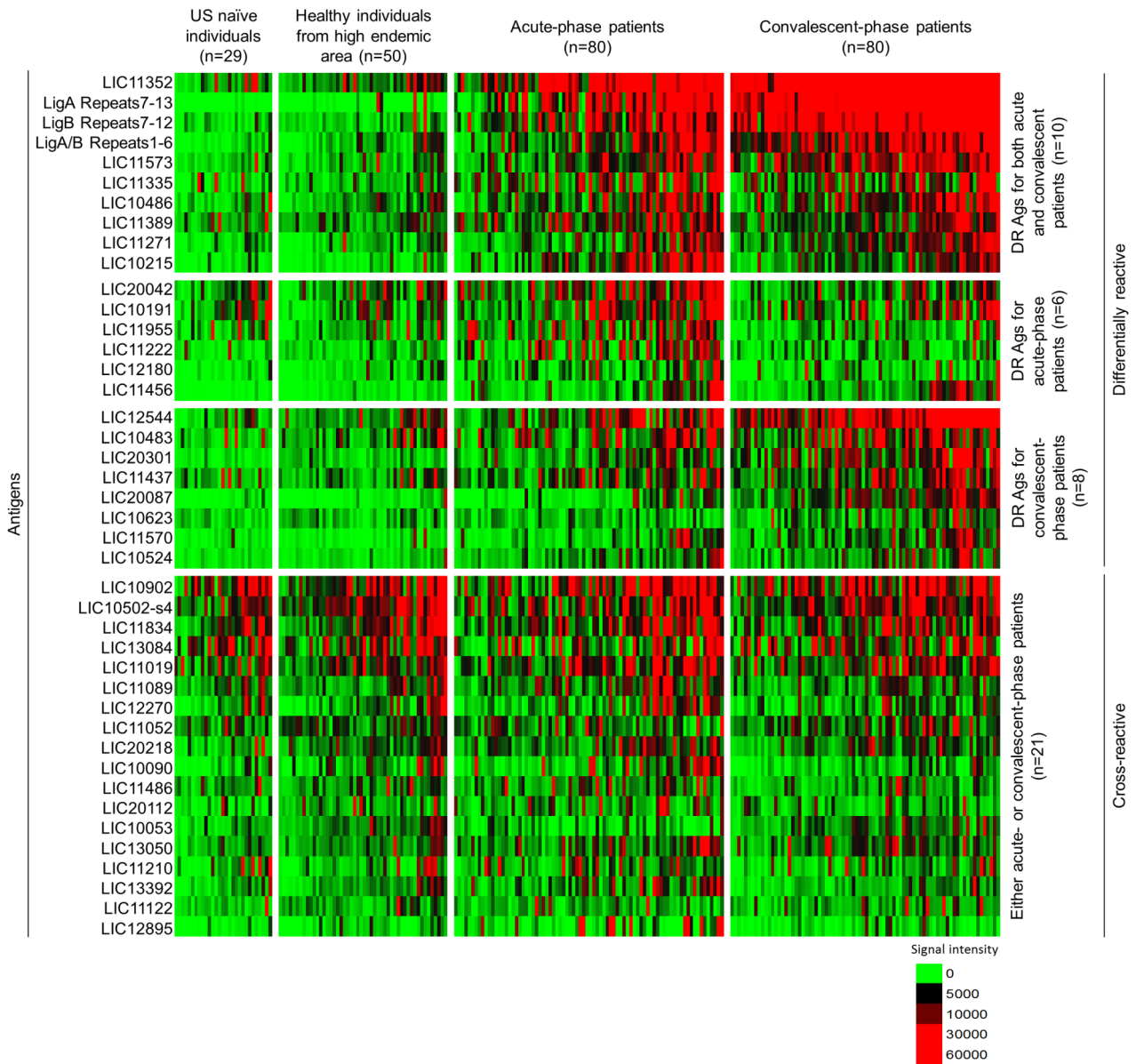
\*Acute-phase patients with negative MAT result were diagnosed by seroconversion; convalescent patients with negative MAT result were diagnosed based on the acute MAT titer.

doi:10.1371/journal.pntd.0002499.t001

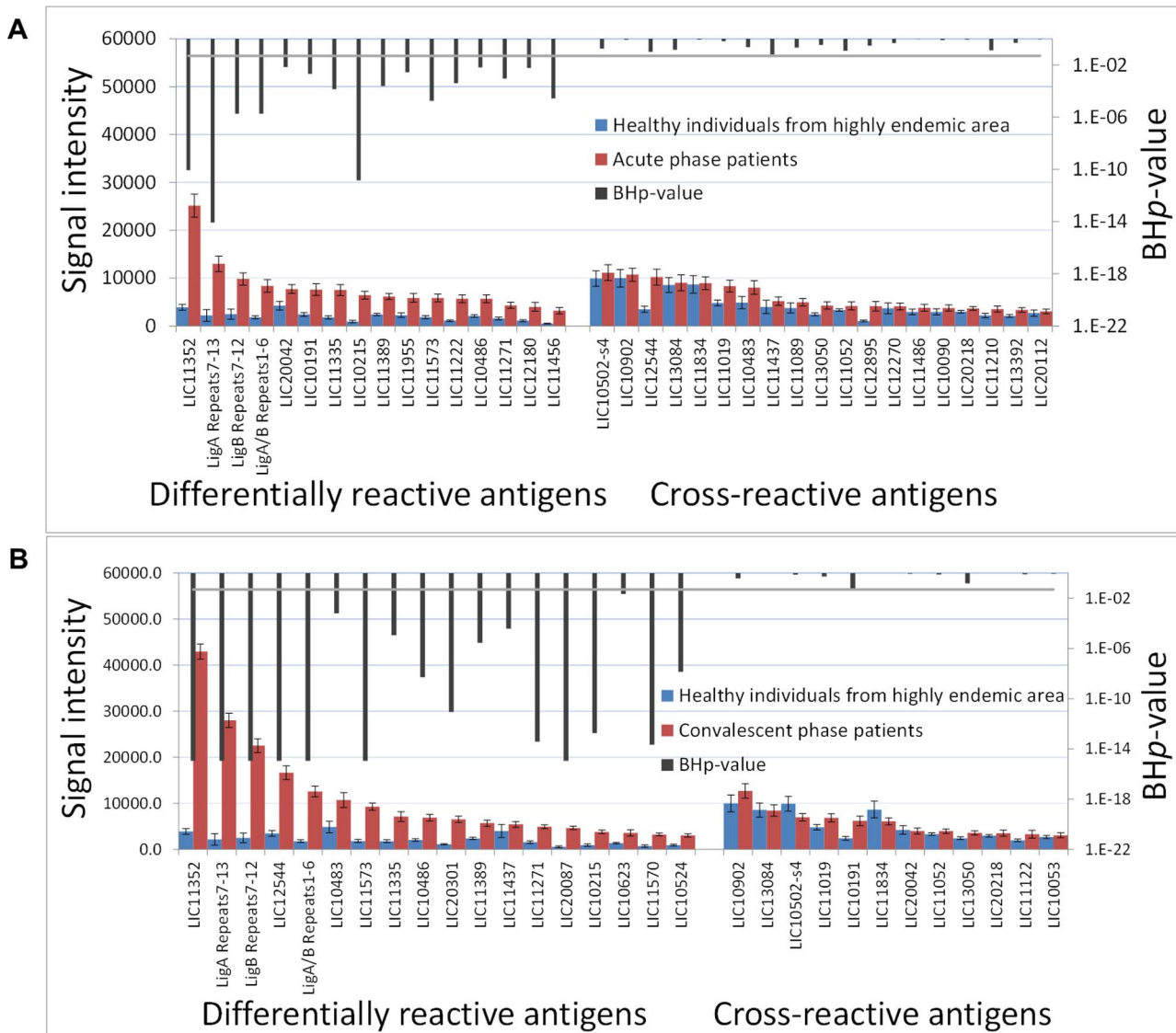
symptoms before hospitalization was 6 (IQR: 5–8) days. Jaundice and acute respiratory distress syndrome occurred in 87% and 13% of the patients, respectively. Renal impairment was frequent (median creatinine: 4.0 [IQR: 2.0–6.4] mg/dL) and 30% of the patients received peritoneal or hemodialysis. Intensive care was provided for 20% of the patients and 3% died.

Representative microarray images of *L. interrogans* infected and control samples are shown in Figure S1B. The heatmap in Figure 1 gives an overview of the reactivity of the 42 reactive antigens for each of the 239 individual samples. Brazilian blood donors are not shown in this figure. Individual specimens are in columns and grouped by healthy controls from USA, healthy controls from the high endemic area group, acute-phase patients and convalescent-phase patients. The antigens, in rows, are organized according to

those that are significantly more reactive in the cases than in the healthy controls. These antigens are termed ‘differentially reactive’ (DR) and are divided in 3 sections: antigens identified as differentially reactive for both acute- and convalescent-phase patients, antigens identified as differentially reactive only for acute patients and differentially reactive antigens only for convalescent patients. There is a second set of antigens that were equally as reactive in healthy controls and the cases, and these antigens are termed ‘cross-reactive’ (CR). Although there was some reactivity seen in the healthy controls against the differentially reactive antigens, there was more IgG response against these antigens after acute infection, and still more in the convalescent specimens. The background reactivity seen from the cross-reactive antigens was similar between all three groups.



**Figure 1. Individual sera are represented as a heatmap of reactivity.** Reactivity intensity is shown according to the colorized scale with red strongest, black in-between and green weakest. Antigens are in rows, grouped as differentially reactive ( $BHp < 0.05$ ) or cross-reactive ( $BHp > 0.05$ ) when compared to healthy individuals from high endemic area group and ranked by the average response of the acute or convalescent groups. Patient samples are in columns and sorted from left to right by increasing average antigen intensity within each group. doi:10.1371/journal.pntd.0002499.g001



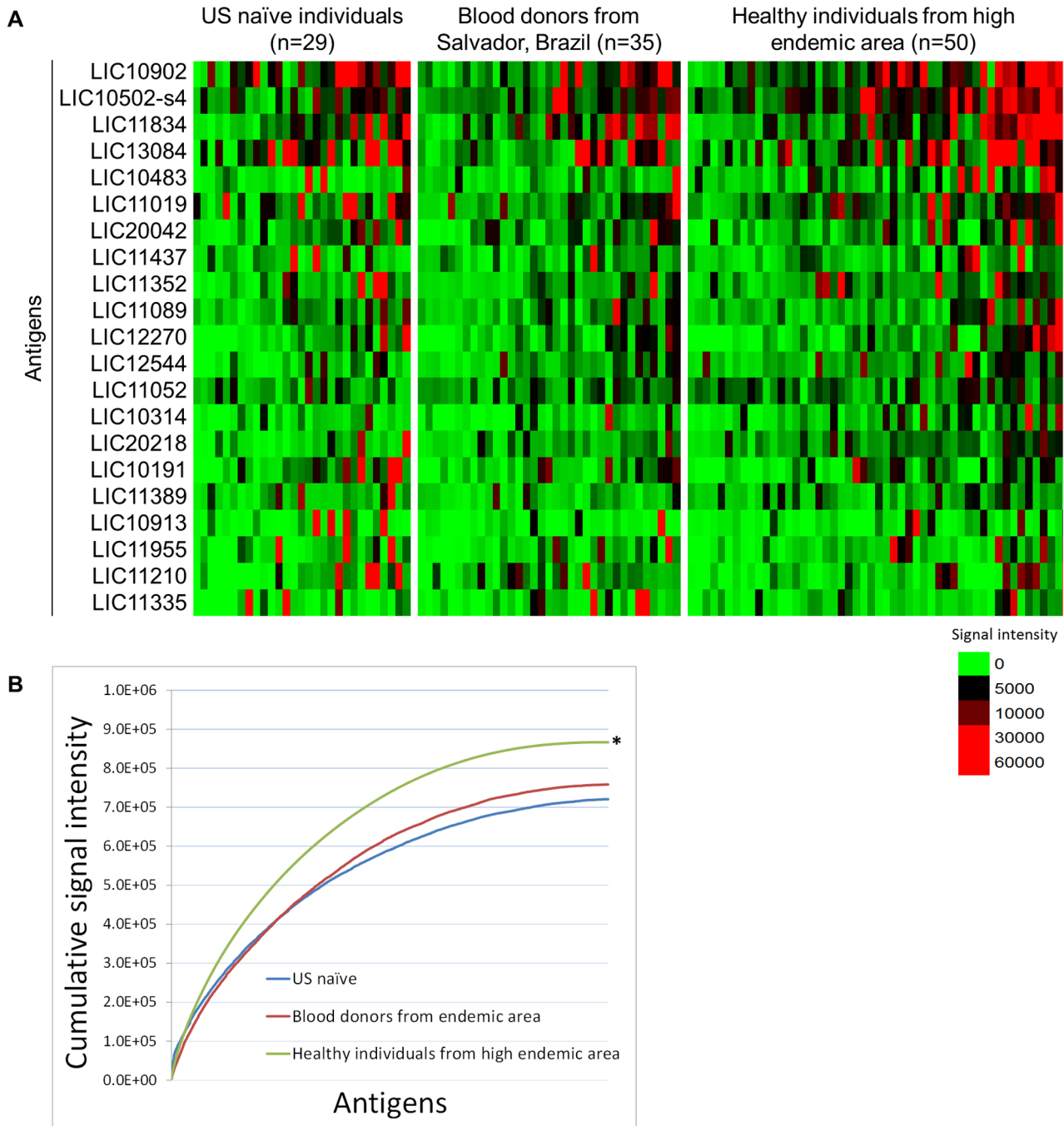
**Figure 2. Seroreactive antigens identified for acute- and convalescent-phase patients.** The histogram plots the average signal intensity (Y axis) of each antigen (X axis) for acute (A) or convalescent (B) groups against healthy individuals from highly endemic area group, with the BHp-value of this difference (black bars, secondary axis). Differentially reactive antigens ( $BHp < 0.05$ ) are organized to the left; cross-reactive antigens ( $BHp > 0.05$ ) are organized to the right. Error bars indicate S.E. For plotting the histograms, it was assigned the number  $10^{-16}$  for BHp-values  $< 1E-14$ . doi:10.1371/journal.pntd.0002499.g002

Here, we aim to identify antigens that can discriminate between positive and negative leptospirosis cases and for that we based our analysis on comparing acute and convalescent-phase patients to healthy individuals from an area with high endemic transmission (Figure 2). Since healthy individuals living in this area show some background reactivity to leptospiral LPS [12] and proteins (Figure 3, described later in this section), we find that the identification of antigens with sero-reactivity among patients but not among those healthy individuals distinguish a current leptospirosis case. All the high endemic controls used in this study were MAT-negative for leptospirosis and in order to avoid bias in our analysis, we compared the IgG reactivity detected on the microarray by probing 10 MAT-positive and 10 MAT-negative healthy individuals living in this area. The overall reactivity seen for both groups was low (Figure S2 A) and most of the reactive antigens detected for infected patients (described later in this section) were not reactive (average signal intensity below the

cut-off, Figure S2 B) for either MAT-positive or MAT-negative healthy individuals. Therefore, we used the MAT-negative high endemic controls for the following analysis.

There were 30 reactive antigens,  $\sim 1.3\%$  of all of the antigens printed on the array, of which 18 detected significantly more IgG antibody in the convalescent samples compared to control individuals from the high endemic area group (Table S3). For the acute-phase samples, the IgG antibody response detected 35 seroreactive antigens or 1.5% of the array, of which 16 discriminate between acute and negative cases. LipL32, LigA Repeats 7–13 and LigB Repeats 7–12 antigens were the three most reactive targets on average for both convalescent- and acute-phase groups. Ten differentially reactive antigens overlap between the acute and convalescent groups.

In order to investigate background reactivity among healthy individuals living in an area with endemic transmission of leptospirosis, we compared the cumulative antigen reactivity for



**Figure 3. Background reactivity among healthy individuals in the control groups.** A) Heatmap showing the overall reactivity of the control groups used in this study: US naïve subject, corresponding to area with no endemic transmission of leptospirosis, blood donors from Salvador, city with endemic transmission and healthy individuals residing in an urban slum community in Salvador, high risk area. B) Cumulative reactivity of all the antigens present in the array for the 3 control groups. Healthy individuals from area with high endemic transmission show significantly higher sero-reactivity ( $p < 0.05$ , marked with a star) than individuals from regions with endemic or non-endemic transmission of leptospirosis. doi:10.1371/journal.pntd.0002499.g003

the 3 control groups, from USA, Brazilian blood donors and healthy individuals from the high endemic area groups. The heatmap in Figure 3A shows the reactivity of all antigens with average signal intensity above the cut-off for any of the control groups. We observed a higher overall reactivity in the high endemic area group compared to USA controls and Brazilian blood donors. Accordingly, when we analyzed the cumulative signal intensity against all antigens on the array (Figure 3B), USA

healthy subjects showed the lowest total reactivity followed by blood donors from Salvador and healthy individuals from high endemic area. Blood donors living in endemic area had slightly higher reactivity than USA naïve subjects, but the difference was not statistically significant. However, the total background reactivity in healthy individuals residing in the area with high endemic transmission was significantly greater ( $p < 0.05$ ) than either the blood donors from Brazil or the USA controls.



Finally, we compared the average signal intensity of all the reactive antigens for each patient to the patient's MAT titer. MAT is based primarily on agglutinating antibodies that bind to leptospiral LPS [28,29] and does not differentiate between IgM and IgG subtypes. All acute and convalescent samples used in this study were laboratory confirmed for infection by MAT and we observed a 3-fold increase in the median titer for convalescent samples compared to the acute group (from 800 to 3,200, Table 1). Although we have also observed a general increase in antigen signal intensities for the convalescent group compared to acute group (Figure 1 and Figure 2), we were unable to draw a correlation between these two approaches (Figure S3) indicating that MAT antigen and protein antigens identify different antibody pools in these patients.

### Serodiagnostic classifier construction by ROC analysis

To determine the accuracy of the differentially reactive antigens in distinguishing a leptospirosis case, individual antigen ROC curves were generated and the AUC for each antigen was determined. Acute and convalescent-phase samples were analyzed separately against the high endemic area control group and sensitivity and specificity were calculated for both groups using the SVM computational approach. Antigens were then ranked by decreasing AUC and multiple antigens ROC curves generated. Single antigen ROCs for acute-phase group are shown in Figure 4A and for convalescent-phase group are shown in Figure S4. For both cases, the false positive rate was calculated considering the high endemic area healthy control group.

For acute-phase patients, the non-identical domains of the Lig proteins (LigA Repeats 7–13 and LigB Repeats 7–12) provided best sensitivity and specificity (AUC = 0.894–0.857), followed by LipL32 (LIC11352, AUC = 0.841, Table 2). As disease progresses to convalescence, the accuracy of these antigens increases so that LipL32 achieves best performance (AUC = 0.986) followed by LigA Repeats 7–13 (AUC = 0.965) and LigB Repeats 7–12 (AUC = 0.968, Figure S4). None of the three antigens with better accuracy (LigA Repeats 7–13, LigB Repeats 7–12 and LipL32) had the signal intensities from the acute serum sample associated with patients' clinical characteristics (Table S4). A heat shock protein of the GroEL family (LIC11335) was also identified as seroreactive, with high sensitivity for both acute- and convalescent-phase patients (90.0% and 92.0%, respectively) but low specificity (53.8% and 62.5%). DnaK (LIC10524), another heat shock protein, showed seroreactivity for the convalescent group, although we could not detect significant levels of IgG against this antigen in the acute group (average signal intensity below the established cut-off). The virulence-associated protein Loa22 (LIC10191) showed very low sensitivity for acute-phase patients (36.0%) and was considered not seroreactive for the convalescent group. Similarly, the IgG response against LipL31 (LIC11456) was detected only among acute patients, with a diagnostic accuracy of 82% sensitivity and 68.8% specificity.

Several novel antigens, for which no seroreactivity has been previously described, were identified in this study. The hypothetical protein LIC10215 provided 92.0% and 86.0% sensitivity and 67.5% and 83.8% specificity for distinguishing healthy from either acute- or convalescent-phase patients, respectively. LIC10215 was the best antigen for distinguishing an acute case from a healthy individual after the domains of the Lig proteins and LipL32. Regarding the convalescent group, LIC20087, antigen annotated as outer membrane protein, provided best accuracy after the domains of the Lig proteins and LipL32, with 96.0% sensitivity and 86.3% specificity (Table 2).

The combination of 11 differentially reactive antigens allowed for best sensitivity and specificity for the acute cases (78.0% and 87.5%, respectively) whereas the combination of 4 antigens provided best accuracy (98.0% sensitivity and 94.0% specificity) for convalescent cases (Figure 4B).

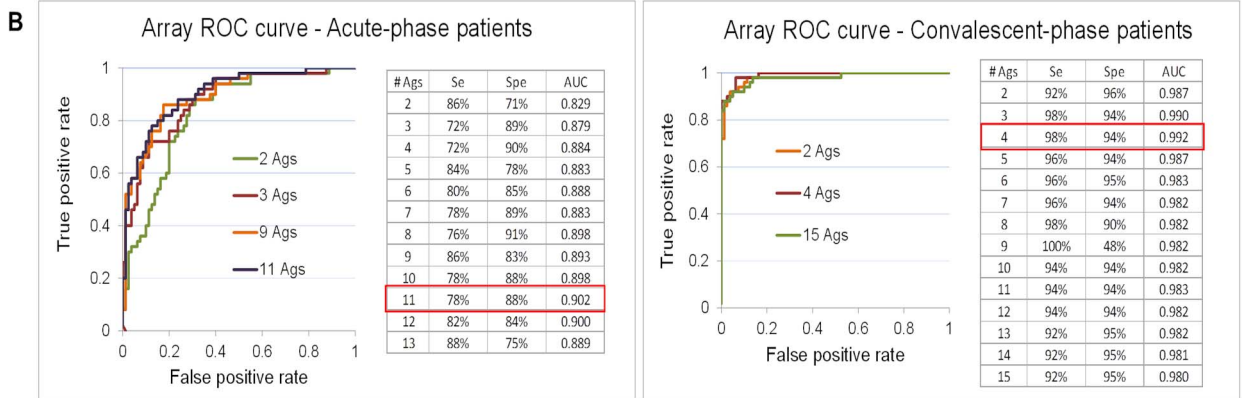
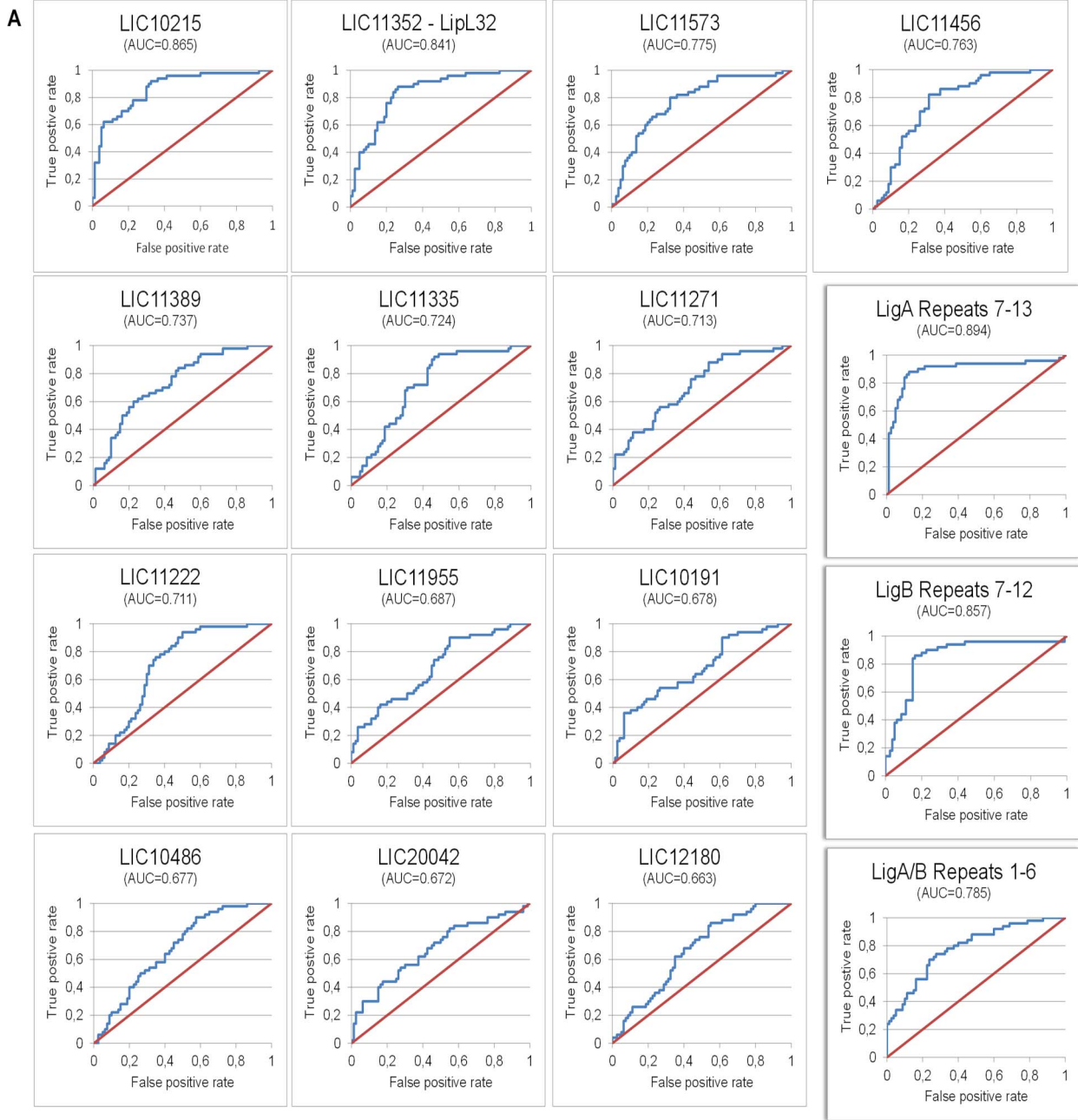
### Array validation with immunostrips

Eleven differentially reactive antigens, corresponding to the most significant antigens for either acute- or convalescent-phase groups were printed onto a nitrocellulose membrane and cut into 3 mm strips which were probed with 20 highly endemic, 20 acute and 20 convalescent randomly selected samples. Healthy individuals showed lower reactivity against these antigens whereas leptospirosis patients reacted strongly against most of the antigens (Figure 5). Antigen intensities were quantified and groups were compared using Bayes regularized *t* test adapted from Cyber-T. A total of 6 antigens with significant BH $p$ -values (BH $p$  < 0.05) were identified as differentially reactive for both acute and convalescent groups, of which 4 overlap (Table S5). For both acute- and convalescent-phase groups, the domains of the Lig proteins provided the best single antigen discrimination, followed by LipL32. LIC10215, LIC10486, LIC11271, LIC20087 and LIC11573 showed no sero-reactivity on immunostrips. The lower reactivity observed for these proteins on immunostrips may be due to technical differences between both platforms.

### Discussion

Protein microarrays are a powerful tool to describe pathogen-specific antibody responses produced after exposure to infectious agents. Our group has applied this approach to more than 25 agents of medical relevance, including viruses, bacteria, protozoan and helminthes and some of the antigens identified by our methodology were successfully employed in different diagnostic platforms [18,30–33]. No currently available approach enables such a complete understanding of the humoral immune response to infection. Here, we constructed a protein microarray comprising 2,421 proteins, 61% of the proteome of *L. interrogans* serovar Copenhageni, to examine the IgG response to leptospirosis. Our focus in the present study was to profile the immune response associated with leptospirosis exposure and infection, and to identify seroreactive and serodiagnostic antigens.

Our results showed distinct IgG reactivity against dozens of differentially reactive leptospiral antigens in both acute- and convalescent-phase sera. The high reactivity detected in most of the acute-phase patients led us to speculate how the IgG response could rise so quickly after infection. The first exposure to an infectious agent in a previously naïve individual is expected to take 10–14 days before mounting an IgG response and the onset of symptoms vary according to the pathogen's incubation period. The incubation period for leptospirosis ranges from as few as 2 to as many as 30 days and the onset of symptoms usually comes together with the appearance of agglutinating antibodies, which increase with disease progression [1]. In this study, the acute-phase patients had a mean of 6 (IQR 5–8) days of symptoms onset before blood sampling and no correlation was observed between IgG reactivity and numbers of days of symptoms before sample collection (Table S4). Therefore, we speculate that the symptomatic individuals with less reactivity in the acute group may have experienced a shorter incubation period before becoming symptomatic compared to those with a broader and more intense response. Alternatively, rapid onset of the IgG responses in acutely infected subjects may be an anamnestic response from a previous clinical or subclinical exposure to the organism. Previously



**Figure 4. Receiver operator characteristics (ROC) curves.** (A) ROC curve for each differentially reactive antigen identified for acute-phase patients when compared to high endemic area group. The domains of the Lig proteins are highlighted on the right; antigens on the left are sorted by decreasing AUC, from left to right, top to bottom. (B) Multiple antigens ROC graphs for acute- (left) and convalescent- (right) phase patients when increasing the number of differentially reactive antigens. Differentially reactive antigens were sorted by decreasing single antigen AUC.  
doi:10.1371/journal.pntd.0002499.g004

exposed individuals can produce antibody more rapidly from the memory pool within a few days post-exposure.

Here we showed that healthy individuals living in an area with endemic transmission of leptospirosis have higher antibody responses than those from outside the endemic environment. Previous exposure can lead to background reactivity and false positive results, interfering with identification of true active leptospirosis cases especially among those individuals living in areas with endemic transmission. It has been previously reported a 15% overall prevalence of anti-leptospire antibodies detected by MAT in healthy individuals living in that urban slum community (high endemic area group) [12]. Most of the antibodies detected by MAT are directed against leptospiral LPS. Here, we show that MAT-negative healthy individuals living within a community with high endemic transmission of leptospirosis present higher overall seroreactivity against leptospiral proteins than healthy individuals from outside the endemic area, suggesting that protein antigens may also play a role in background reactivity. The shifts in

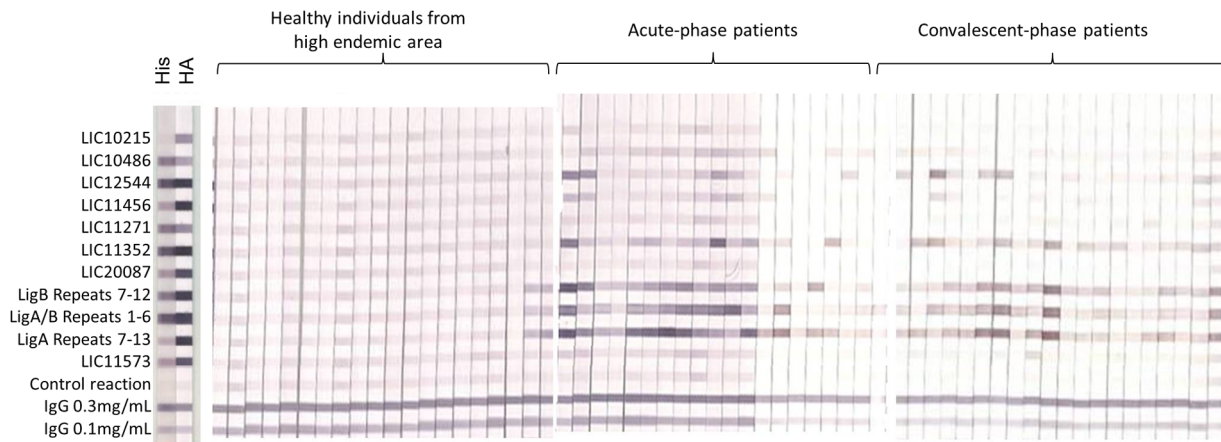
background reactivity between groups of healthy individuals are small compared to the large increases in reactivity seen after acute infection and convalescence. Our results also show that the reactivity against the proteins on the chip doesn't differ between MAT-positive and MAT-negative healthy individuals.

Despite the background reactivity seen for the high endemic area group, we were able to identify several individual antigens that were differentially reactive for acute- and/or convalescent-phase patients when compared to that control group. These antigens can be considered for use alone in single antigen ELISAs or together in a multiplex assay. The diagnostic accuracy was assessed when several antigens were used together in combination. The most accurate test results to distinguish acutely infected subjects from controls were obtained when 11 antigens were combined together and 14 antigens, for convalescent cases. The use of a minimal set of antigens in an assay would represent the best option in terms of production complexity and manufacturing costs. However, our group has previously shown

**Table 2. Accuracy of the differentially reactive antigens for both acute- and convalescent-phase patients after array probing.**

Antigen	Acute				Convalescent			
	Se	Spe	AUC	BH $\rho$ -value	Se	Spe	AUC	BH $\rho$ -value
LigA7-13	88.00%	87.50%	0.894	<1E-14	94.00%	98.80%	0.965	<1E-14
LigB7-12	86.00%	83.80%	0.857	8.54E-11	96.00%	96.30%	0.968	<1E-14
LIC11352	88.00%	73.80%	0.841	8.54E-11	92.00%	97.50%	0.986	<1E-14
LIC10215	92.00%	67.50%	0.865	1.42E-11	86.00%	83.80%	0.879	1.79E-13
LIC11573	80.00%	67.50%	0.775	1.73E-05	88.00%	88.80%	0.926	<1E-14
LIC11456 <sup>a</sup>	82.00%	68.80%	0.763	2.69E-05	80.00%	78.80%	0.851	1.57E-09
LigA/B1-6	74.00%	72.50%	0.785	1.80E-06	86.00%	96.30%	0.956	<1E-14
LIC11335	92.00%	53.80%	0.724	1.40E-04	90.00%	62.50%	0.749	1.14E-05
LIC11222 <sup>b</sup>	94.00%	50.00%	0.711	4.01E-04	94.00%	30.00%	0.568	4.33E-01
LIC11389	60.00%	77.50%	0.737	2.49E-04	66.00%	77.50%	0.77	2.73E-06
LIC11955 <sup>b</sup>	90.00%	45.00%	0.687	2.75E-03	90.00%	20.00%	0.477	9.67E-01
LIC11271	88.00%	46.30%	0.713	9.08E-04	88.00%	78.80%	0.877	3.83E-14
LIC10486	90.00%	42.50%	0.677	6.57E-03	90.00%	67.50%	0.831	5.04E-09
LIC12180 <sup>b</sup>	86.00%	45.00%	0.663	5.85E-03	88.00%	27.50%	0.534	5.36E-01
LIC10191 <sup>b</sup>	36.00%	93.80%	0.678	2.07E-03	90.00%	43.80%	0.655	5.52E-02
LIC20042 <sup>b</sup>	82.00%	45.00%	0.672	7.07E-03	22.00%	91.30%	0.525	8.68E-01
LIC20087 <sup>a</sup>	76.00%	60.00%	0.699	3.32E-03	96.00%	86.30%	0.948	<1E-14
LIC12544 <sup>b</sup>	88.00%	41.30%	0.615	1.03E-01	88.00%	91.30%	0.917	<1E-14
LIC11570 <sup>a</sup>	86.00%	56.30%	0.75	3.15E-04	96.00%	78.80%	0.892	2.21E-14
LIC20301 <sup>a</sup>	86.00%	51.30%	0.698	2.77E-03	92.00%	75.00%	0.861	8.83E-12
LIC10524 <sup>a</sup>	78.00%	76.30%	0.781	1.59E-05	78.00%	81.30%	0.846	1.40E-08
LIC11437 <sup>b</sup>	82.00%	45.00%	0.633	6.36E-02	74.00%	72.50%	0.767	3.77E-05
LIC10483 <sup>b</sup>	68.00%	50.00%	0.575	2.31E-01	68.00%	67.50%	0.715	6.23E-04
LIC10623 <sup>b</sup>	96.00%	11.30%	0.456	6.05E-01	86.00%	43.80%	0.67	2.19E-02

Se = Sensitivity; Spe = Specificity; AUC = Area under the curve. Antigens *in italic* were considered either not seroreactive (<sup>a</sup>) (average signal intensity below the cut-off) or cross-reactive (<sup>b</sup>) (BH $\rho$ <0.05) for that group but were among the differentially reactive set for the other group. NOTE: Different specificities for acute and convalescent-phase cases are a result of the SVM computational analysis, described in the methods section.  
doi:10.1371/journal.pntd.0002499.t002



**Figure 5. Array validation by immunostrips probing.** Strips are grouped by sample type. Probing for His and HA tags are highlighted on the left.

doi:10.1371/journal.pntd.0002499.g005

that the addition of antigens can reduce the effect of noise in the data introduced from variables such as executing it in different locations, at different times and by different operators [34]. A multiplex test using several antigens could minimize the effect of these variables and justify the development of a more robust assay of this kind.

Five of the leptospiral proteins identified here have been previously reported reactive in patients' sera including the non-identical domains of the Lig proteins, LipL32, chaperonin GroEL, DnaK and Loa22 [20,35,36]. Different platforms have been developed to employ the Lig proteins as serodiagnostic markers for human leptospirosis with promising results [20,24,37,38]. Lig-based immunoblot assays for IgM detection showed superior performance than MAT and superior performance than a commonly used whole-cell ELISA in Brazil during early acute phase [21]. A new Lig-based rapid serological test, the DPP assay, was recently developed and also outperformed the whole-cell IgM ELISA assay for severe acute cases, particularly for patients tested early in the course of the disease [24]. For LipL32, GroEL, DnaK and Loa22, however, the findings were not as encouraging [34,39,40], even though LipL32 in combination with LipL21 and OmpL1 [41] improved its diagnostic performance in ELISA platforms. The identification of these previously reported reactive antigens is proof-of-concept for the protein microarray antigen discovery platform.

In this study, the well-known antigens LipL32 and the non-identical domains of the Lig proteins had the best sensitivity and specificity of all antigens probed. The next best differentially reactive antigen for detecting acute-phase patients was the novel hypothetical protein LIC10215. Several other hypothetical proteins also found to be differentially reactive antigens identified in this work were LIC11222, LIC11955, LIC10486, LIC11271, LIC10483 and LIC20301. Although no previous functions have been assigned to these proteins, here we show that they are part of the *L. interrogans* immunoproteome and can elicit a host immune response as they are recognized by sera from infected subjects. We also discovered numerous differentially reactive antigens that are not hypothetical and have been functionally annotated including LIC20042 (BatC), LIC11889 (FlbB), LIC11573 (GspG), LIC12180 (methyltransferase), LIC11456 (LipL31), LIC11437 (adenylate/guanylate cyclase), LIC12544 (DNA binding protein), LIC20087 (outermembrane), LIC10623 (MotB), LIC11570 (GspD).

The results reported here were from a protein microarray derived from one leptospire serovar, *L. interrogans* serovar Copenhageni, probed with sera from acute- and convalescent-phase patients from a well-characterized model epidemiological setting in Salvador [10–12]. This study was limited by the restricted number of antigens selected for the array and also by the prevalence of one specific serovar at our study site. Further research is needed to investigate the diversity of the antibody profile after exposure to different serovars. All the samples used here corresponded to hospitalized leptospirosis patients, but the immune response may be different for mild presentations. Finally, we recognize the importance of also evaluating the IgM antibody response to understand the kinetics of the humoral immune response.

In other protein microarray studies of kind we have found that proteins are not randomly selected for recognition by the immune system and antigens share proteomic features that increase their likelihood to be seroreactive and serodiagnostic [15,16]. Interrogating the antibody response in a whole proteome scale allows molecular features related to antigenicity to be classified. Proteomic feature enrichment analysis for antibody recognition of leptospiral antigens will be the focus of a separate study using the full leptospire proteome consisting of 3,667 proteins, in which we will also assess the IgM reactivity profile to leptospirosis. We also aim to probe with more diverse specimen collections worldwide to better characterize the antibody repertoire against different leptospire species and serovars, and from different mammalian hosts.

In summary, we reported a protein microarray approach for *L. interrogans* serovar Copenhageni and discovered a limited set of 24 differentially reactive antigens. The antigens identified could be applied to improve the accuracy of rapid tests to diagnose leptospirosis in resource-limited settings. The results show that this is a feasible approach that can be applied in the future to study the humoral immune response in other epidemiological settings worldwide, to examine the antibody response after exposure to different leptospire species and determine the antibody profiles elicited by the pathogen in domestic animals and reservoir hosts.

## Supporting Information

**Figure S1 Representative microarray pictures.** (A) Two subarrays showing His (left) and HA (right) probing for protein expression evaluation. Each of the arrays used for this study

contained 16 subarrays. Highlighted spots indicate IVTT control reactions (NoDNA, red boxes), IgGmix (orange) and EBNA-1 (green). (B) Representative sub-array showing the difference in the seroreactivity between an individual from high endemic area (negative sample) and a convalescent-phase patient (positive sample). (TIF)

**Figure S2 Overall IgG response of healthy controls from high endemic area.** (A) IgG response of 10 MAT-positive and 10 MAT-negative endemic controls against 200 antigens is shown as a heatmap of reactivity according to the colorized scale with red strongest, black in-between and green weakest. (B) Average signal intensity of MAT-positive and MAT-negative endemic controls for some of the reactive antigens identified in this study. The green line shows the cut-off and antigens with average signal intensity below that line is not considered significant in this analysis. (TIF)

**Figure S3 Correlation between MAT assay and array signal intensity.** For each patient, the average signal intensity of the reactive antigens for acute (left) and convalescent (right) phase patients is plotted in the Y axis and the MAT titer in the X axis. (TIF)

**Figure S4 Receiver operator characteristic curves.** ROC curves for each differentially reactive antigen identified for convalescent-phase patients when compared to high endemic area group. The domains of the Lig proteins are highlighted on the bottom; antigens are sorted by decreasing AUC, from left to right, top to bottom. (TIF)

**Table S1 List of protein features used for selecting ORFs that would compose the array.** (DOCX)

## References

- Ko AI, Goarant C, and Picardeau M (2009) Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736–747.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz, et al. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Palaniappan RU, Ramanujam S, and Chang YF (2007) Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 20: 284–292.
- McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL (1984) Doxycycline therapy for leptospirosis. *Annals of internal medicine* 100: 696–698.
- Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, et al. (1988) Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet* 1: 433–435.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, and Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386.
- WHO (2003) Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland: WHO.
- Brasil Ministerio da Saude (2012) Indicadores e Dados Basicos para a Saude - Brasil. Brasilia, Brasil: Brasil Ministerio da Saude.
- Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr., and Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354: 820–825.
- de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, et al. (2008) Carriage of Leptospira interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 108: 1–5.
- Reis RB, Ribeiro GS, Felzenburgh RD, Santana FS, Mohr S, et al. (2008) Impact of environment and social gradient on Leptospira infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e228.
- Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, et al. (2009) Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. *Nature* 460: 762–765.
- Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuermer RL, Adler B, et al. (2007) Response of Leptospira interrogans to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun* 75: 2864–2874.
- Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. *Bioinformatics* 26: 2936–2943.
- Liang L, and Felgner PL (2012) Predicting antigenicity of proteins in a bacterial proteome; a protein microarray and naive bayes classification approach. *Chem Biodivers* 9: 977–990.
- Vigil A, Ortega R, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Tan X, et al. (2010) Identification of the feline humoral immune response to Bartonella henselae infection by protein microarray. *PLoS One* 5: e11447.
- Liang L, Tan X, Juarez S, Villaverde H, Pablo J, et al. (2011) Systems biology approach predicts antibody signature associated with Brucella melitensis infection in humans. *J Proteome Res* 10: 4813–4824.
- Davies DH, Liang X, Hernandez JE, Randall A, Hirst S, et al. (2005) Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 547–552.
- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, et al. (2003) Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 49: 929–945.
- Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, et al. (2007) Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 45: 1528–1534.
- Koizumi N, and Watanabe H (2004) Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22: 1545–1552.
- Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, et al. (2007) The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 25: 6277–6286.
- Nabity SA, Ribeiro GS, Lessa Aquino C, Takahashi D, Damiao AO, et al. (2012) Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1878.
- Baldi PH, G.W (2002) *DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling*, Cambridge University Press, Oxford.
- Baldi PB, S. R (2001) *Bioinformatics: the machine learning approach*, MIT Press, Cambridge.
- Kim SB, Chen VC, Park Y, Ziegler TR, and Jones DP (2008) Controlling the False Discovery Rate for Feature Selection in High-resolution NMR Spectra. *Stat Anal Data Min* 1: 57–66.
- Evangelista KV, and Coburn J (2010) Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 5: 1413–1425.

**Table S2 Clinical characteristics of the leptospirosis patients providing sera for the protein microarray evaluation.**

(DOCX)

**Table S3 List of seroreactive antigens.**

(DOC)

**Table S4 Reactivity signals of patients' acute serum against the antigens LipL32, LigA Repeats7–13, LigB Repeats7–12 in the protein microarray according to patient characteristics.**

(DOCX)

**Table S5 Accuracy of the differentially reactive antigens after immunostrips probing.**

(DOC)

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Mandana Farhadieh for the technical assistance and Nivison Nery Junior and Renan Rosa for management of patient's information. Control samples were provided by the Fundação Hemoba of Bahia and General Clinical Research Center at the University of California, Irvine. Authors also thank all participants involved in this study, especially the leptospirosis patients and the residents of the slum community of Pau da Lima in Salvador, Brazil.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CLA EAW GSR AV RG DM XL MGR AIK MAM PLF. Performed the experiments: CLA CBR JP RS AJ. Analyzed the data: CLA LL PLF AIK. Contributed reagents/materials/analysis tools: DM XL AIK MGR MAM PLF. Wrote the paper: CLA GSR PLF MAM AIK. Selected the serum samples: EAW GSR AIK.

29. Adler B, and de la Pena Moctezuma A (2010) *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287–296.
30. Trieu A, Kayala MA, Burk C, Molina DM, Freilich DA, et al. (2011) Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Mol Cell Proteomics* 10: M111 007948.
31. Tan X, Chun S, Pablo J, Felgner P, Liang X, et al. (2012) Failure of the smallpox vaccine to develop a skin lesion in vaccinia virus-naive individuals is related to differences in antibody profiles before vaccination, not after. *Clin Vaccine Immunol* 19: 418–428.
32. Barry AE, Trieu A, Fowkes FJ, Pablo J, Kalantari-Dehaghi M, et al. (2011) The stability and complexity of antibody responses to the major surface antigen of *Plasmodium falciparum* are associated with age in a malaria endemic area. *Mol Cell Proteomics* 10: M111 008326.
33. Pinne M, Matsunaga J and Haake DA (2012) Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol* 22: 6074–87.
34. Barbour AG, Jasinskas A, Kayala MA, Davies DH, Steere AC, et al. (2008) A genome-wide proteome array reveals a limited set of immunogens in natural infections of humans and white-footed mice with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 76: 3374–3389.
35. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, et al. (2001) Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 69: 4958–4968.
36. Gamberini M, Gomez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcelos SA, et al. (2005) Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 244: 305–313.
37. Srimanote P, Wongdeethai N, Jianampunkul P, Samonkiert S, Leepiyasakulchai C, et al. (2008) Recombinant ligA for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. *J Microbiol Methods* 72: 73–81.
38. Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, et al. (2004) Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol* 53: 975–984.
39. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, et al. (2001) Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 39: 3303–3310.
40. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, et al. (2011) Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 289–297.
41. Sun A, Wang Y, Du P, Wu S, and Yan J (2011) A sensitive and specific IgM-ELISA for the serological diagnosis of human leptospirosis using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion protein. *Biomed Environ Sci* 24: 291–299.

#### IV. DISCUSSÃO

Microarranjos de proteínas constituem uma ferramenta importante na caracterização de anticorpos específicos contra patógenos após a exposição a um agente infeccioso. O grupo do Dr. Felgner já aplicou essa metodologia a mais de 25 agentes de importância médica, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintos e alguns dos antígenos identificados através dessa abordagem foram empregados com sucesso em diferentes plataformas de diagnóstico (34-36, 38, 39). Nenhuma metodologia disponível atualmente permite um entendimento tão abrangente sobre a resposta imune humoral à uma infecção. No presente trabalho, foi construído um microarranjo de proteínas abrangendo 2241 proteínas, o que corresponde a 61% do genoma codificante de *L. interrogans* Copenhageni, para examinar a resposta por anticorpos IgG contra o patógeno. O foco desse estudo foi traçar o perfil da resposta imune associada à exposição e infecção pela bactéria e identificar antígenos sororreativos com potencial diagnóstico e vacinal.

Os resultados mostraram uma reatividade por anticorpos IgG contra diversos antígenos de leptospira, tanto em soros de fase aguda quanto em soros de fase convalescente. A intensa reatividade IgG detectada nos pacientes de fase aguda levanta a questão sobre como tais anticorpos podem ser detectados em um curto intervalo de tempo após a infecção. Espera-se que a montagem de uma resposta IgG demore de 10-14 dias após a primeira exposição de um indivíduo não primado à um agente infeccioso e o aparecimento dos sintomas pode variar de acordo com o período de incubação do micro-organismo. No caso da leptospirose, o período de incubação pode levar de 2 a 30 dias e os sintomas geralmente surgem juntamente com o aparecimento de anticorpos aglutinantes, cujos níveis aumentam com a progressão da doença (1). No presente estudo, os pacientes de fase aguda apresentavam, em média, 6 (IQR 5-8) dias de sintomas antes da coleta da amostra de fase aguda. Portanto, pode-se especular que os indivíduos sintomáticos que apresentaram menor reatividade no grupo agudo tenham vivenciado um menor período de incubação até se tornarem sintomáticos em comparação àqueles com uma reatividade maior e mais abrangente. Alternativamente, esse rápido surgimento de anticorpos IgG nos pacientes de fase aguda pode estar relacionado a uma resposta de memória proveniente de uma exposição prévia clínica ou subclínica ao micro-organismo, já que indivíduos com exposição prévia a um determinado patógeno produzem anticorpos mais rapidamente após exposição.

Indivíduos saudáveis vivendo em área com transmissão endêmica para leptospirose apresentam maior resposta por IgG do que aqueles que vivem fora do ambiente endêmico. Exposição prévia pode levar a um fundo de reatividade e, conseqüentemente, gerar resultados

falso-positivos em ensaios diagnósticos, interferindo com a identificação de casos verdadeiro-positivos da doença, especialmente entre indivíduos provenientes de área com transmissão endêmica de leptospirose. Reis e colaboradores relataram uma prevalência de aproximadamente 15% de anticorpos anti-leptospira em indivíduos saudáveis vivendo na comunidade de Pau-da-Lima (grupo de área altamente endêmica), detectados através do MAT. A maior parte dos anticorpos detectados pelo MAT são direcionados ao LPS bacteriano. Os resultados apresentados aqui mostram, no entanto, que indivíduos MAT-negativos vivendo em área altamente endêmica para leptospirose apresentam sororreatividade maior contra proteínas de leptospira quando comparados a indivíduos saudáveis que vivem fora do ambiente endêmico. Tais resultados sugerem que antígenos proteicos podem também contribuir para o desenvolvimento do fundo de reatividade detectado nos indivíduos saudáveis de área endêmica. Entretanto, é importante ressaltar que a diferença no fundo de reatividade nos grupos de indivíduos saudáveis (provenientes de áreas endêmica e não endêmica) é pequena se comparada ao significativo aumento na resposta IgG de pacientes de fases aguda e convalescente. Os resultados mostram, ainda, que não há diferença na resposta contra as proteínas presente no microarranjo entre indivíduos saudáveis MAT-positivos e MAT-negativos.

Apesar do fundo de reatividade observado para o grupo de área altamente endêmica, foi possível identificar diversos antígenos diferencialmente reativos para pacientes de fase aguda e/ou convalescente quando comparados a esse grupo controle. Tais antígenos podem ser considerados para uso individual em ensaios do tipo ELISA ou em combinação. Obteve-se maior acurácia na identificação de indivíduos em fase aguda quando 11 antígenos foram avaliados em combinação. Para os pacientes convalescentes, maior acurácia foi obtida com a combinação de 4 antígenos. O uso de um conjunto limitado de antígenos em um ensaio representaria a melhor opção considerando-se aspectos como a complexidade e custos de produção. No entanto, o grupo do Dr. Felgner mostrou, em um trabalho publicado em 2008 (31), que a adição de antígenos pode levar à redução do ruído nos dados introduzido por variáveis como execução em diferentes locais, em momentos distintos e por diversos operadores. Um ensaio multiplex com o emprego de múltiplos antígenos minimizaria o efeito dessas variáveis, justificando o desenvolvimento de um teste mais robusto.

Cinco das proteínas identificadas nesse estudo já foram previamente descritas como sendo sororreativas em pacientes com leptospirose, incluindo os domínios não idênticos das proteínas Lig, LipL32, a proteína chaperonina GroEL, DnaK e Loa22 (9, 40, 41). Diferentes plataformas foram desenvolvidas para o emprego das proteínas Lig como marcadores sorológicos para leptospirose humana, com resultados promissores. Ensaio do tipo



“immunoblot” para detecção de IgM apresentaram melhor desempenho do que o MAT e do que o teste de ELISA baseado no extrato bacteriano que é comumente empregado no Brasil para o diagnóstico da leptospirose aguda (42). Um novo teste rápido baseado nas proteínas Lig, o DPP, foi desenvolvido recentemente e também superou o ensaio de ELISA baseado em extrato bacteriano para o diagnóstico de casos graves agudos, especialmente para pacientes no início do curso da doença (25). Para LipL32, GroEL, DnaK e Loa22, no entanto, os achados não foram tão promissores (43, 44), embora a combinação de LipL32 com LipL21 e OmpL1 tenha melhorado o desempenho diagnóstico em plataformas ELISA (45). A identificação desses antígenos previamente descritos atua como uma prova de conceito para a plataforma de descobrimento de novos antígenos através do microarranjo de proteínas.

Os conhecidos antígenos LipL32 e os domínios das proteínas Lig apresentaram melhor sensibilidade e especificidade dentre todos os antígenos investigados. Depois destes, a proteína hipotética LIC10215 mostrou melhor acurácia na detecção de casos agudos da doença. Outras proteínas hipotéticas também classificadas como diferencialmente reativas nesse trabalho foram LIC11222, LIC11955, LIC10486, LIC11271, LIC10483 and LIC20301. Embora nenhuma função tenha sido associada a essas proteínas até o momento, aqui é mostrado que elas fazem parte do arsenal proteico de *L. interrogans* e são capazes de induzir uma resposta imune no hospedeiro uma vez que são reconhecidas por soros de indivíduos infectados. Inúmeros antígenos diferencialmente reativos identificados nesse estudo foram anotados funcionalmente. São eles: LIC20042 (BatC), LIC11889 (FibB), LIC11573 (GspG), LIC12180 (metil-transferase), LIC11456 (LipL31), LIC11437 (adenilato/guanilato ciclase), LIC12544 (proteína de ligação ao DNA), LIC20087 (proteína de membrana externa), LIC10623 (MotB), LIC11570 (GspD).

Os resultados descritos aqui são baseados em um microarranjo de proteínas construído a partir de um único sorovar, *L. interrogans* sorovar Copenhageni, hibridizado com soros de pacientes com leptospirose em fase aguda e convalescente provenientes de um sítio de estudo bem caracterizado em Salvador (22, 27, 46). O estudo foi limitado pelo número restrito de proteínas selecionadas para comporem o microarranjo e pela prevalência de um sorovar específico no sítio de estudo. Estudos complementares serão necessários para investigar a diversidade no perfil de anticorpos após exposição a diferentes sorovares. Todas as amostras empregadas nesse estudo correspondem a pacientes hospitalizados, sendo importante ressaltar que a resposta imune pode ser diferente no caso de apresentações clínicas mais brandas. Por fim, a avaliação da resposta imune via anticorpos IgM é extremamente importante no entendimento da cinética da resposta imune humoral contra leptospirose.

Em outros estudos de microarranjo proteico desse tipo, o grupo do Dr. Felgner observou que as proteínas não são reconhecidas aleatoriamente pelo sistema imune e que os antígenos que compartilham determinadas características proteicas apresentam maior chance de ser sororreativos (33, 47). A investigação da resposta imune por anticorpos em escala proteômica permite a classificação de características relacionadas à antigenicidade. Análises de enriquecimento de características proteômicas para reconhecimento de antígenos de leptospira por anticorpos será o foco de um estudo em separado, o qual abrangerá o genoma codificante completo de *L. interrogans* e no qual também será estudado o perfil de resposta imune humoral por anticorpos IgM. Nesse estudo, pretende-se hibridizar o microarranjo com um conjunto mais completo de amostras de soro de indivíduos infectados em diferentes países ao redor do mundo na tentativa de melhor caracterizar o repertório de anticorpos contra diferentes espécies e sorovares causadores de leptospirose.

Em resumo, foi descrita uma abordagem de microarranjo proteico para *L. interrogans* sorovar Copenhageni e descobriu-se um grupo de 24 antígenos com reatividade aumentada nos indivíduos infectados em comparação aos indivíduos saudáveis. Os antígenos identificados podem ser empregados no melhoramento dos ensaios atualmente disponíveis para o diagnóstico da leptospirose nas unidades primárias de saúde nos países em desenvolvimento. Os resultados mostram, ainda, que a abordagem empregada é viável e pode ser aplicada também em estudos futuros acerca da resposta imune humoral em outros cenários epidemiológicos ao redor do mundo, para examinar a resposta por anticorpos após exposição a diferentes espécies de leptospira e determinar o perfil de anticorpos induzidos pelo patógeno em animais domésticos e outros hospedeiros reservatórios.

## V. CONCLUSÕES

- Foi possível identificar 24 antígenos cujos níveis de IgG específica encontraram-se aumentados nos pacientes de fase aguda e/ou de fase convalescente quando comparados aos indivíduos saudáveis de área hiperendêmica;
- Entre os antígenos sororreativos identificados, há antígenos cuja sororreatividade já havia sido previamente descrita – como as proteínas Lig, LipL32, GroEL, Loa22 e DnaK, validando a plataforma de microarranjo de proteínas no descobrimento de antígenos imunodominantes;
- Indivíduos saudáveis residentes na comunidade de Pau da Lima apresentam fundo de reatividade na resposta por anticorpos contra leptospirose quando comparados a doadores de sangue da cidade de Salvador/BA e a voluntários saudáveis estadunidenses;
- Novos antígenos imunodominantes foram identificados nesse estudos, incluindo proteínas hipotéticas nunca antes descritas;
- Individualmente, as proteínas Lig e LipL32 apresentaram melhor acurácia diagnóstica na identificação tanto de casos agudos como de casos convalescentes de leptospirose;
- A combinação de 11 antígenos – para casos agudos – e 4 antígenos – para casos convalescentes – forneceram melhor acurácia diagnóstica;
- A plataforma de microarranjo de proteínas se mostrou apropriada para o estudo da resposta imune por anticorpos em pacientes com leptospirose e identificação de novos marcadores diagnósticos.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736-47.
2. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010;5(9):1413-25.
3. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. *Leptospirosis*: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):408-19.
4. Levett PN. *Leptospirosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326.
5. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. *Leptospirosis*: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757-71.
6. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004;186(7):2164-72.
7. Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. *Leptospirosis*: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(3):284-92.
8. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. *Leptospirosis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18(5):376-86.
9. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*. 2003;49(4):929-45.
10. Malmström J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*. 2009;460(7256):762-5.
11. Organization WH. Report of the First Meeting of the *Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group* Geneva: World Health Organization; 2010.
12. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43(1):1-9.
13. Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín-González C, Amador JJ, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*. 1998;178(5):1457-63.
14. Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajn bok J, et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 1999;29(6):1561-3.
15. Helmerhorst HJ, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, et al. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med*. 2012;70(5):215-21.
16. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, et al. *Leptospirosis*-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):505-8.
17. Saude Md. Casos mensais confirmados de *Leptospirose* Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, Brasil: Ministerio da Saude; 2013.
18. Wuthiekanun V, Sirisukkarn N, Daengsupa P, Sakaraserane P, Sangkakam A, Chierakul W, et al. Clinical diagnosis and geographic distribution of leptospirosis, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(1):124-6.
19. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(10):631-8.
20. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007;357(10):1018-27.
21. Nations U. The challenge of slums: global report on human settlements. Geneva: UN-HABITAT; 2003.
22. de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, Pereira MM, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*. 2008;108(1):1-5.

23. Organization WH. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland: WHO; 2002.
24. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med.* 1984;100(5):696-8.
25. Nabity SA, Ribeiro GS, Aquino CL, Takahashi D, Damião AO, Gonçalves AH, et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):e1878.
26. Johnson WD, Silva IC, Rocha H. Serum creatine phosphokinase in leptospirosis. *JAMA.* 1975;233(9):981-2.
27. Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet.* 1999;354(9181):820-5.
28. Yoo SM, Choi JH, Lee SY, Yoo NC. Applications of DNA microarray in disease diagnostics. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19(7):635-46.
29. van Manen D, van 't Wout AB, Schuitemaker H. Genome-wide association studies on HIV susceptibility, pathogenesis and pharmacogenomics. *Retrovirology.* 2012;9:70.
30. Suzuki K, Nakamura K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Akama T, et al. [Comprehensive analysis of RNA expression of *Mycobacterium leprae* and clinical and biological significance]. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi.* 2009;78(1):61-5.
31. Barbour AG, Jasinskas A, Kayala MA, Davies DH, Steere AC, Baldi P, et al. A genome-wide proteome array reveals a limited set of immunogens in natural infections of humans and white-footed mice with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 2008;76(8):3374-89.
32. Davies DH, Liang X, Hernandez JE, Randall A, Hirst S, Mu Y, et al. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):547-52.
33. Liang L, Felgner PL. Predicting antigenicity of proteins in a bacterial proteome; a protein microarray and naïve Bayes classification approach. *Chem Biodivers.* 2012;9(5):977-90.
34. Liang L, Tan X, Juarez S, Villaverde H, Pablo J, Nakajima-Sasaki R, et al. Systems biology approach predicts antibody signature associated with *Brucella melitensis* infection in humans. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4813-24.
35. Tan X, Chun S, Pablo J, Felgner P, Liang X, Davies DH. Failure of the smallpox vaccine to develop a skin lesion in vaccinia virus-naïve individuals is related to differences in antibody profiles before vaccination, not after. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(3):418-28.
36. Trieu A, Kayala MA, Burk C, Molina DM, Freilich DA, Richie TL, et al. Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(9):M111.007948.
37. Vigil A, Ortega R, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Tan X, Chomel BB, et al. Identification of the feline humoral immune response to *Bartonella henselae* infection by protein microarray. *PLoS One.* 2010;5(7):e11447.
38. Barry AE, Trieu A, Fowkes FJ, Pablo J, Kalantari-Dehaghi M, Jasinskas A, et al. The stability and complexity of antibody responses to the major surface antigen of *Plasmodium falciparum* are associated with age in a malaria endemic area. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(11):M111.008326.
39. Pinne M, Matsunaga J, Haake DA. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol.* 2012;194(22):6074-87.
40. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001;69(8):4958-68.
41. Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;244(2):305-13.
42. Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, et al. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1528-34.

43. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3303-10.
44. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(5):289-97.
45. Sun A, Wang Y, DU P, Wu S, Yan J. A sensitive and specific IgM-ELISA for the serological diagnosis of human leptospirosis using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion protein. *Biomed Environ Sci.* 2011;24(3):291-9.
46. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(4):e228.
47. Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, Felgner PL, et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. *Bioinformatics.* 2010;26(23):2936-43.

## VII. ANEXO I

Lista de siglas de abreviaturas:

BA	Bahia
CD4	do inglês, “Cluster of Differentiation 4”
CD8	do inglês, “Cluster of Differentiation 8”
CDS	do inglês, “coding sequence”
ELISA	do inglês, “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
IgM	imunoglobulina M
IgG	imunoglobulina G
IQR	do inglês, “Interquatile Range”
LERG	do inglês, “Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group”
Lig	do inglês, “Leptospiral ImmunoGlobulin-like”
LPS	lipopolissacarídeo
MAT	do inglês, “MicroAgglutination Test”
NIH	do inglês, “National Institutes of Health”
NLR	do inglês, “Nod-Like Receptor”
PCR	do inglês, “Plimarease Chain Reaction”
TLR	do inglês, “Toll-Like Receptor”

## **VIII. ANEXO II**

Protocolos de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

## PARECER Nº 76/2005

Protocolo: 175

**Projeto de Pesquisa: Um estudo de Leptospirose em Salvador, Bahia:  
apresentação clínica e diagnóstico microbiológico**

**Pesquisador Responsável: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis**

**Instituição ou Departamento: LPBM/FIOCRUZ**

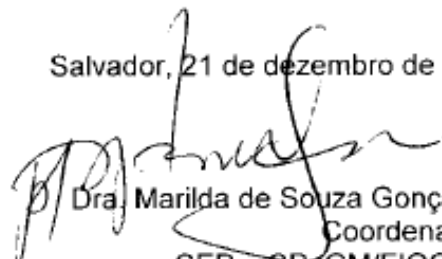
### **Considerações:**

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Acrescentamos que conforme a Resolução 196/96, item VIII.4c, relativo a protocolos que envolvem áreas temáticas especiais tais como pesquisas coordenadas do exterior ou com participação estrangeira, o referido projeto será encaminhado a CONEP para análise e emissão de parecer final.

Salvador, 21 de dezembro de 2005

  
Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Coordenadora  
CEP - CPqGM/FIOCRUZ

## TRADUÇÃO PARA O PORTUGUÊS

**Rosemary Kraemer, Ph.D.**

Diretora, Programas de Proteção de Pesquisas em Humanos  
Divisão de Integridade em Pesquisas  
rtkrame@med.cornell.edu

Programas de Pesquisa e Patrocínios  
407 East, 61<sup>st</sup> street, 1º Andar  
Nova Iorque, Nova Iorque 10065

Telefone: 646-962-8196

E-mail:

3 de Fevereiro de 2009

Albert Ko, M.D.

Professor Associado de Medicina

Tipo de Submissão: Emenda  
Número do Protocolo: 9706001245  
Título do Protocolo: Leptospirose Urbana Epidêmica em Salvador, Brasil: Um estudo da apresentação clínica e desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápido  
Natureza da Emenda: Submissão de aplicação para financiamento (NIAID/NIH 5 R43 AI072856)

Prezado Dr. Ko:

O Comitê de Revisão Institucional (IRB) realizou uma revisão diligente e aprovou a emenda do protocolo mencionado acima.

Por favor, não hesite em contatar a equipe do escritório do IRB se você tiver quaisquer questões ou necessitar de assistência para cumprir os termos desta aprovação.

Atenciosamente,

Rosemary Kraemer, Ph.D.

Diretora, Programas de Proteção de Pesquisas em Humanos

Por favor, note as importantes informações sobre esta aprovação:

- **Conformidade das faturas:** Esta aprovação é dependente de aderência contínua com as políticas institucionais de conformidade com as faturas.
- **Informação sobre o WCMC-NYP IRBs:** Os Comitês de Revisão de Institucional do Weil Cornell Medical College (WCMC)-New York Presbyterian (NYP) são constituídos conforme requisição Escritório Federal para Proteções de Pesquisas em Humanos (OHRP). O WCMC tem um Compromisso de Extensão Federal (FWA) com o OHRP. O número de FWA é FWA00000093. Ambos os IRBs da WCMC-NYP estão registrados sob esta FWA. Os números de registros para os IRBs são: IRB #1 IRB00000952; e IRB #2 IRB00004327. Se você precisar de qualquer informação adicional sobre os termos do FWA do WCMC ou dos IRBs do WCMC, por favor contate [irb@med.cornell.edu](mailto:irb@med.cornell.edu).