

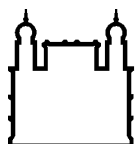
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDOS *IN SILICO* DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR
LEPTOSPIRA SPP. PATOGÊNICAS: UMA NOVA ABORDAGEM PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS VACINAIS E DIAGNÓSTICOS.

FERNANDA DE MORAES MAIA

Rio de Janeiro
Agosto de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Fernanda de Moraes Maia

Estudos *in silico* de proteínas secretadas por *Leptospira* spp. patogênicas: Uma nova abordagem para identificação de alvos vacinais e diagnósticos.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2022

ii

Maia, Fernanda de Moraes.

Estudos *in silico* de proteínas secretadas por *Leptospira* spp. patogênicas: Uma nova abordagem para identificação de alvos vacinais e diagnósticos. / Fernanda de Moraes Maia. - Rio de Janeiro, 2022.

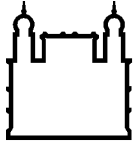
ii, 59f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientador: Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva.

Bibliografia: f. 53-59

1. Leptospirose. 2. Imunoinformática. 3. Alvos vacinais . 4. Epítomos de células B. 5. Resposta Imune. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: FERNANDA DE MORAES MAIA

**ESTUDOS *IN SILICO* DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *LEPTOSPIRA* SPP.
PATOGÊNICAS: UMA NOVA ABORDAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS
VACINAIS E DIAGNÓSTICOS.**

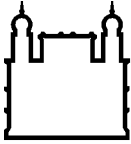
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva

Aprovada em: 17/08/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Lilian Rose Pratt Riccio - Presidente	(IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Lourdes Isaac	(USP)
Prof. Dra. Katia Eliane Santos Avelar	(IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Ana Paula Diniz Ano Bom	(Bio-Manguinhos/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior	(IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Fernanda de Moraes Maia**, sob orientação do Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva. Ao décimo sétimo dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Estudos 'in silico' de proteínas secretadas por 'Leptospira sp.' patogênicas: Uma nova abordagem para identificação de alvos vacinais e diagnósticos"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Lillian Rose Pratt Riccio – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Lourdes Isaac – USP/SP, Dr^a. Kátia Eliane Santos Avelar – IOC/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr^a. Ana Paula Dinis Ano Bom- BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ e Dr. Josué da Costa Lima Júnior - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora: Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2022.


Dr^a. Lillian Rose Pratt Riccio (Presidente da Banca):


Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa)

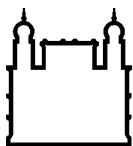
Dedico este trabalho a todos, que de alguma forma, me ajudaram a realizar esse sonho.

v

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, que sempre esteve comigo, em toda essa trajetória. Aos meus pais por me incentivarem a sonhar, e mais do que isso, a realizar meus sonhos. Ao meu orientador, por confiar em mim, e sempre exigir o máximo e me fazer crescer. Aos meus familiares e amigos pelo apoio que sempre recebo em tudo que me proponho a fazer. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.” – Marie Curie



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

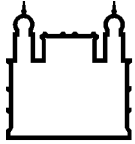
**ESTUDOS *IN SILICO* DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *LEPTOSPIRA* SPP. PATOGÊNICAS:
UMA NOVA ABORDAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS VACINAIS E DIAGNÓSTICOS.**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fernanda de Moraes Maia

A leptospirose é a zoonose mais disseminada no mundo, causando, anualmente, mais de 1 milhão de casos e levando a morte de cerca de 60 mil pessoas. A doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, transmitidas pelo contato direto com animais reservatórios ou indireto com água ou solo contaminados pela urina de animais infectados. No Brasil, a leptospirose é endêmica e acomete mais de 3.700 pessoas por ano das quais cerca de 75% evoluem para hospitalizações e resultam em uma letalidade de 9%. Além disso, a leptospirose representa um risco econômico ao país, uma vez que afeta animais de criação, com distúrbios reprodutivos e até a morte. Apesar disso a ausência de vacinas protetoras e as atuais ferramentas para monitoramento animal e diagnóstico, contribuem para a elevada taxa de hospitalizações e agravamento dos casos. Nesse contexto, proteases secretadas representam uma interessante alternativa para formulações vacinais e reativos diagnóstico, sendo importantes para a evasão do sistema imune. Porém o vasto repertório de proteínas de leptospiros dificulta sua exploração por métodos tradicionais. Assim, a imunoinformática surge como uma estratégia promissora para avaliação de dados genômicos e subsequente seleção de antígenos candidatos vacinais e de novos reativos diagnósticos. O objetivo do trabalho foi identificar epítomos alvos de anticorpos, conservados entre espécies patogênicas de *Leptospira*. Foram selecionadas 24 proteínas descritas em estudos de secretômica e no sobrenadante de leptospiros patogênicas que foram avaliadas por bioinformática quanto a sua localização subcelular, associação à virulência e antigenicidade. 6 proteínas foram consideradas secretadas, antigênicas e associadas a virulência e seguiram para a etapa de predição de epítomos lineares de células B e uma nova análise de antigenicidade, resultando em 10 epítomos preditos, em 4 proteínas, que foram sintetizados e validados experimentalmente por ELISA contra um painel de amostras de soro de 51 pacientes infectados por leptospiros patogênicas e 36 amostras não infectadas. Interessantemente, 75% das amostras dos pacientes infectados por leptospiros, utilizadas no estudo, reagiram para pelo menos 1 epítomo predito. A frequência geral (IgG ou IgM) de respondedores para os peptídeos, variou de 14% a 35%. Dessa forma, esses epítomos foram confirmados como imunogênicos em indivíduos com leptospirose, podendo ser utilizados em estudos de novas formulações vacinais e para o desenvolvimento de novos reativos diagnósticos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IN SILICO STUDIES OF PROTEINS SECRETED BY *LEPTOSPIRA* SPP. PATHOGENIC: A NEW APPROACH TO IDENTIFYING VACCINATION AND DIAGNOSIS TARGETS.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Fernanda de Moraes Maia

Leptospirosis is the most widespread zoonosis in the world, annually causing more than 1 million cases and leading to the death of about 60,000 people. The disease is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, transmitted by direct contact with reservoir animals or indirectly with water or soil contaminated by the urine of infected animals. In Brazil, leptospirosis is endemic and affects more than 3,700 people a year, of which about 75% progress to hospitalization and result in a lethality of 9%. In addition, leptospirosis represents an economic risk to the country, as it affects farm animals, with reproductive disorders and even death. Despite this, the absence of protective vaccines and the current tools for animal monitoring and diagnosis contribute to the high rate of hospitalizations and aggravation of cases. In this context, secreted proteases represent an interesting alternative for vaccine formulations and diagnostic tools, being important for evasion of the immune system. However, the vast repertoire of leptospire proteins makes it difficult to explore them by traditional methods. Thus, immunoinformatics emerges as a promising strategy for the evaluation of genomic data and subsequent selection of vaccine candidate antigens and new diagnostic tools. The objective of this work was to identify antibody target epitopes, conserved among pathogenic *Leptospira* species. Were selected 24 proteins described in secretomic studies and in the supernatant of pathogenic leptospire were evaluated by bioinformatics for their subcellular location, association with virulence and antigenicity. 6 proteins were considered to be secreted, antigenic and associated with virulence and proceeded to the next stage of to linear B cell epitope prediction and a new antigenicity analysis, resulting in 10 predicted epitopes, in 4 proteins, which were synthesized and experimentally validated by ELISA against a panel of serum samples from 51 patients infected with pathogenic leptospire and 36 uninfected samples. Interestingly, 75% of samples from leptospire-infected patients used in the study reacted to at least 1 predicted epitope. The overall frequency (IgG or IgM) of responders to the peptides ranged from 14% to 35%. Thus, these epitopes were confirmed as immunogenic in individuals with leptospirosis and can be used in studies of new vaccine formulations and for the development of new diagnostic tools.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Agente etiológico	2
1.2.1 Características Gerais	2
1.2.2 Taxonomia	3
1.3 Transmissão da leptospirose	5
1.4 Aspectos clínicos da leptospirose em animais	6
1.5 Aspectos clínicos da leptospirose em seres humanos	6
1.6 Leptospirose no mundo	7
1.7 Leptospirose no Brasil	9
1.8 Diagnóstico	10
1.8.1 Diagnóstico Molecular.....	10
1.8.2 Testes Sorológicos	11
1.9 Tratamento	12
1.10 Vacinas para leptospirose	12
1.11 Proteases como alvos vacinais	13
1.11.1 Termolisinas	14
1.11.2 Esfingomielinases.....	14
1.12 Imunoinformática	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Seleção de antígenos	20
4.2 Triagem de Proteínas	20
4.2.1 Avaliação da localização subcelular	20
4.2.2 Avaliação de antigenicidade.....	21

4.2.3	Análise de associação a virulência	21
4.3	Modelagem comparativa de proteínas selecionadas como candidatos vacinais.	22
4.4	Predição de epítomos alvos de anticorpos	23
4.5	Avaliação de antigenicidade	24
4.6	Análise de Conservação	24
4.7	Síntese de Peptídeos	25
4.8	Amostras de pacientes utilizadas no estudo	25
4.9	Avaliação da resposta humoral específica contra os peptídeos (ELISA)	26
4.10	Análise estatística de resultados	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Seleção de proteínas candidatas ao estudo.....	28
5.2	Escolha de candidatos estudados	30
5.3	Modelagem de proteínas selecionadas	31
5.4	Predição de epítomos.....	32
5.5	Avaliação de antigenicidade dos epítomos.....	33
5.6	Características das amostras de pacientes testadas	34
5.7	Avaliação da imunogenicidade natural dos epítomos preditos	37
5.7.1	Termolisinas	37
5.7.2	Esfingomielinase -Sph2	39
5.8	Proporção de amostras reagentes aos peptídeos	41
5.9	Associação da resposta aos peptídeos e dados clínicos e epidemiológicos.	41
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	51
8	PERSPECTIVAS	52
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de <i>L. interrogans</i> aderidos a uma membrana de filtração de 0,2µm.....	3
Figura 2: Árvore filogenética baseada nas sequências de 1371 genes inferidos como ortólogos.	5
Figura 3: Morbidade anual por leptospirose estimada por país ou território.	8
Figura 4: Comparação esquemática do desenvolvimento vacinal pela abordagem convencional e vacinologia reversa.....	17
Figura 5: Esquema representando a metodologia até a síntese de peptídeos..	25
Figura 6: Análise de localização subcelular, antigenicidade e associação à virulência das proteínas estudadas.....	31
Figura 7: Modelo 3D das proteínas selecionadas.	32
Figura 8: Avaliação da imunogenicidade natural de epítomos preditos em termolisinas de <i>L. interrogans</i>	38
Figura 9: Avaliação da imunogenicidade natural de epítomos preditos em enfiingomielinase -Sph2 de <i>L. interrogans</i>	40
Figura 10: Proporção de indivíduos respondedores a combinações de peptídeos	41
Figura 11: Frequência de hemorragia pulmonar entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítomo.	42
Figura 12: Frequência de Icterícia entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítomo.....	43
Figura 13: Frequência de Insuficiência renal entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítomo.	44
Figura 14: Frequência de Óbito entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítomo.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas descritas no sobrenadante de leptospiras patogênicas.	29
Tabela 2: Avaliação das proteínas quanto ao potencial de secreção e localização subcelular, antigenicidade e associação a virulência.	30
Tabela 3: Epítomos lineares por proteínas selecionadas.	33
Tabela 4: Avaliação de antigenicidade por epítomo linear selecionado.	34
Tabela 5: Resumo de dados clínicos e epidemiológicos das amostras de pacientes testadas.	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LPS	Lipopolissacarídeo
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxiribonucleio
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TLR2	Receptor do tipo Toll 2
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
PMNs	Polimorfonucleares
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
MAT	Teste de Aglutinação Microscópica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IgM	Imunoglobulina M
OMS	Organização Mundial da Saúde
Mg	Miligrama
U	Unidade Internacional
PBS	Salina tamponada com fosfato
IgG	Imunoglobulina G
TMB	Tetrametilbenzidina
HCL	Ácido clorídrico
nm	Nanômetros
I.R.	Índice de Reatividade
D.O.	Densidade Óptica
aa	Aminoácidos

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

No ano de 1881, em Praga, uma doença denominada "*icterus catarrhalis*" foi descrita pelo Dr. Adolf Weil, doença que no futuro seria conhecida como doença de Weil. No período de 1882 a 1886, Dr. Weil, fez a primeira descrição de uma doença observada em duas ocasiões, envolvendo quatro pacientes, em 1870. Os sinais clínicos apresentados por esses pacientes eram semelhantes e particulares. Sintomas que se caracterizavam por icterícia severa, febre e hemorragia com envolvimento renal (Weil, 1886).

Alguns anos depois, em 1907, Stimson, observou pela primeira vez leptospiros em uma secção de tecido renal de um de seus pacientes, cuja causa da morte foi descrita como sendo por febre amarela, através do método de Levatidi, técnica utilizada para observar espiroquetas em secções de tecidos. As espiroquetas estavam confinadas às células e lúmen dos túbulos renais. A partir de suas observações, Stimson relatou que a bactéria apresentava uma forma de ponto de interrogação em suas preparações, sendo assim, a nova bactéria encontrada, foi primeiramente nomeada como *Spirochaeta interrogans* (Stimson, 1907).

Logo depois em 1914 a observação e descrição de leptospiros saprófitas em água fresca foi realizada por Wolbach e Binger, que chamaram o novo achado de *Spirochaeta biflexa* (Wolbach e Binger, 1914).

Em 1915, a síndrome de Weil, foi alvo de estudo no Japão por Dr. Inada e colegas, após intensas pesquisas e observações, o grupo identificou a causa patogênica da doença, denominada *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Após essa descoberta, Dr. Inada injetou intraperitonealmente o sangue de pacientes com a doença de Weil em cobaias, o que permitiu a reprodução dessa infecção (Inada et al., 1916).

No ano de 1923 a leptospirose foi descrita no Brasil, onde Noguchi et al, isolaram a leptospira em um paciente com suspeita de febre amarela no Nordeste (Noguchi et al., 1924). Anos depois, em 1947, o Dr. Helio Gustavo Guida, no Instituto Biológico de São Paulo investigando as leptospiroses animais, possibilitou o levantamento de diferentes espécies como possíveis fontes de infecção, reavaliando

sua importância na patologia humana. Só em 1985 a leptospirose humana é considerada uma doença de notificação compulsória no Brasil (BRASIL, 2014).

1.2 Agente etiológico

1.2.1 Características Gerais

A leptospirose é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, gram-negativas, aeróbicas estritas, catalase positivas; oxidases negativas; quimiorganotróficas, com formato espiralado e alongado, que apresentam aproximadamente 0,1µm de largura e 6 a 20µm de comprimento (Figura 1), por isso é necessário à microscopia de campo escuro ou contraste de fase para visualizá-las, por meio da impregnação com metais (coloração de prata) ou após espessamento artificial por imunoperoxidase ou imunofluorescência (Cerqueira e Picardeau, 2009; Faine et al., 1999; Ko et al., 2009).

As leptospirosas compartilham características de bactérias tanto gram-negativas quanto de gram-positivas, pois possuem membrana dupla e lipolissacarídeo (LPS) como as gram-negativas e têm associação íntima da membrana citoplasmática com a parede celular da mureína como a arquitetura do envelope das gram-positivas (Faine et al., 1999; Levett e Haake, 2010). O LPS das leptospirosas apesar da composição química semelhante ao de outras bactérias gram-negativas, apresenta menor atividade endotóxica quando comparada a outras bactérias como bactérias do gênero *Salmonella* (Dellagostin et al., 2017; Faine et al., 1999; Levett e Haake, 2010; Vincent et al., 2019). Esta molécula, sendo imunogênica e abundante na membrana externa de leptospirosas, é considerada seu principal antígeno imunodominante, contudo induz resposta imune T-independente (Faine et al., 1999; McBride et al., 2005).

Possuem dois flagelos, um em cada extremidade, e se encontram imersos no espaço periplasmático, a rotação desses flagelos induz alterações morfológicas como o formato característico de gancho dessas bactérias, que permitem mobilidade em ambientes aquosos ou com consistência gelatinosa (Wolgemuth et al., 2006). São capazes de utilizar os ácidos graxos de cadeia longa como a única fonte de carbono e energia e não necessitam de aminoácidos para o crescimento. Além disso, tem crescimento lento, com temperatura ótima de crescimento de 30° C e são

capazes de sobreviver no solo e na água por longos períodos, mas não suportam a seca ou hipertonicidade (Faine et al., 1999; Henry e Johnson, 1978; Ko et al., 2009; Levett e Haake, 2010).

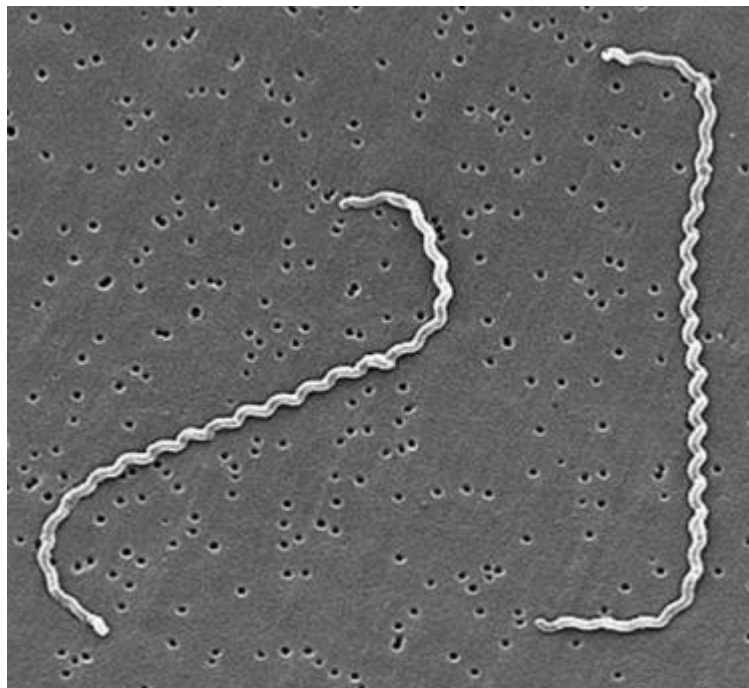


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de *L. interrogans* aderidos a uma membrana de filtração de 0,2µm. (Levett 2015)

1.2.2 Taxonomia

O gênero *Leptospira* é um dos gêneros da família *Leptospiraceae* da ordem *Spirochaetales*. A comparação das sequências de RNA ribossomais aliada aos estudos fenotípicos, confirmou que o gênero *Leptospira* constitui um grupo distinto dentro da ordem *Spirochaetales*. A família *Leptospiraceae* foi descrita pela primeira vez em 1979 incluindo os gêneros *Leptospira* e *Leptonema* (Hovind-Hougen, 1979). Atualmente a família inclui três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turnerella* (Levett, 2015). O gênero *Leptospira* foi inicialmente subdividida em dois grupos: *Leptospira interrogans* sensu lato que agrupou cepas patogênicas e *Leptospira biflexa* sensu lato que agrupou cepas saprófitas. Eles também foram diferenciados em características fenotípicas, como a capacidade de *L. biflexa* crescer a 13 °C na

presença de 8-azaguanina (225 µg/ml), em contraste com cepas patogênicas (Johnson e Rogers, 1964).

As leptospiros podem ser classificadas tanto por métodos fenotípicos (convencionais) quanto por genotípicos (Ahmed et al., 2011). O sistema convencional é baseado em critérios sorológicos nos quais as cepas de leptospiros são diferenciadas em sorovares. O sorovar é a unidade taxonômica básica utilizada para a classificação de leptospiros, que corresponde a um grupo de leptospiros com reatividade a anticorpos semelhante, com base nos carboidratos de membrana (do LPS). Já o sorogrupo é o conjunto de sorovares que possuem carboidratos em comum, portanto podem apresentar reatividade cruzada. Porém, a identificação desse gênero bacteriano é bastante dificultada quando se observa que sorovares pertencentes ao mesmo sorogrupo encontram-se distribuídos entre diferentes espécies (Adler e Moctezuma, 2010).

De acordo com Faine et al. (1999), as espécies e sorovares de leptospiros patogênicas são adaptadas a um determinado hospedeiro ou a um número pequeno de hospedeiros. Contudo, é comum que leptospiros adaptadas aos seus hospedeiros definitivos também sejam capazes de infectar outros hospedeiros (Faine et al., 1999).

No entanto, o gênero agora também é dividido por diferenciação molecular entre os diversos sorovares, baseado na classificação das espécies por homologia de DNA e, dentro de cada espécie, os sorovares são reconhecidos e agrupados com base, em suas reatividades cruzadas em reações sorológicas. Os sorovares com antígenos em comum pertencem ao mesmo sorogrupo (Adler e Moctezuma, 2010; Cerqueira e Picardeau, 2009; Levett e Haake, 2010; Palaniappan et al., 2006).

Atualmente o gênero *Leptospira* é dividido em 66 espécies, das quais 17 são agrupadas no subclado de espécies patogênicas (P1) e mais 2 espécies classificadas como provavelmente do subclado P1, 21 espécies de patogenicidade intermediária (P2) e 26 espécies nos subclados saprófitas (S1 e S2), conforme ilustrado na Figura 2. Paralelamente, em função de sua complexidade antigênica, as leptospiros são classificadas em 300 sorovares, agrupados por conveniência em 24 sorogrupos antigenicamente relacionados (Caimia e Ruybalb, 2020).

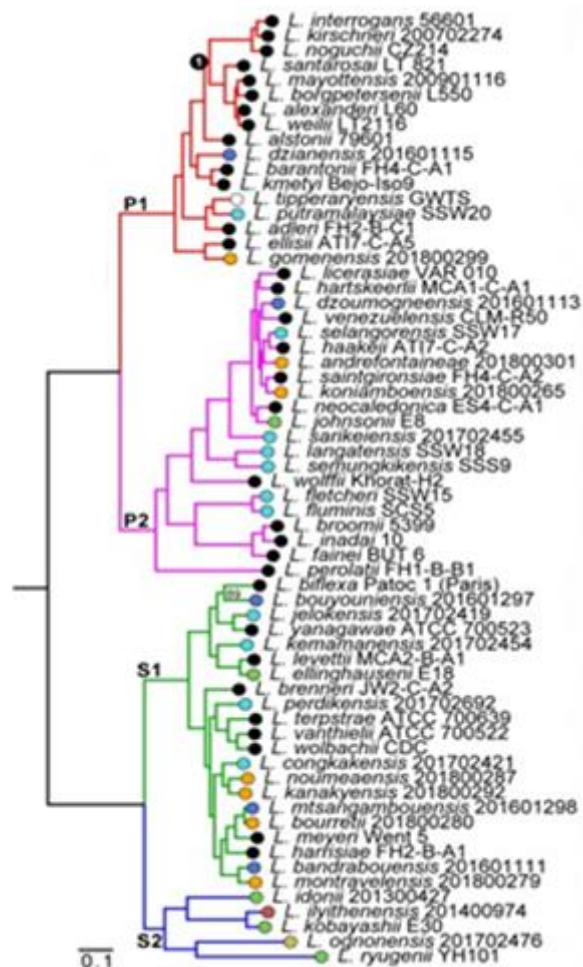


Figura 2: Árvore filogenética baseada nas sequências de 1371 genes inferidos como ortólogos. (Vincent et al. 2019)

1.3 Transmissão da leptospirose

A transmissão das leptospirosas acontece pelo contato direto com animais reservatórios ou indireto com água ou solo contaminados pela urina de animais infectados, através da penetração das bactérias pela mucosa intacta ou pele lesada (Adler e Moctezuma, 2010; Levett e Haake, 2010; Reis et al., 2008). Embora virtualmente todos os mamíferos e muitos répteis possam atuar como reservatório da doença, roedores, morcegos, porcos, gado, cães e cavalos são as fontes de infecção mais comuns para o homem, que é hospedeiro acidental e terminal dentro da cadeia de transmissão, uma vez que a transmissão de pessoa para pessoa é rara (Budihal e Perwez, 2014; Costa et al., 2015; Picardeau, 2013).

1.4 Aspectos clínicos da leptospirose em animais

A maioria dos mamíferos podem atuar como reservatório e dispersar a doença sem muitas complicações clínicas, porém, em animais de criação, como gado, a infecção pode induzir abortos, infertilidade, natimortos, redução na produção de leite e até a morte (*Budihal e Perwez, 2014; Picardeau, 2013*).

1.5 Aspectos clínicos da leptospirose em seres humanos

O período de incubação da doença varia de 1 a 30 dias, sendo mais frequente entre 5 e 14 dias (*BRASIL, 2014*). Em humanos as manifestações clínicas são variáveis e a gravidade depende de fatores como o sorotipo de *Leptospira* infectante, idade, condições de saúde e sistema imunológico do portador (*Adler e Moctezuma, 2010*).

Na maioria dos casos o quadro é assintomático ou brando, com sintomas diversos e inespecíficos, tais como febre leve, calafrios, quadros semelhantes à gripe, dor de cabeça, dores musculares, vômitos e diarreia, que dificultam o diagnóstico clínico da doença (*BRASIL, 2014*). É importante notar a existência de alguns sinais e sintomas que podem ajudar a diferenciar a fase precoce da leptospirose de outras causas de doenças febris agudas. Sufusão conjuntival é um achado característico da leptospirose e é observado em cerca de 30% dos pacientes (*BRASIL, 2014*). Esse sinal aparece no final da fase precoce da doença e é caracterizado por hiperemia e edema da conjuntiva ao longo das fissuras palpebrais. Geralmente, a leptospirose é associada à intensa mialgia, principalmente nas panturrilhas (*BRASIL, 2014*). Entretanto, nenhum desses sinais clínicos da fase precoce da doença é suficientemente sensível ou específico na diferenciação da leptospirose de outras causas de febre aguda. Por essas razões, é importante obter dos casos suspeitos uma história sobre exposição epidemiológica de risco que possa auxiliar o diagnóstico clínico da leptospirose. Uma história de exposição direta ou indireta a coleções hídricas (incluindo água e lama de enchentes), urina de animais infectados ou outros materiais passíveis de contaminação, além de pacientes provindos de área de risco da doença, podem alertar o clínico para a suspeita de leptospirose (*BRASIL, 2014*).

No quadro grave da doença, representado pela leptospirose icterica, o curso clínico é rapidamente progressivo. As complicações graves da leptospirose

apresentam caráter multisistêmico, e estão associadas com a localização de leptospiros dentro dos tecidos durante a fase imune, que ocorre geralmente durante a 2ª semana da doença (BRASIL, 2014). Cerca de 15% dos indivíduos acometidos evoluem para a forma grave da doença, que pode ter a presença de um conjunto de sintomas conhecidos como síndrome de Weil (Haake e Levett, 2015) que se caracteriza por complicações de múltiplos órgãos, incluindo insuficiência renal e hepática aguda, colapso cardiovascular, icterícia, meningite, pneumonite e hemorragia pulmonar (Daher et al., 2011; Evangelista e Coburn, 2010; Faine, 1970; Vale et al., 2014), com letalidade de 10% a 50%, especialmente nos casos de síndrome de hemorragia pulmonar (BRASIL, 2014).

Em humanos, a leptospirose grave é frequentemente causada pelos sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, embora outros sorovares também estejam envolvidos. O sorovar específico envolvido na infecção depende largamente da localização geográfica e da ecologia local dos hospedeiros de manutenção (Levett, 2001).

1.6 Leptospirose no mundo

Estima-se que a leptospirose seja a zoonose mais disseminada no mundo, acometendo anualmente mais de 1 milhão de pessoas, e levando a morte cerca de 60 mil pessoas por ano (Figura 3) (Costa et al., 2015).

Encontrada em todos os continentes, exceto a Antártica, a leptospirose é considerada um grave problema para saúde pública e animal, especialmente em países em desenvolvimento, onde condições climáticas e ambientais somadas a falta de saneamento são favoráveis a sobrevivência e transmissão do patógeno (Hartskeerl et al., 2011), causando grande impacto econômico na indústria agropecuária, pois afeta animais de criação, induzindo abortos, infertilidade, natimortos, redução na produção de leite e morte (Bharti et al., 2003; Levett, 2001). Entretanto, a doença também representa um importante problema de saúde urbana em países desenvolvidos e industrializados, ocorrendo em áreas com condições inadequadas de saneamento durante períodos de chuva e inundações sazonais (Socolovschi et al., 2011), além de estar associada a desastres naturais, com grandes surtos após furacões, tufões e inundações em regiões tropicais (Koizumi et al., 2009).

Além disso, surtos de leptospirose foram relatados em alguns países após competições esportivas e atividades recreativas associadas ao contato com a água, incluindo trekking na selva, natação, triatlão, caiaque, vela e escalada. Casos como esses ocorreram em países como, Malásia (*Sejvar et al.*, 2003), Estados Unidos (*Morgan et al.*, 2002), Filipinas (*Teichmann et al.*, 2001), entre outros (*Coursin et al.*, 2000). Um estudo retrospectivo na França de 1995 a 2005 indicou que 42% dos pacientes com leptospirose nesse período, foram infectados após uma atividade de esporte aquático e 19% através do contato com águas paradas (*Abgueguen et al.*, 2008).

Já foi relatado que sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*, que têm como seu hospedeiro portador o rato, são usualmente responsáveis por infecções na Europa, enquanto o sorovar *Lai* é o responsável predominante no sudeste da Ásia. A variabilidade das manifestações pode ser explicada em parte pela virulência intrínseca dos diferentes sorovares (*Faine et al.*, 1999; *Nascimento et al.*, 2004; *Vinetz*, 2001).

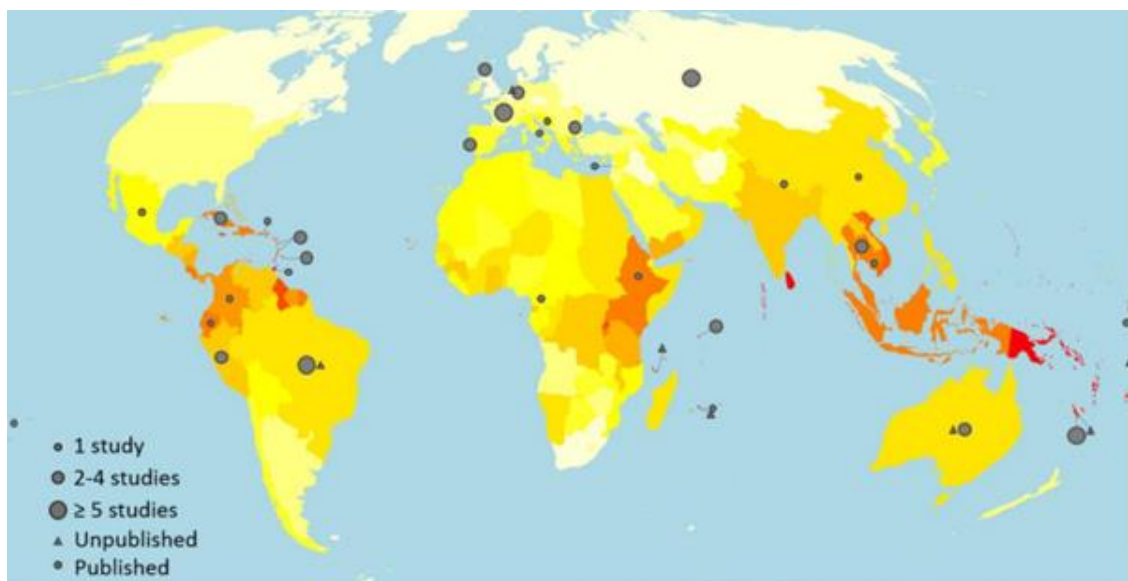


Figura 3: Morbidade anual por leptospirose estimada por país ou território.

A incidência anual da doença é representada por um exponencial de cor gradiente do branco (0-3), amarelo (7-10), laranja (20-25) até o vermelho (acima de 100), em casos por 100,000 habitantes. Círculos e triângulos cinza indicam os países de origem de publicações e literatura com estudos de qualidade garantida (Costa et al. 2015).

1.7 Leptospirose no Brasil

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, reportada em todos os meses do ano, e considerada epidêmica em períodos de chuva, principalmente em capitais e regiões metropolitanas, com maior incidência nas regiões Sul e Sudeste (*BRASIL, 2014*). Anualmente, são confirmados mais de 3.700 casos no país, dos quais cerca de 75% evoluem para hospitalizações e resultam em uma letalidade de 8,7%, sendo homens em idade produtiva, de 20 a 49 anos, o grupo mais afetado (*BRASIL, 2021*). Embora este cenário já caracterize a leptospirose como um importante problema de saúde pública no Brasil, sua sintomatologia inespecífica aliada a falta de suspeitas clínicas quando o contato dos pacientes com enchentes e/ou roedores não é reportado, sugerem que o número de casos possa ser subestimado. Esta hipótese foi recentemente corroborada pelo trabalho de Davila e colaboradores, que demonstrou, entre janeiro e fevereiro de 2019, que cerca de 32% dos pacientes peruanos com suspeita clínica de arbovirose, não confirmadas laboratorialmente, apresentavam resultados positivos para leptospirose através do teste de aglutinação microscópica (MAT) realizado pelo Instituto Nacional de Saúde (*Davila et al., 2019*). Considerando que no Brasil, desde o início de janeiro até junho deste ano, foram registrados 1.172.882 casos prováveis de dengue (*BRASIL, 2022*), e considerando a possibilidade de casos de leptospirose mesmo quando contato com roedores ou enchentes não é reportado, o diagnóstico diferencial entre as doenças, aliado ao início precoce do tratamento do paciente são essenciais para o bom prognóstico.

Somado ao grave risco para saúde pública, o virtual impacto da doença sobre a produtividade animal e saúde dos profissionais vinculados à pecuária tornam a leptospirose um potencial problema social e econômico no país, especialmente se considerarmos o fato do Brasil possuir o maior rebanho comercial do mundo, ser o maior exportador de carne bovina, o segundo maior produtor de carne e o sexto maior produtor de leite do mundo (*MAPA, 2016*). Contudo, mesmo diante de toda importância epidemiológica, social e econômica que os casos de leptospirose representam, ainda não existem vacinas que gerem longa proteção em humanos, e as ferramentas para monitoramento animal e metodologias para diagnóstico estão longe do ideal.

1.8 Diagnóstico

As metodologias aplicadas ao diagnóstico da leptospirose estão associadas ao estágio da doença, que é, didaticamente, dividida em duas fases evolutivas: a fase precoce (leptospirêmica) e a fase tardia (imune) (BRASIL, 2014; 2022). Durante a fase precoce da doença, a leptospirose não pode ser diferenciada clinicamente de outras doenças febris agudas (BRASIL, 2014), sendo a notificação de casos suspeitos geralmente associadas a história recente de exposição a situações de risco do paciente e sua confirmação por meio da detecção do DNA do microrganismo pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BRASIL, 2022). Paralelamente, as tentativas de cultura do organismo têm uma taxa de sucesso extremamente baixa, nesta fase, impossibilitando o uso deste método para o diagnóstico individual (BRASIL, 2014).

Na fase tardia, em virtude das dificuldades inerentes à realização dos exames de cultura, os métodos sorológicos são prioritariamente escolhidos para o diagnóstico da leptospirose. Dentre estes, os mais utilizados são o ensaio imunoenzimático (ELISA-IgM) e o teste de microaglutinação (MAT), sendo este último a metodologia considerada padrão ouro, para o diagnóstico de infecção por *Leptospira*, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2014).

1.8.1 Diagnóstico Molecular

1.8.1.1 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Um dos métodos de diagnóstico disponíveis para leptospirose é o uso de testes moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), que visam identificar microrganismos em amostras clínicas através da presença do DNA. A PCR não dá nenhuma informação sobre sorovar infectante (BRASIL, 2014).

A OMS recomenda a confirmação pelo MAT de todos os soros que derem resultados de PCR-positivo. A utilização da PCR é muito importante na ocorrência de óbitos precoces que impedem a coleta de uma segunda amostra, também para o diagnóstico precoce da doença para orientar o manejo clínico, condicionado à confirmação do caso por MAT no período imunogênico. É um método que deve ser

usado de forma complementar e não substitutiva na fase correta da doença (BRASIL, 2014).

1.8.2 Testes Sorológicos

1.8.2.1 ELISA IgM

O ELISA-IgM foi desenvolvido usando uma grande variedade de preparações de antígenos, desde extrato de leptospiros, a proteínas recombinantes, como LipL32, LigA e OmpL1 (Adler e Moctezuma, 2010). Além disso, o ELISA é um teste de fácil execução e permite detectar anticorpos mais precocemente que o MAT (Adler et al., 1980). Apesar do ELISA IgM às vezes tornar-se positivo um pouco mais cedo do que o MAT, pode haver resultados tanto falsos positivos, como falsos negativos, não dando nenhuma indicação do sorotipo infectante, ou dados epidemiológicos potencialmente importantes, por isso não são tão confiáveis, e não se deve considerar isoladamente, os resultados do teste de ELISA (BRASIL, 2014).

1.8.2.2 Teste de aglutinação microscópica

O MAT baseia-se na identificação por microscopia de campo escuro da aglutinação do soro do paciente com antígenos de leptospira. Após a incubação, a mistura soro-antígeno é examinada microscopicamente para observação de aglutinação. Uma reação é considerada positiva quando menos de 50% das leptospiros estão livres, em comparação a um controle apenas com antígenos vivos. Considera-se caso confirmado pelo MAT, aquele que apresenta soroconversão, ou uma variação sorológica nos títulos de anticorpos de quatro vezes ou mais. Quando não houver disponibilidade de duas ou mais amostras, um título maior ou igual a 800 no MAT confirma o diagnóstico (BRASIL, 2014).

O provável sorogrupo infectante é o que apresenta maior título, se mais de um sorogrupo apresentar o maior título o resultado é considerado como reação mista e o provável sorogrupo infectante não é determinado. Outra vantagem deste teste é a capacidade de presumir o sorogrupo envolvido na infecção a partir do sorogrupo que sofreu máxima aglutinação com o soro testado. Vários estudos avaliaram a capacidade da técnica em prever o sorovar, no entanto sem sucesso (Katz et al., 2003).

Uma das limitações do teste é a necessidade de ser realizada em laboratórios de referência com pessoal bem treinado e disponibilidade de um painel de leptospirosas vivas que promovam uma cobertura adequada da diversidade antigênica de leptospirosas existentes no local presumível de ocorrência da infecção. Por isso, é recomendável, que o painel de cepas utilizadas no teste inclua leptospirosas de cada um dos 24 sorogrupos de leptospirosas, além de isolados do local onde o teste está sendo. A principal dificuldade no desempenho do MAT é a necessidade de amostras pareadas (uma amostra coletada na fase aguda e outra coletada >14 dias após a coleta da primeira) (WHO., 2003).

1.9 Tratamento

O tratamento da leptospirose depende da severidade da doença. Para a doença leve utiliza-se Doxiciclina oral, uma dose de 100 mg duas vezes ao dia por 7 dias (McClain *et al.*, 1984), enquanto para a doença grave o tratamento é com Penicilina G intravenosa, uma dose de 1,5 milhão de U a cada 6h por 7 dias (Watt *et al.*, 1988). Além disso como terapia de suporte inclui, no caso insuficiência renal, a hemodiálise, e a ventilação mecânica no caso da ocorrência de manifestações de hemorragia pulmonar. Em casos de indivíduos que vão viajar para áreas onde a leptospirose é endêmica e para indivíduos com alto risco de exposição, como veterinários e atletas de esportes aquáticos realiza-se a profilaxia antibiótica com doxiciclina oral, uma dose de 200 mg por semana durante o tempo de exposição (Gonzalez *et al.*, 1998; Takafuji *et al.*, 1984). No entanto, deve considerar que a administração de doxiciclina não previne a infecção; só diminui o desenvolvimento de manifestações clínicas graves (Sehgal *et al.*, 2000).

1.10 Vacinas para leptospirose

Até o momento, a principal estratégia vacinal contra leptospirose se baseia em leptospirosas inativadas, também chamadas de bacterinas, as quais são as únicas vacinas comercialmente disponíveis, principalmente para uso veterinário (Faine *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 2019).

Tal abordagem tem como desvantagens a indução de imunidade de curta duração e a incapacidade de reconhecer todas as leptospiras capazes de infectar o homem, além de efeitos colaterais relatados em humanos, quando o uso de formulações vacinais deste tipo foi indicado em locais de alto risco (Xu e Ye, 2018).

Dentre os fatores relacionados a inexistência de vacinas eficazes contra leptospirose em humanos, podemos citar a ampla diversidade de espécies capazes de causar doença em humanos, e a complexidade antigênica do gênero, aliada ao vasto repertório de proteínas e proteases bacterianas. Paralelamente, com relação a complexidade antigênica, as leptospiras apresentam o lipopolissacarídeo (LPS) como principal antígeno imunodominante, molécula de composição similar ao LPS de bactérias Gram-negativas, mas que apresenta baixa atividade endotóxica (Dellagostin et al., 2017; Faine et al., 1999; Levett e Haake, 2010; Vincent et al., 2019). Em contexto vacinal, embora o LPS seja imunogênico e abundante na membrana externa de leptospiras, induz resposta imune T-independente, o que explica a não geração de memória imunológica de longa duração pelas bacterinas (McBride et al., 2005). Além disso, a elevada heterogenicidade da molécula de LPS dentre as leptospiras, leva à descrição de cerca de 300 sorovares diferentes, agrupados por conveniência em 24 sorogrupos antigenicamente relacionados de bactérias, o que ajuda a explicar a dificuldade do uso de vacinas desse tipo para proteger contra o amplo espectro de leptospiras patogênicas em humanos. Portanto, a identificação de alvos mais específicos e que induzam uma resposta duradoura seria ideal.

1.11 Proteases como alvos vacinais

Apesar do crescente número de estudos buscando candidatos vacinais e novas formulações contra leptospiras patogênicas, ainda não existem vacinas eficazes contra leptospirose para humanos, capaz de induzir proteção duradoura e reagir contra toda a diversidade de sorovares presente dentro do gênero *Leptospira*. Portanto a identificação de novos alvos vacinais e a avaliação de seus papéis na proteção contra leptospirose humana são essenciais ao desenvolvimento de vacinas.

Nesse contexto, leptospiras patogênicas exibem um conjunto de proteínas que atuam na evasão da bactéria do sistema imune inato do hospedeiro, primeira e essencial linha de defesa do organismo para eliminação de leptospiras, enquanto

espécies saprófitas de leptospiros, são rapidamente eliminadas pelo sistema imune inato, quando incubadas com soro humano normal. Nesse sentido, diversas proteínas secretadas por leptospiros patogênicos parecem fundamentais para o sucesso da disseminação pelo organismo e o estabelecimento da infecção, uma vez que exercem importantes papéis na patogênese, participando do dano tecidual, aquisição de nutrientes e evasão do sistema imune (*Barbosa et al.*, 2009; *Meri et al.*, 2005). Dentre estas, destacamos grupos de proteínas presentes somente em leptospiros patogênicos que conferem esses mecanismos de escape do sistema imune inato, destacando os grupos de termolisinas e esfingomielinases.

1.11.1 Termolisinas

As termolisinas são proteínas presentes em espécies patogênicas de leptospiros e são também produzidas por diversos microrganismos, como bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* e *Bacillus* (*Chung et al.*, 2006; *Miyoshi*, 2013). Essas proteínas fazem parte da classe de proteases, uma importante classe que está envolvida com fatores de virulência, dessa forma, essas proteases tem um importante potencial de agir em auxílio da evasão do sistema imune, nutrição e reprodução do patógeno (*Armstrong*, 2006).

Termolisinas são descritas na literatura por seu envolvimento com a degradação de substratos do hospedeiro, como moléculas do plasma e da matriz extracelular, que se relaciona com o aumento da destruição tecidual, além de exibir atividade proteolítica agindo principalmente contra proteínas do sistema complemento humano, dessa forma, modulando as defesas do hospedeiro (*Barbosa et al.*, 2009; *Jin et al.*, 1996; *Meri et al.*, 2005), culminando na contribuição para a disseminação do patógeno, a partir disso, podem ser considerados como alvos para intervenções terapêuticas (*Chung et al.*, 2006; *Miyoshi*, 2013).

1.11.2 Esfingomielinases

As esfingomielinases são enzimas capazes de hidrolisar esfingomielinas a ceramida e fosforilcolina. Com isso, podem criar poros em células e romper membranas, inclusive de células sanguíneas, estando por essa razão envolvidas com as complicações hemorrágicas que ocorrem na Síndrome de Weil, forma grave da leptospirose. Das suas 5 formas, Sph1, Sph2, Sph3, Sph4 e SphH, as esfingomielinases Sph2 e a SphH possuem propriedades citotóxicas comprovadas (*Kasarov*, 1970; *Narayanavari et al.*, 2015).

As leptospiros, assim como outras bactérias, utilizam o ferro para desenvolvimento e multiplicação, sendo ele um elemento indispensável (Carvalho, 2008). Como o ferro pode representar um fator limitante no crescimento de várias bactérias patogênicas, é plausível que essas toxinas desempenhem um papel na persistência da infecção (Faine, 1959; Louvel et al., 2006). Contudo, no organismo do hospedeiro, este metal geralmente não é encontrado de forma livre, mas complexado ao grupo heme, que é liberado quando há hemólise. Dessa forma, a carência de ferro, induz a expressão de esfingomielinases, o que representa uma grande vantagem para a sobrevivência bacteriana e demonstra a importância das hemolisinas na obtenção de ferro (Carvalho, 2008).

Entre os tipos de esfingomielinase expressas por *Leptospira*, a Sph2 foi identificada como dependente de magnésio e capaz de realizar atividade de esfingomielinase e forte atividade hemolítica, podendo ela estar relacionada com o processo de invasão por comprometer a integridade de células do hospedeiro (Che et al., 2019; Narayanavari et al., 2015), além disso, a esfingomielinase Sph2 foi capaz de danificar linfócitos e macrófago, o que pode ajudar as leptospira a evadir do sistema imunológico do hospedeiro (Zhang et al., 2008). Em estudos conduzidos, cepas mutantes incapazes de expressar esfingomielinases demonstraram baixa capacidade de causar infecção, fato que se alia à ausência destas enzimas em cepas saprófitas (Narayanavari et al., 2012). Outro fato que contribui para a relação entre esfingomielinases e fatores de virulência é a expressão da Sph2, que pode ser induzida por fatores do hospedeiro. A diferença de osmolaridade e temperatura entre o ambiente e o organismo do hospedeiro provocam sua regulação ascendente, uma vez que a Sph2 não é detectada em bactérias cultivadas em meio com características semelhantes aos do ambiente (Matsunaga et al., 2007).

Nesse contexto, essas proteases representam uma interessante alternativa para compor formulações vacinais e para reativos diagnósticos, sendo importantes para evasão do sistema imune. Contudo as leptospiros exibem um vasto repertório de proteínas, o que dificulta a sua exploração por métodos tradicionais. Assim, imunoinformática surge como uma estratégia promissora para avaliação de dados genômicos e subsequente seleção de antígenos candidatos vacinais e para o desenvolvimento de novos reativos diagnósticos.

1.12 Imunoinformática

A imunoinformática permite a identificação de alvos que podem ser posteriormente utilizados em estratégias vacinais ou para fins diagnósticos na leptospirose. As diferentes ferramentas da imunoinformática permitem a exploração de dados do genoma, transcriptoma, proteômica ou secretômica (*Rappuoli et al.*, 2016). A utilização de algoritmos de imunoinformática para a análise de proteínas e predição de epítomos diminui tempo e custos de pesquisa, uma vez que propõe um resultado parcial a ser confirmado com a validação através de ensaios imunoenzimáticos. Este processo de combinação das ferramentas de imunoinformática e de técnicas imunológicas convencionais, é caracterizado como vacinologia reversa.

O sucesso do desenvolvimento do 4CMenB (Bexsero®, GSK) mostra a viabilidade do uso da vacinologia reversa, a qual foi a primeira vacina humana comercialmente disponível aprovada com base nesta abordagem (*Rappuoli et al.*, 2018; *Serruto et al.*, 2012).

Com base nesse racional, acreditamos que a imunoinformática seja uma estratégia promissora para selecionar antígenos, identificar seus principais alvos de anticorpos e resposta celular e assim, permitir o desenvolvimento de novas formulações vacinais e métodos diagnósticos para leptospirose humana. Contudo, a ampla diversidade de antígenos aliada ao ainda escasso uso destas abordagens no estudo da leptospirose, evidenciam uma importante lacuna no conhecimento. Neste sentido, com base em suas importantes participações na evasão do sistema imune do hospedeiro, proteases secretadas por leptospirosas patogênicas (*Barbosa et al.*, 2009; *Da Silva et al.*, 2018) surgem como interessante promissores candidatos a serem explorados na busca por antígenos vacinais protetores contra leptospirose humana. Nesse sentido, embora seu uso para estudo de leptospirose ainda seja incipiente, a imunoinformática pode ser considerada uma estratégia de vanguarda para impulsionar e acelerar seleção de antígenos candidatos vacinais e para o desenvolvimento de novos reativos diagnósticos.

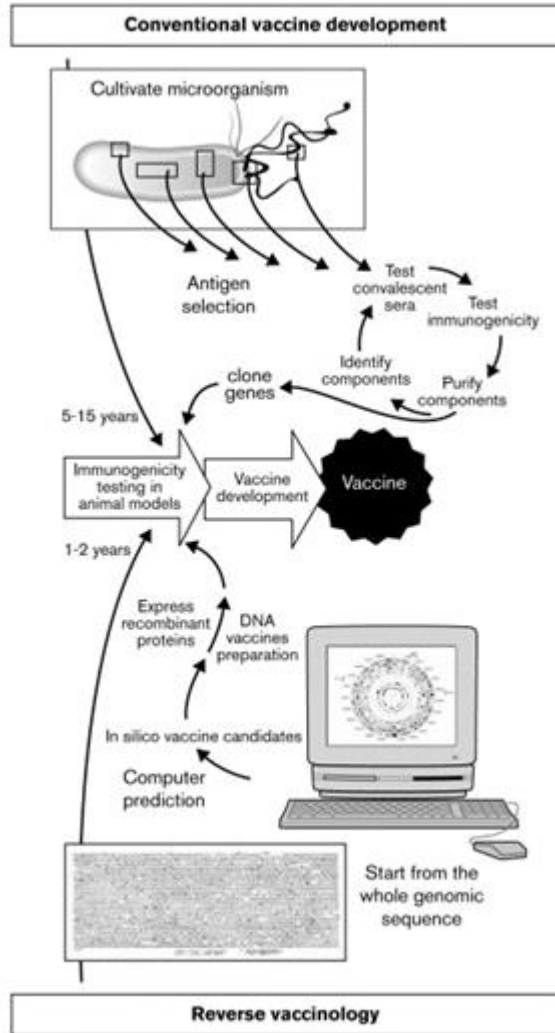


Figura 4: Comparação esquemática do desenvolvimento vacinal pela abordagem convencional e vacinologia reversa. (Rappuoli, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da importância epidemiológica e do potencial impacto social e econômico que a leptospirose representa para saúde pública, ainda não existem vacinas protetoras capazes de compreender a vasta gama de espécies patogênicas ao homem. Somado a isso, o lento crescimento das leptospirosas em meio de cultura, sua alta complexidade antigênica e taxonômica, bem como a falta de suspeita clínica em muitos casos e de poucas ferramentas para o monitoramento animal, reforçam a necessidade do desenvolvimento de novos reativos diagnósticos.

Nesse contexto, a identificação de epítomos reconhecidos por células B, específicos do subclado P1 de *Leptospira*, pode representar uma importante contribuição no campo das pesquisas em vacinas e diagnóstico desta doença. Para tanto, nosso estudo propõe a utilização de ferramentas de bioinformática e biologia computacional, para identificar *in silico*, epítomos em proteínas secretadas de *Leptospira*, aliada a confirmação experimental destes epítomos frente a amostras de pacientes. Deste modo, acreditamos que este estudo possa identificar alvos que poderão ser empregados no desenvolvimento de novos reativos diagnósticos e/ou formulações vacinais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar epítomos alvos de anticorpos, conservados entre espécies patogênicas de *Leptospira*.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar proteínas descritas no sobrenadante de cultura e estudos de secretômica de leptospiros patogênicos;
- Avaliar as proteínas listadas quanto a sua localização sub-celular, antigenicidade e associação à virulência da bactéria;
- Selecionar como antígenos candidatos, proteínas consideradas secretadas, antigênicas e associadas a virulências de leptospiros patogênicos;
- Identificar *in silico* epítomos lineares potencialmente reconhecidos por linfócitos B na(s) proteína(s) selecionada(s);
- Avaliar o grau de conservação dos epítomos preditos, comparando-os as demais espécies patogênicas de *Leptospira* e outros organismos;
- Validar as sequências identificadas como específicas de *Leptospira* como epítomos imunogênicos, frente a reatividade com amostras de pacientes;
- Investigar associações entre a resposta imune específica aos epítomos identificados e dados clínicos e epidemiológicos de pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de antígenos

Utilizando a ferramenta de busca PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) que é uma ferramenta de busca de livre acesso à base de dados MEDLINE de citações e artigos de investigação em biomedicina e ciências da vida, realizamos a busca de proteínas presentes no sobrenadante de leptospiros patogênicas, com os termos “*Leptospira*, antigenic proteins, secretome, secreted proteins”. No caso de inclusão de artigo(s) publicado(s), manuscrito(s) aceito(s) ou submetidos para publicação. Todas as proteínas descritas no sobrenadante e/ou estudos de secretômica de leptospiros foram listadas e suas sequências FASTA de aminoácidos obtidas a partir do banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), que é uma base de dados acessível gratuitamente, de alta qualidade e completa de informação de sequências de proteínas e as suas funções.

4.2 Triagem de Proteínas

Após a obtenção das sequências primárias, todas as proteínas listadas foram analisadas quanto a: (a) localização subcelular; (b) antigenicidade e (c) associação à virulência. Por fim, proteínas consideradas secretadas, antigênicas e associadas à virulência, foram selecionadas para sequência do estudo.

4.2.1 Avaliação da localização subcelular

Todas as proteínas foram submetidas a avaliação das proteínas quanto ao seu potencial de secreção e localização subcelular. Para esta avaliação foram utilizados 7 algoritmos de imunoinformática: Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), Psort (<https://www.psort.org/psortb/>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), PSLpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/pslpred/submit.html>), Secretome 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) e Prediction Protein (<https://www.predictprotein.org/home>). Foram consideradas proteínas secretadas,

aquelas que foram preditas como secretadas por no mínimo 4 dos 7 algoritmos utilizados.

O algoritmo **Signal P** avalia a presença de sequências sinais na região N terminal da proteína para as principais vias secretórias. Seguido do TMHMM que avalia com base na sequência FASTA, se a proteína em questão possui hélices transmembrana. Proteínas secretadas não podem possuir tais hélices, ou ficariam aderidas a membrana. **Psort** é um algoritmo de predição que já combina as duas ideias anteriores. Avalia existência de peptídeo sinal e de regiões transmembrana. Tal como o anterior, o **Phobius** também avalia simultaneamente a existência de peptídeo sinal e região transmembrana, definindo então com base nisso a localização da proteína em questão. **PSLpred** compara a sequência a um banco de dados relacionando-a a localização celular de estruturas similares. O algoritmo **Secretome 2.0** é um método desenvolvido para reconhecer proteínas secretadas por vias não clássicas de secreção. Basicamente, útil para verificar proteínas que não tem peptídeo sinal, mas podem ser secretadas. Finalizando com o **Prediction protein** que é uma ferramenta de predição bastante completa que avalia um conjunto de informações sobre cada proteína. Avalia Blast da sequência, comparando-a com outras sequências similares, avalia predição de hélice transmembrana, estrutura secundária, sítio de ligação, localização subcelular, entre outras, e a provável sublocalização, baseado nessas comparações.

4.2.2 Avaliação de antigenicidade

As mesmas proteínas foram avaliadas quanto ao potencial antigênico, através da ferramenta VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). THRESHOLD de 0,4. O VaxiJen é uma ferramenta de predição de antígenos protetores e vacinas de subunidade, é o primeiro servidor para predição independente de alinhamento de antígenos potencialmente protetores. Ele foi desenvolvido para permitir a classificação de antígenos apenas com base nas propriedades físico-químicas das proteínas sem recorrer ao alinhamento de sequências.

4.2.3 Análise de associação a virulência

Após a avaliação de antigenicidade, as proteínas foram avaliadas quanto a possível associação à virulência, através da ferramenta VirulenPred

(<http://bioinfo.icgeb.res.in/virulent/>). THRESHOLD de 0. O VirulentPred é um método baseado em Support Vector Machine (SVM) para prever sequências virulentas de proteínas. Support Vector Machine é um conceito na ciência da computação para um conjunto de métodos de aprendizado supervisionado que analisam os dados e reconhecem padrões, os classificadores SVM da primeira camada do VirulentPred foram treinados e otimizados com diferentes características de sequência de proteínas individuais, como composição de aminoácidos, composição de dipeptídeos, composição de dipeptídeos de ordem superior e relações evolutivas remotas.

4.3 Modelagem comparativa de proteínas selecionadas como candidatos vacinais.

A modelagem comparativa determina a estrutura terciária das proteínas e é necessária para avaliar a possível oligomerização. E para usar mais um algoritmo de predição de epítomos lineares (Ellipro). As estruturas 3D das proteínas estudadas foram modeladas usando o servidor Robetta (<http://new.rosetta.org/>). Este servidor é continuamente avaliado por meio de Avaliação de Modelo Automático Contínuo (CAMEO) e seu principal serviço é prever a estrutura 3D de uma proteína dada a sequência de aminoácidos. Os servidores Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>) e Verify3D (<https://www.doe-mpi.ucla.edu/verify3d/>) servem para avaliar os modelos gerados e selecionar o melhor. O Molprobitry avalia a confiabilidade dos modelos atômicos tridimensionais enquanto o Verify 3D determina a compatibilidade de um modelo atômico (3D) com sua própria sequência de aminoácidos (1D) atribuindo uma classe estrutural com base em sua localização e ambiente (alfa, beta, loop, polar, apolar entre outras) e comparando os resultados com boas estruturas. O Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) é um servidor web de bioinformática estrutural dedicado à modelagem homológica de estruturas de proteínas 3D e foi utilizado para visualizar a ocorrência de estruturas similares, e se formam ou não oligômeros.

4.4 Predição de epítomos alvos de anticorpos

As mesmas proteínas da análise anterior seguiram para a etapa de predição de epítomos lineares alvos de anticorpos, onde foram usados outros 7 algoritmos de imunoinformática:

Bepipred (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) um servidor da web utilizado para prever epítomos de células B a partir de sequências de antígeno, é baseado em um algoritmo de random forest regression algoritmo que foi treinado usando uma abordagem de validação cruzada de 5 vezes, cada resíduo foi codificado usando seu volume calculado, hidrofobicidade, polaridade, juntamente com a acessibilidade relativa da superfície e estrutura secundária.

Emini (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) é utilizado para predição de acessibilidade de superfície de hexapeptídeos e valores maiores que 1,0 indicam uma probabilidade aumentada de serem encontrados na superfície.

ABCpred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) é o primeiro servidor desenvolvido com base em rede neural recorrente (machine-based), usando padrões de comprimento fixo, para prever epítomos de células B em uma sequência de antígeno, com 65,93% de precisão.

ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) prevê epítomos de anticorpos lineares e descontínuos com base na estrutura 3D de um antígeno de proteína.

BCePred (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/>) um método para prever epítomos de células B lineares usando um método de aprendizado de máquina SVM (máquinas vetoriais de suporte).

Lptope (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/lptope/help.php>) o servidor discrimina os epítomos de células B lineares e não epítomos para uma determinada sequência de proteína. A precisão geral deste servidor é de ~ 81%.

Scratch (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) inclui preditores para estrutura secundária, acessibilidade relativa a solventes, regiões desordenadas, domínios, pontes dissulfeto, estabilidade de mutação única, contatos de resíduos versus média, contatos de resíduos individuais e estrutura terciária.

De uma maneira geral, essa combinação de algoritmos foi utilizada a fim de avaliar: sequências identificadas como epítomos lineares alvos de anticorpos, análise de estrutura secundária da proteína, flexibilidade, exposição dos epítomos na superfície, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, ponto isoelétrico, carga e antigenicidade dos epítomos, oligomerização e localização dos epítomos na estrutura quaternária

das proteínas selecionadas. Foram consideradas as sequências identificadas por no mínimo 5 dos 7 algoritmos utilizados, e epítomos com menos de 10 aminoácidos foram excluídos.

4.5 Avaliação de antigenicidade

Após a predição de epítomos lineares alvo de anticorpos, cada epítomo foi submetido a uma nova avaliação de antigenicidade através da ferramenta VaxiJen. THRESHOLD de 0,4.

4.6 Análise de Conservação

Todas as sequências identificadas resultantes da avaliação de antigenicidade, foram avaliadas quanto ao grau de conservação com outros organismos, não pertencentes ao gênero *Leptospira*, a fim de evitar reatividade cruzada com outros antígenos inespecíficos, através da ferramenta de Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Posteriormente, as sequências específicas foram avaliadas quanto ao grau de conservação entre as bactérias do subclado P1, quando comparadas a esse grupo de organismos, as sequências que apresentaram E-value maior de 1 foram considerados epítomos de células B conservados.

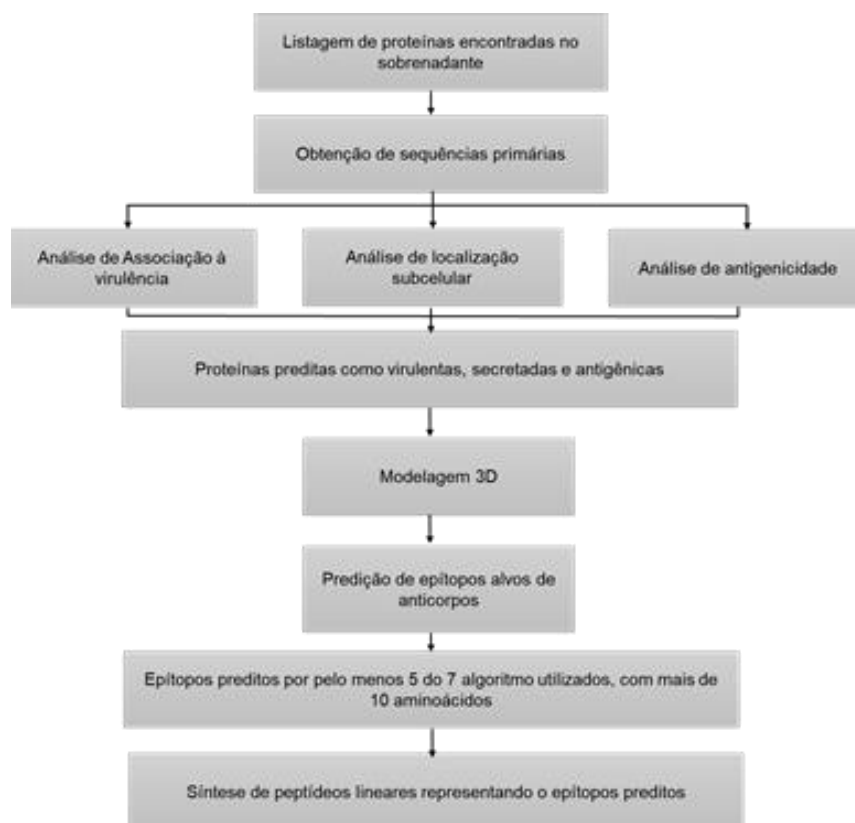


Figura 5: Esquema representando a metodologia até a síntese de peptídeos.

4.7 Síntese de Peptídeos

As melhores sequências avaliadas *in silico*, foram adquiridas comercialmente junto a empresa GenOne, que as produziu com o auxílio de um sintetizador automático (PSSM8 – Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando a metodologia de síntese em fase sólida (Gausepohl *et al.*, 1992; Luu *et al.*, 1996), assegurando a pureza e a concentração dos peptídeos. Apenas peptídeos com percentual de pureza superior a 95% serão foram utilizados.

4.8 Amostras de pacientes utilizadas no estudo

Através de amostras de soro de 51 pacientes infectados por leptospirosas patogênicas e 36 amostras não infectadas cedidas pelo Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose – Fiocruz-RJ, junto com informações pertinentes de cada paciente como sintomatologia, informações gerais (sexo, idade) informações laboratoriais e clínica e epidemiológicas (CAAE: 31405820.8.0000.5262).

4.9 Avaliação da resposta humoral específica contra os peptídeos (ELISA)

Para validação experimental, cada epítipo predito foi testado, na forma de peptídeo sintético, por ELISA indireto contra um painel de amostras de pacientes infectados por *Leptospira* e amostras não infectadas.

Na validação experimental, os ensaios foram realizados para cada peptídeo, e as amostras de soro dos pacientes feitas em duplicata. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 6µg de peptídeo por poço, diluídos em 100µL de PBS 1x e incubadas a 4°C por período de 16h.

Após a incubação, as placas foram lavadas 3x com uma solução de lavagem (utilizando 300 µl PBS Tween 0,05%). Então, adicionamos 200 µl/poço da solução de bloqueio (PBS Skin Milk 5%) e incubamos a placa a 37 °C por 1 hora.

Após o período de incubação, a placa foi novamente lavada, conforme anteriormente descrito e 100 µl das amostras dos pacientes foram adicionadas, em duplicatas na placa, diluídos em 1:100 em solução de bloqueio. As placas foram então incubadas por 1:30H a 37°C.

Para a preparação do conjugado utilizamos a proporção 1:4000, 100µl por poço, 10.000µl de PBS Skin Milk 5% para 10µl de Anticorpo de camundongo anti-IgG humana ou anti-IgM humana, conjugada a peroxidase. As placas foram retiradas da estufa novamente foram lavadas pelo mesmo processo das outras etapas e 100µl de anticorpo conjugado foi adicionado a cada poço a 37 °C por mais 1 hora.

Após o processo anterior as placas foram lavadas seguindo o mesmo método das outras lavagens e adicionalmente lavadas com PBS 1 X (300µl em cada poço); para a revelação utilizamos 100µl de TMB (cada poço) e as placas retornaram por mais 30 minutos para a estufa a 37 °C. Após este período, foram adicionados 50µl de HCL 1N (em cada poço).

A leitura das placas foi realizada através de uma leitora de placas, onde utilizamos o comprimento de onda para leitura de 450nm.

Para expressar os resultados dos ensaios de ELISA contra cada epítipo utilizaremos o Índice de Reatividade (I.R.) de cada amostra, definido pela razão entre a Densidade óptica (D.O.) obtida pela leitura das amostras de pacientes reativos e o valor de cut-off (média de D.O. dos pacientes não reativos somada a duas vezes de seu desvio padrão). Amostras que apresentarem I.R. superior a 1,0 serão consideradas positivas para o epítipo testado.

4.10 Análise estatística de resultados

Comparações de frequências de dados qualitativos (frequência de respondedores, frequência de sintomas, taxa de óbitos etc.) foram avaliadas por chi-quadrado, enquanto comparações de dados quantitativos (idade, título de anticorpos, índice de reatividade etc.) foram avaliadas por teste T. Adicionalmente, análises de correlações entre dados imunológicos e dados clínicos e epidemiológicos foram determinados pelo teste de Spearman. Todas as análises estatísticas serão realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção de proteínas candidatas ao estudo

Primeiramente, foi feita a seleção de proteínas já descritas do gênero *Leptospira* através de avaliação da literatura, utilizando como base a ferramenta de busca PubMed com os termos “*Leptospira*, antigenic proteins, secretome, secreted proteins”. Como resultado, selecionamos 24 proteínas das quais: 7 são proteínas de membrana externa, 6 são proteínas hipotéticas ou não caracterizadas; 4 são metalopeptidases (termolisinas); 3 são metaloproteases e 4 possuem outras atividades enzimáticas (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas descritas no sobrenadante de leptospiras patogênicas.

Grupos	Gene	Proteína	Tamanho (aa)	Código Uniprot
Proteínas de membrana externa	Loa22	Loa22	195	M4QAZ7
	LA_0563	LenC	462	Q8F8J3
	LA_2637	LipL32	272	O34094
	LA_4324	LenE	472	Q8EY92
	LA_0492	LipL36	361	Q8F8R3
	LA_3240	LipL48	461	Q8F196
	LIC10465	LigA	1224	G1UB65
Lipoproteína putativa/proteína não caracterizada	LA_3469	irpA	440	Q8F0M3
	LB_194	Putative lipoprotein	192	Q8EXL4
	LIC10508	Putative lipoprotein	203	Q72UZ5
	LIC10509	Putative lipoprotein	202	Q72UZ4
	LA_0505	Uncharacterized protein	366	Q8F8Q0
	LA_3091	Uncharacterized protein	245	Q8F1P
Metalopeptidases	LIC13320	Thermolysin	791	Q72M70
	LIC13321	Thermolysin homolog	792	Q72M69
	LIC13322	Thermolysin (nprT)	794	Q72M68
	LIC10715	Thermolysin	800	Q72UE2
Metaloproteases e peptidases	LIC13434	Pappalysin-1 domain protein	480	Q72LV94
	LA_2184	Predicted Zn dependent protease (tldD)	461	Q8F463
	LA_2457	Methionine aminopeptidase	240	Q8F3E9
Outras atividades enzimáticas	LA_3442	Peroxiredoxin	159	Q8F0Q0
	LA_0862	Thiol peroxidase	171	Q8F7T2
	LA_0411	etfA	319	Q8F8Y7
	LIC12631	Sph2 (hemolisina)	623	Q72P45

5.2 Escolha de candidatos estudados

Conforme demonstrado na Tabela 2, das 24 proteínas estudadas, 19 foram associadas à virulência e 21 foram identificadas como antigênicas. Além disso, estimamos que 9 das proteínas estudadas são secretadas, enquanto outras 3 (LA_0492; LIC10465 e LA_0505) possam estar presentes tanto na membrana externa da bactéria, quanto sendo secretadas. Com base nesses resultados, 7 proteínas foram consideradas secretadas, antigênicas e associadas a virulência e foram selecionadas para sequência do estudo (Figura 6).

Tabela 2: Avaliação das proteínas quanto ao potencial de secreção e localização subcelular, antigenicidade e associação a virulência.

Secretadas	Antigênicas	Associadas a virulência
LA_0563	LIC13320	LA_0563
LIC13320	LIC13321	LA_3091
LIC13321	LIC10715	LIC13321
LIC10715	LA_3240	LIC10715
LA_3240	LA_4324	LA_3240
LA_4324	LIC13434	LA_4324
LIC12631	LIC12631	LIC13434
LIC13322	LIC13322	LIC12631
LIC13434	LIC10509	LB_194
	LOA22	LIC10508
	LA_0411	LA_2184
	LB_194	LA_3469
	LIC10508	LA_3442
	LA_2184	LA_0505
	LA_3469	LIC10465
	LA_3442	LA_0862
	LA_0505	LA_0492
	LIC10465	LA_2637
	LA_0862	LIC13320
	LA_0492	
	LA_2637	

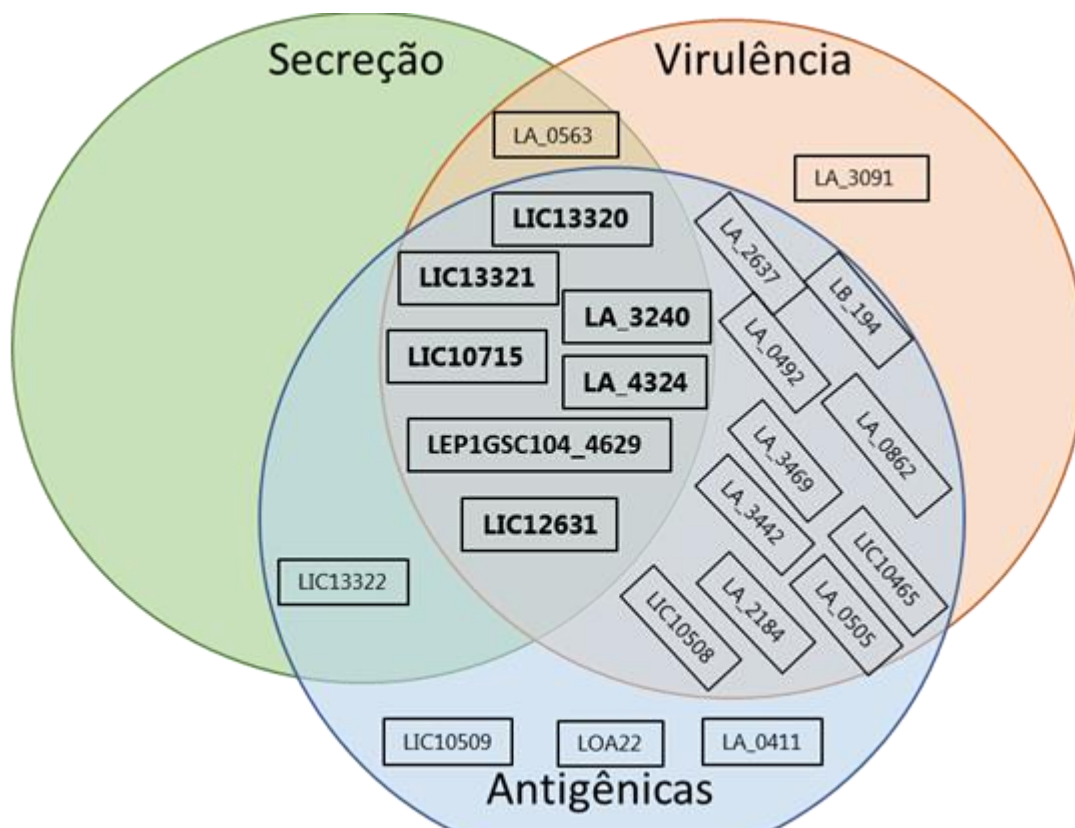


Figura 6: Análise de localização subcelular, antigenicidade e associação à virulência das proteínas estudadas.

No diagrama de Venn, estão assinalados na esfera azul, proteínas preditas como antigênicas, na esfera verde, preditas como secretadas e na esfera laranja, preditas como associadas à virulência. Foram considerados bons alvos aqueles que se sobrepunham nas 3 análises.

Dos resultados acima, 7 proteínas se sobrepuseram. Uma delas, a LIC13434, está envolvida em outros estudos do grupo e por isso, não foi selecionada para sequência do trabalho., e, portanto, não passou para a etapa seguinte. As 6 proteínas partiram para a etapa de modelagem 3D, sendo elas: LA_4324, LA_3240, LIC13321, LIC10715, LIC13320, LIC12631.

5.3 Modelagem de proteínas selecionadas

Através do conjunto de ferramentas utilizadas, a modelagem das proteínas selecionadas, resultou nos modelos abaixo (Figura 7).

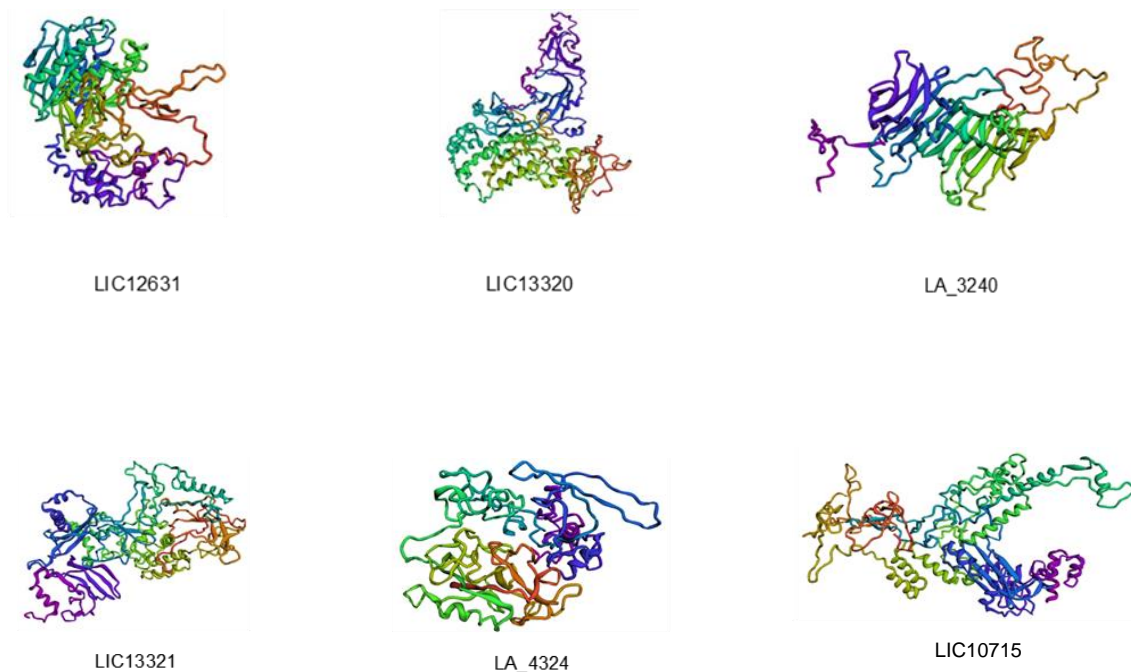


Figura 7: Modelo 3D das proteínas selecionadas.

5.4 Predição de epítomos

As 6 proteínas seguiram para a etapa de predição de epítomos lineares, onde foram usados outros 7 algoritmos de imunoinformática. Foram preditas no total 30 epítomos, diminuimos esse número, excluindo todos aqueles epítomos com menos de 10 aminoácidos e obtivemos um total de 17 epítomos. A proteína LIC12631, teve 3 epítomos preditos de 10 a 16 aminoácidos, enquanto a proteína LIC13320 teve 5 epítomos preditos de 10 a 19 aminoácidos, as proteínas LA_4324 e LA_3240 tiveram apenas 1 epítomo predito respectivamente com 11 e 15 aminoácidos, a proteína LIC13321 teve 3 epítomos preditos de 11 a 15 aminoácidos, e a proteína LIC10715 teve 4 epítomos preditos de 17 a 21 aminoácidos, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Epítomos lineares por proteínas selecionadas.

Proteína	Epítopo	Sequência	Bepi pred	ESA	ABC pred	Ellipro	BCe pred	Lb tope	Scratch
LIC12631	LIC12631 _(153–168)	GHDERAKRISKSDYVK	X	X	X	X	X	X	X
		SGYTSDEFSD	X	X	X	X		X	X
	LIC12631 _(400–409)	TPTKSGHKKKYDQV	X	X	X	X	X	X	X
LIC13320	LIC13320 _(24–36)	KAISDRHYSSDGT	X	X	X	X		X	X
	LIC13320 _(148–166)	IWESPEREEAFKKKQDDPS	X	X	X	X	X	X	X
	LIC13320 _(231–246)	GGGDTPPTTPQTPPDT	X	X	X	X		X	X
	LIC13320 _(324–336)	WTKAEYHDDYNHD	X	X	X	X		X	X
	LIC13320 _(742–751)	YPRADEKFYD	X	X	X	X	X		X
LA_4324	LA_4324 _(304–314)	PTRRQATTNPN	X	X	X	X		X	X
LA_3240	LA_3240 _(378–392)	DNCEFATKPDYQPSG	X	X	X	X		X	X
LIC13321	LIC13321 _(155–166)	EAALKRKKNDPN	X	X	X		X	X	X
	LIC13321 _(323–333)	WSQSEYHDDYN	X	X	X	X		X	X
	LIC13321 _(492–506)	SNPKSTTVMSPGPNT	X	X	X	X		X	X
LIC10715	LIC10715 _(170–190)	ESPEREDRLRSIKGDSKATYF	X	X	X	X	X	X	X
	LIC10715 _(241–259)	RDARRFETQPGDGGGGTTP	X	X	X	X		X	X
	LIC10715 _(295–311)	WTAREENHYELKDYSRG	X	X	X	X	X	X	X
	LIC10715 _(509–528)	ASNPKSTTVKYPGPNTYKGE	X	X	X	X		X	X

5.5 Avaliação de antigenicidade dos epítomos

Após a predição de epítomos, as sequencias selecionadas foram submetidas a nova avaliação quanto ao potencial antigênico, conforme a tabela abaixo. Sequencias com um score maior que 0,4 foram consideradas antigênicas.

Tabela 4: Avaliação de antigenicidade por epítipo linear selecionado.

Proteína	Epítipo	Sequência	Vaxigen
LIC12631	LIC12631 _(153–168)	GHDERAKRISKSDYVK	1.17
	LIC12631 _(400–409)	SGYTSDEFSD	0.33
	LIC12631 _(423–436)	TPTKSGHKKKYDQV	1.76
LIC13320	LIC13320 _(24–36)	KAISDRHYSSDGT	0.87
	LIC13320 _(148–166)	IWESPEREEAFKKKQDDPS	0.34
	LIC13320 _(231–246)	GGDTPPTTPQTPPDT	1.22
	LIC13320 _(324–336)	WTKAEYHDDYNHD	0.04
	LIC13320 _(742–751)	YPRADEKFYD	0.18
LA_4324	LA_4324 _(304–314)	PTRRQATTNPN	0.92
LA_3240	LA_3240 _(378–392)	DNCEFATKPDYQPSG	1.00
LIC13321	LIC13321 _(155–166)	EAALKRKKNDPN	0.95
	LIC13321 _(323–333)	WSQSEYHDDYN	0.06
	LIC13321 _(492–506)	SNPKSTTVMSPGPNT	0.64
LIC10715	LIC10715 _(170–190)	ESPEREDRLRSIKGDSKATYF	0.86
	LIC10715 _(241–259)	RDARRFETQPGDGGGGTTP	2.29
	LIC10715 _(295–311)	WTAREENHYELKDYSRG	0.61
	LIC10715 _(509–528)	ASNPKSTTVKYPGPNTYKGE	0.59

5.6 Características das amostras de pacientes testadas

A população estudada foi composta por 87 indivíduos, oriundas de diversos estados do Brasil, como RJ, CE, RO, PE, BA, ES, MS, RR, AM, PI, GO, AL dentre as quais 51 são pacientes positivos para leptospirose através do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), com títulos variando de 800 a 12800, onde 11,8% (6) desses indivíduos evoluíram para óbito, e 36 são pacientes com outros quadros febris, não reagentes para leptospirose que foram utilizados como grupo controle negativo, onde 11,1% (4) desses indivíduos também evoluíram para óbito. A mediana da idade do grupo de indivíduo reagentes para leptospirose e não reagente respectivamente é de 37 e 36,5 anos. A média do tempo de sintomas para os dois grupos foi de respectivamente 11 e 13 dias. A maior parte da população estudada eram do sexo masculino, em ambos os grupos e apenas 9,8% eram do sexo

feminino no grupo reagente para leptospirose. Alguns sintomas foram relatados com maior frequência nos indivíduos do grupo reagente para leptospirose como: icterícia, dor na panturrilha, insuficiência renal, e hemorragia pulmonar, sendo este último presente apenas nesse grupo de indivíduos. Os sorovares predominantes dentre o grupo reagente para leptospirose foram Copenhagi e Tarassovi ambos com predominância em 47,1% da população (Tabela 5).

Tabela 5: Resumo de dados clínicos e epidemiológicos das amostras de pacientes testadas.

	Reagente para Leptospirose	Não reagente para Leptospirose	p Value
INFORMAÇÕES GERAIS			
Número de indivíduos	51	36	
Idade – mediana (ir)	37(22-49)	36,5 (17-45)	
Óbitos- n (%)	6 (11,8%)	4 (11,1%)	
Tempo de sintomas (dias)	11	13	
GÊNERO – N (%)			
Feminino	5 (9,8%)	8 (22,2%)	
Masculino	46 (90,2%)	28 (77,8%)	
SINTOMAS – N (%)			
Febre	44 (86,3%)	29 (80,6%)	
Mialgia	43 (84,3%)	24 (66,7%)	
Cefaléia	34 (66,7%)	21 (58,3%)	
Icterícia	35 (68,6%)	15 (41,7%)	0,0159
Prostração	27 (52,9%)	18 (50,0%)	
Dor na panturrilha	31 (60,8%)	15 (41,7%)	0,0257
Vômito	24 (47,1%)	18 (50,0%)	
Diarréia	20 (39,2%)	11 (30,6%)	
Alterações respiratórias	18 (35,3%)	10 (27,8%)	
Insuficiência renal	20 (39,2%)	5 (13,9%)	0,0463
Congestão conjuntival	10 (19,6%)	8 (22,2%)	
Dor abdominal	4 (7,8%)	5 (13,9%)	
Sinais hemorrágicos	8 (15,7%)	2 (5,6%)	
Hemorragia pulmonar	7 (13,7%)	0 (0%)	0,0382
Náusea	0 (0%)	3 (8,3%)	
Oligúria/anúria	1 (2,0%)	1 (2,8%)	
POSSÍVEIS FONTES DE INFECÇÃO – N (%)			
Local com sinais de roedores	30 (58,8%)	23 (63,9%)	
Contato direto com roedores	18 (35,3%)	6 (16,7%)	
Água ou lama de enxente	30 (58,8%)	9 (25,0%)	0,0011
Criação de animais	11 (21,6%)	14 (38,9%)	
Limpeza de caixa d'água	3 (5,9%)	0 (0%)	
Fossa/ caixa de gordura/ esgoto	11 (21,6%)	6 (16,7%)	
Rio, córrego, lagoa ou represa	16 (31,4%)	7 (19,4%)	
Lixo, entulho	13 (25,5%)	8 (22,2%)	
Terreno baldio	15 (29,4%)	9 (25,0%)	
Plantio e colheita	7 (13,7%)	4 (11,1%)	
SOROVARES – N (%)			
Copenhageni	24 (47,1%)		
Australis	1 (2,0%)		
Hebdomadis	2 (3,9%)		
Canicola	3 (5,9%)		
Pomona	1 (2,0%)		
Icterohaemorrhagiae	8 (15,7%)		
Autumnalis	1 (2,0%)		
Gryppytyphosa	3 (5,9%)		
Tarassovi	24 (47,1%)		
Wolffi	2 (3,9%)		
Sejroe	1 (2,0%)		

5.7 Avaliação da imunogenicidade natural dos epítomos preditos

5.7.1 Termolisinas

Com base nas etapas *in silico* do estudo, 8 epítomos foram preditos em três diferentes termolisinas (LIC13320 - LIC13320_(24–36), LIC13320_(231–246); LIC13321 - LIC13321_(155–166), LIC13321_(492–506) e LIC10715 - LIC10715_(170–190), LIC10715_(241–259), LIC10715_(295–311), LIC10715_(509–528)) e testados por ELISA contra amostras de pacientes com quadros febris reativos e não reativos para leptospirose (controle negativo), para confirmarmos a imunogenicidade natural de cada epítomo, com base ao seu reconhecimento por anticorpos IgM e/ou IgG. Deste modo, a magnitude de resposta IgM aos peptídeos testados variou de 0,17 a 5,85 (Figura 8A), enquanto os índices de reatividade IgG variaram de 0,17 a 4,45 (Figura 8B). Com relação a frequência de respondedores para cada peptídeo, observamos que a frequência geral (IgG ou IgM) variou de 14% a 31%, sendo maior no peptídeo LIC13320_(231–246) (IgG) quando comparado ao peptídeo LIC10715_(295–311) (9,8%, $p=0,0131$) e no peptídeo LIC13321_(492–506) (IgM) quando comparado ao peptídeo LIC13320_(24–36) (0%, $p=0,0267$). Adicionalmente, comparando a frequência de respondedores IgG e IgM, embora tenhamos observado maior frequência de respondedores IgG para todos os peptídeos avaliados, esta diferença se mostra estatística apenas para os para os peptídeos LIC13320_(24–36) (IgG= 24%, IgM= 0%, $p= 0,0002$), LIC13320_(231–246) (IgG= 31%, IgM= 2%, $p <0,0001$) e LIC13321_(155–166) (IgG= 31%, IgM= 6%, $p= 0,0124$) (Figura 8C).

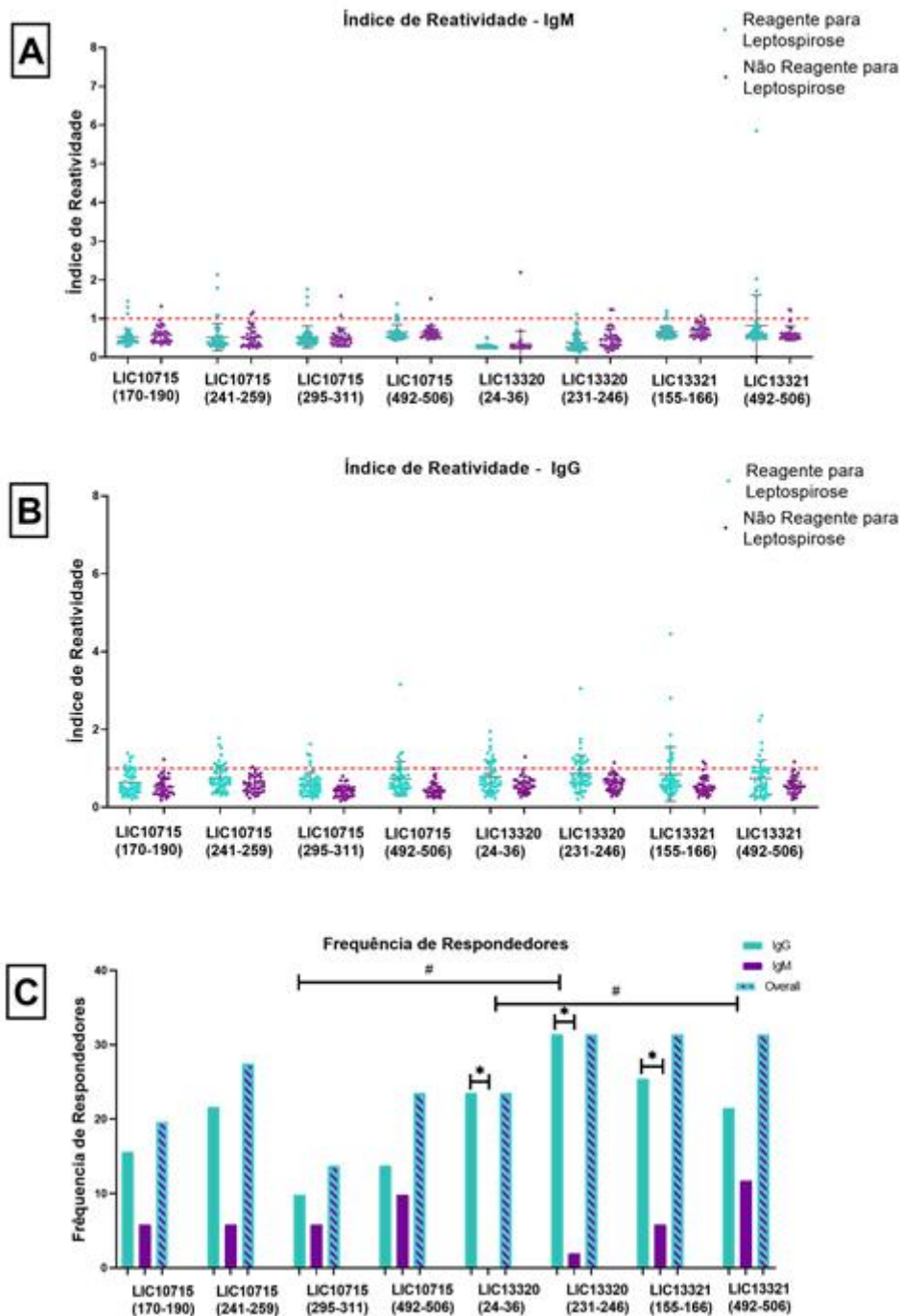


Figura 8: Avaliação da imunogenicidade natural de epítomos preditos em termolisinas de *L. interrogans*.

A e B - Diagrama de caixa representando a avaliação da imunogenicidade natural de epítomos preditos de Termolisinas. C- Gráfico de barras representando em percentual (%) a frequência de respondedores para os oito peptídeos de termolisinas individualmente. * Representa a diferença significativa dentro do mesmo peptídeo entre IgM e IgG; # Representa a diferença significativa entre os peptídeos.

5.7.2 Esfingomielinase -Sph2

Com base nas etapas *in silico* do estudo, 2 epítomos (LIC12631_(153—168), LIC12631_(423—436)) foram preditos na proteína esfingomielinase-Sph2 testados por ELISA contra amostras de pacientes com quadros febris reativos e não reativos para leptospirose (controle negativo), para confirmarmos a imunogenicidade natural de cada epítopo, com base ao seu reconhecimento por anticorpos IgM e/ou IgG. Deste modo, a magnitude de resposta IgM aos peptídeos testados variou de 0,20 a 1,35 (Figura 9A), enquanto os índices de reatividade IgG variaram de 0,17 a 3,22 (Figura 9B). Com relação a frequência de respondedores para cada peptídeo, observamos que a frequência geral (IgG ou IgM) variou de 18% a 35%. Adicionalmente, comparando a frequência de respondedores IgG e IgM, embora tenhamos observado maior frequência de respondedores IgG para todos os peptídeos avaliados, esta diferença se mostra estatística apenas para os para os peptídeos LIC12631_(153—168) (IgG= 33%, IgM= 4%, $p= 0,0002$), LIC12631_(423—436) (IgG= 18%, IgM= 2%, $p= 0,0158$) (Figura 9C).

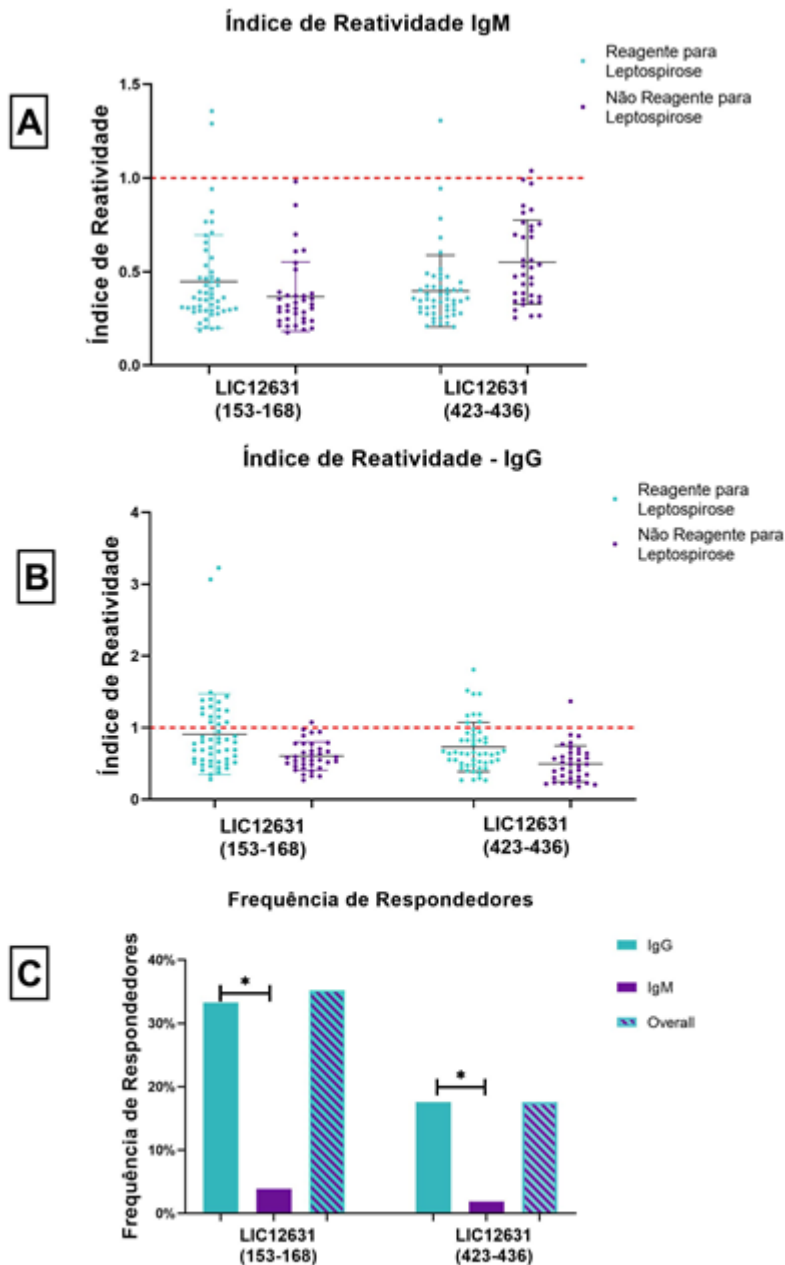


Figura 9: Avaliação da imunogenicidade natural de epítomos preditos em esfingomielinase -Sph2 de *L. interrogans*.

A e B - Diagrama de caixa representando a avaliação da imunogenicidade natural de epítomos preditos da Esfingomielinase - Sph2. C- Gráfico de barras representando em percentual (%) a frequência de respondedores para os dois peptídeos de esfingomielinas. * Representa a diferença significativa dentro do mesmo peptídeo entre IgM e IgG; # Representa a diferença significativa entre os peptídeos.

5.8 Proporção de amostras reagentes aos peptídeos

De um modo geral, temos que do total de 51 amostras reagentes como podemos observar pela Figura 10, 75% da população do estudo, respondeu para pelo menos 1 epítipo predito, onde analisamos em conjunto as termolisinas e a esfingomielinase – Sph2, totalizando 10 epítipos preditos.

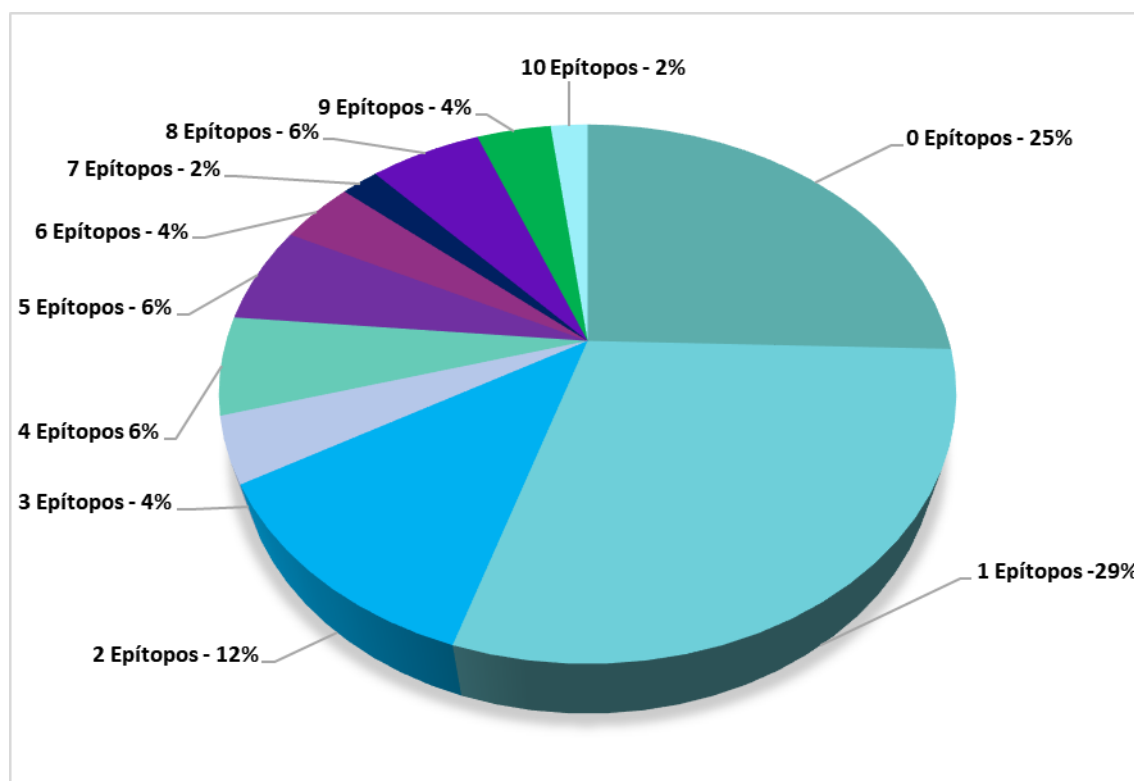


Figura 10: Proporção de indivíduos respondedores a combinações de peptídeos

5.9 Associação da resposta aos peptídeos e dados clínicos e epidemiológicos.

Os sintomas que apresentaram diferença significativa (p value < 0,05) através do teste de Fisher entre os grupos reagente para leptospirose e não reagente foram: Hemorragia pulmonar, icterícia e insuficiência renal, por esse motivo foram o enfoque dos nossos resultados demonstrados nas figuras 11, 12 e 13.

O sintoma: Hemorragia pulmonar para o grupo respondedor (R) de cada peptídeo teve uma diferença significativa (p value < 0,05), através do teste de Fisher, quando comparado ao grupo controle representado pelo C (grupo não reagente para leptospirose), também apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo não respondedor (NR) para os peptídeos: LIC13321_(155–166) ($p = 0,0084$),

LIC13321_(492—506) (p= 0,0033), LIC10715_(509—528) (p= 0,0452), LIC10715_(170—190) (p= 0,0314), LIC10715_(295—311) (p= 0,0212) (Figura 11).

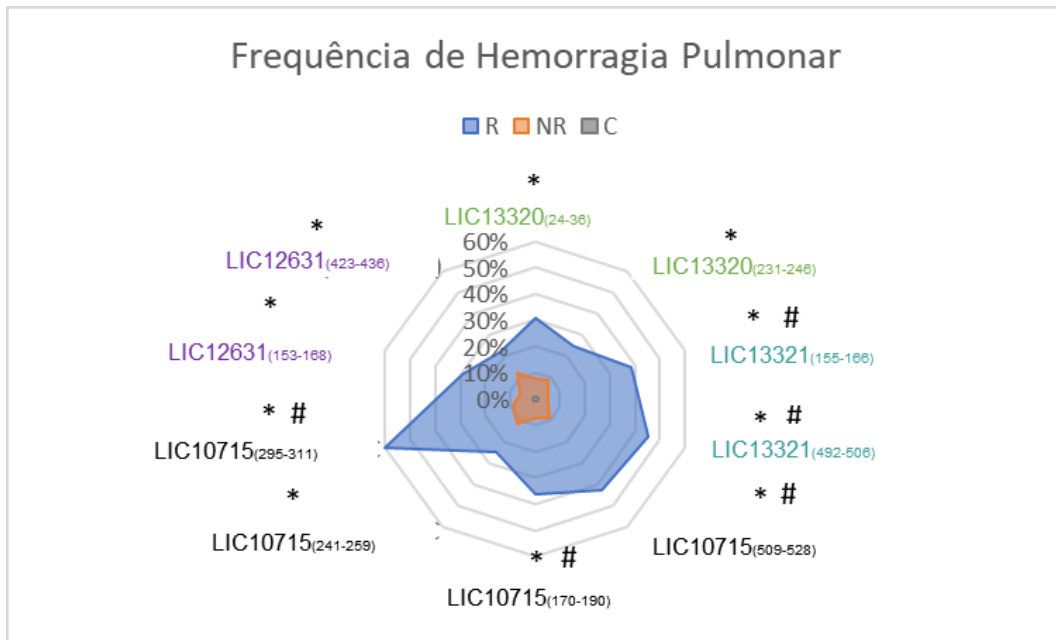


Figura 11: Frequência de hemorragia pulmonar entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítipo. R – Grupo respondedor para peptídeos; NR grupo não respondedor para peptídeos; C – grupo controle, não reagente para Leptospirose. * Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e controle; # Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e não respondedor.

O sintoma: Icterícia para o grupo respondedor (R) de cada peptídeo teve uma diferença significativa ($p \text{ value} < 0,05$), através do teste de Fisher, quando comparado ao grupo controle representado pelo C (grupo não reagente para Leptospirose), exceto para os epítomos: LIC13321_(155—166), LIC13321_(492—506), LIC10715_(241—259), LIC10715_(295—311), no entanto, não observamos diferenças entre os pacientes respondedores e não respondedores para cada peptídeo (Figura 12).

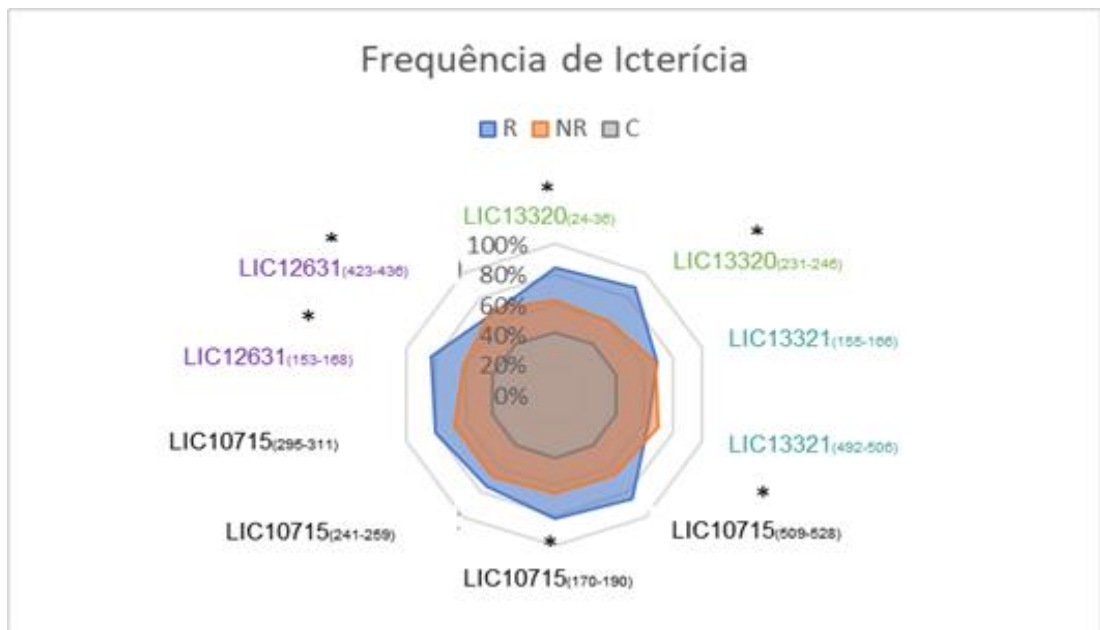


Figura 12: Frequência de Icterícia entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítopo.

R – Grupo respondedor para peptídeos; NR grupo não respondedor para peptídeos; C – grupo controle, não reagente para Leptospirose. * Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e controle; # Representa a diferença significativa entre o grupo

Do mesmo modo, com relação a frequência de casos de insuficiência renal, o grupo respondedor (R) de cada peptídeo teve uma diferença significativa ($p < 0,05$), apenas quando comparado ao grupo controle representado pelo C (grupo não reagente para Leptospirose), exceto para os epítomos: LIC10715_(170—190), LIC10715_(295—311), LIC10715_(170—190) (Figura 13).

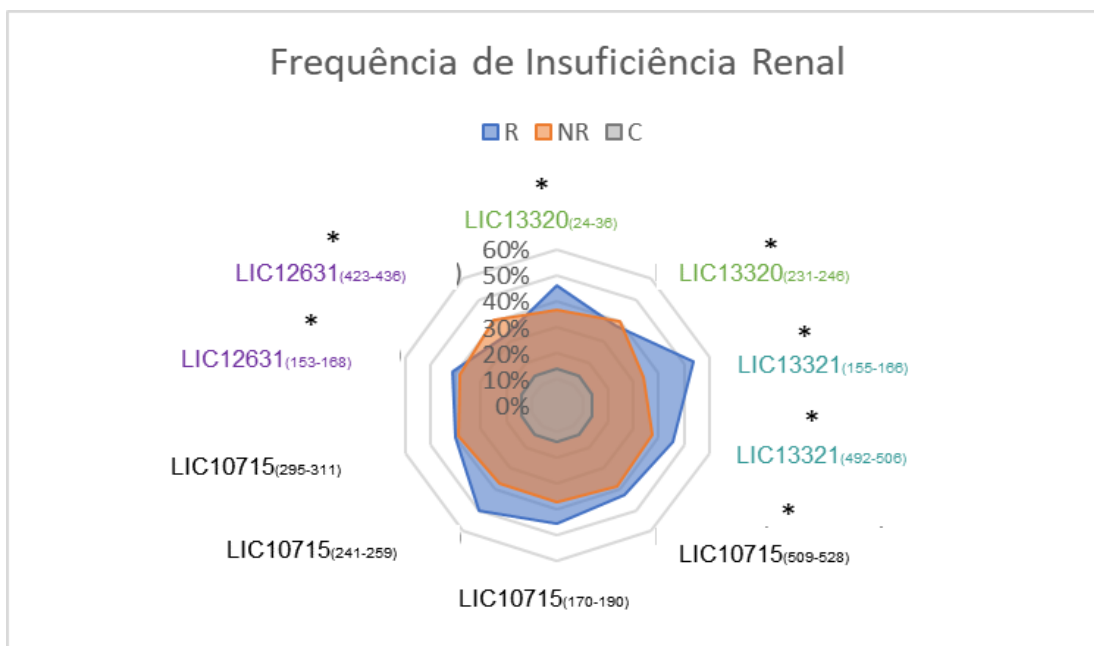


Figura 13: Frequência de Insuficiência renal entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítomo. R – Grupo respondedor para os peptídeos; NR grupo não respondedor para peptídeos; C – grupo controle, não reagente para Leptospirose. * Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e controle; # Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e não respondedor.

Outra informação importante são os dados de óbito, apresentada pela população estudada.

Observamos maior frequência de pacientes que vieram a óbito, dentre os pacientes respondedores, para os peptídeos LIC10715_(170—190), LIC10715_(295—311), LIC12631_(423—436) apresentaram diferença significativa (p value $<0,05$), através do teste de Fisher, quando comparado com os mesmos peptídeos dentro do grupo de não respondedores (NR) e com o grupo controle (C) (Figura14).

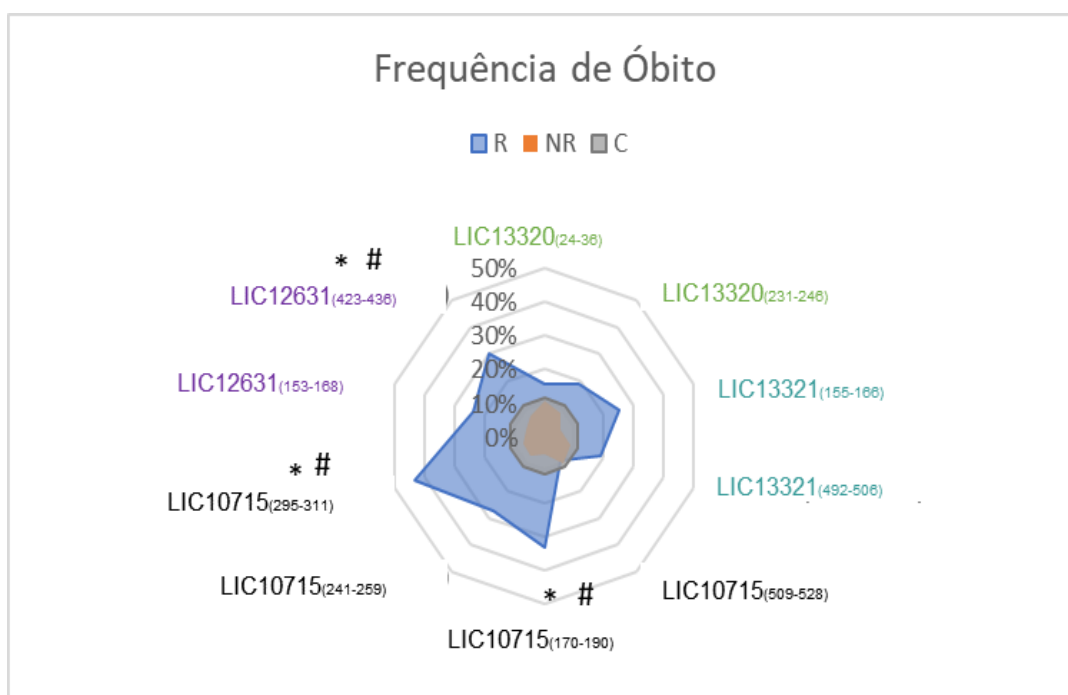


Figura 14: Frequência de Óbito entre o grupo controle e pacientes com leptospirose reativos e não reativos para cada epítipo.

R – Grupo respondedor para peptídeos; NR grupo não respondedor para peptídeos; C – grupo controle, não reagente para Leptospirose. * Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e controle; # Representa a diferença significativa entre o grupo respondedor e não respondedor.

6 DISCUSSÃO

A infecções causadas por leptospiras patogênicas, apresentam na maioria das vezes casos assintomáticos ou apresentando sintomas inespecíficos que podem ser confundidos com síndromes gripais, mas quando o quadro avança para a forma grave da doença, existem complicações que podem ser letais (BRASIL, 2014). Acentuando o problema, há uma dificuldade no diagnóstico, pois na maioria das vezes necessita de mão de obra especializada e dependendo do estágio da infecção são necessários métodos diagnósticos diferentes, além disso, a única formulação vacinal disponível é principalmente para uso veterinário, e não induz proteção duradoura e eficaz (Faine et al., 1999; Vincent et al., 2019). Desse modo, o número de casos notificados pode ser subestimado, levando em consideração que os indivíduos são considerados suspeitos de leptospirose apenas quando é relatado o contato com enchente e roedores, a partir dessas dificuldades o cenário de leptospirose no mundo e no Brasil pode ser muito mais complexo do que o demonstrado (BRASIL, 2021). Neste cenário, a identificação de epítomos lineares de células B surge como uma abordagem potencial para melhorar e acelerar o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e de formulações vacinais eficientes para humanos.

Nesse trabalho, usamos ferramentas de imunoinformáticas para explorar as proteínas secretadas de leptospiras patogênicas, e para predizer epítomos lineares de células B que foram sintetizados como peptídeos e validados experimentalmente por ELISA contra amostras de soro de 51 pacientes reagentes para leptospirose e 36 pacientes não reagentes através do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT).

Em relação aos candidatos a antígenos para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e formulações vacinais para humanos, a partir uma revisão literária 24 antígenos candidatos foram propostos a avaliação, para busca de antígenos secretados com potencial uso em formulações vacinais (Barbosa et al., 2009; Eshghi et al., 2015; Gamberini et al., 2005; Narayanavari et al., 2015).

São eles o grupo de proteínas de membrana externa: Loa22, LA_0563, LA_2637, LA_4324, LA_0492, LA_3240, LIC10465; putative lipoprotein /Uncharacterized protein: LA_3469, LB_194, LIC10508, LIC10509, LA_0505, LA_3091; as metalopeptidases: LIC13320, LIC13321, LIC13322, LIC10715; o grupo de metaloproteases e peptidases: LIC13434, LA_2184 e LA_2457, finalizando com o

grupo de proteínas que desempenham outras atividades enzimáticas: LA_3442, LA_0862, LA_0411, LIC12631.

Após as etapas das análises de localização celular, antigenicidade, e associação a virulência, 6 proteínas seguiram para a predição de epítomos, onde um total de 10 epítomos em 4 proteínas foram preditos através de uma combinação de algoritmos, onde 4 desses epítomos foram preditos por todo os algoritmos e 6 epítomos preditos por 6 algoritmos. Dentre as 4 proteínas, 3 são termolisinas e 1 a esfingomielinase-Sph2.

As termolisinas são secretadas por espécies patogênicas de *Leptospira*, metalopeptidases dependentes de zinco da família M4. São produzidas por diversos tipos de microorganismos e desempenham um papel importante na patogênese e podem ser considerados como interessantes alvos para intervenções terapêuticas. Essas proteases contribuem para a disseminação de patógenos, através da degradação de tecidos e modulando a defesa do hospedeiro (*Barbosa et al.*, 2009). Uma das termolisinas a LIC13322 foi retirada do estudo na etapa de análise de associação a virulência, uma vez que foi predita como não associada a virulência, apesar de apresentar atividade proteolítica contra elementos do sistema complemento (*Amamura et al.*, 2017; *Fraga et al.*, 2014). 3 representantes das termolisinas de leptospiros patogênicas nomeadas como LIC13320, LIC13321 e LIC10715 foram utilizadas nesse trabalho, delas obtivemos 8 epítomos preditos (LIC13320 - LIC13320_(24–36), LIC13320_(231–246); LIC13321 - LIC13321_(155–166), LIC13321_(492–506) e LIC10715 - LIC10715_(170–190), LIC10715_(241–259), LIC10715_(295–311), LIC10715_(509–528)).

E a esfingomielinase - Sph2 é uma enzima capaz de hidrolisar esfingomielinas a ceramida e fosforilcolina. Com isso, podem criar poros em células e romper membranas, inclusive de células sanguíneas, estando por essa razão envolvidas com as complicações hemorrágicas que ocorrem na Síndrome de Weil, forma grave da leptospirose. Entre os tipos de esfingomielinase expressas por leptospiros, a Sph2 foi identificada como dependente de magnésio e capaz de realizar atividade de esfingomielinase e forte atividade hemolítica, podendo ela estar relacionada com o processo de invasão por comprometer a integridade de células do hospedeiro. Em estudos conduzidos, cepas mutantes incapazes de expressar esfingomielinases demonstraram baixa capacidade de causar infecção, fato que se alia à ausência destas enzimas em cepas saprófitas (*Narayanavari et al.*, 2015). 1

esfingomielinase – Sph2 (LIC12631) foi utilizada nesse trabalho com 2 epítomos preditos (LIC12631_(153—168), LIC12631_(423—436)).

O fato de ambas as proteínas utilizadas, o grupo de termolisinas e a esfingomielinase-Sph2, serem proteínas somente secretadas por leptospiros patogênicas faz com que a identificação de epítomos de células B nessas proteínas seja uma alternativa promissora para melhorar a especificidade de testes sorológicos e abranger as espécies e sorovares patogênicos dentro de uma formulação vacinal.

Nos últimos anos, combinações de algoritmos de predição têm sido usadas para melhorar precisão da predição de epítomos lineares de células B contra vírus (Conte, 2019; Moeini, 2021; Salarpour, 2020; Sianez-Estrada, 2020), fungos (Almeida, 2020), protozoários (Campos, 2018; Matos, 2019) e bactérias (Feodorova, 2020; Kalkanli et al., 2020; Zargarán, 2020). Apesar de estudos referentes a vacinologia convencional para leptospirose com proteínas específicas de leptospiros patogênicas existirem e serem muito presentes, até hoje, para humanos não se tem uma vacina que gere proteção duradoura contra leptospiros patogênicos e nem que protejam contra toda a diversidade de sorovares presente dentro do gênero *Leptospira* (Faine et al., 1999; Vincent et al., 2019).

Estudos utilizando vacinologia reversa combinada com ferramentas de imunoinformática para leptospirose ainda são incipientes, existindo poucos trabalhos que mencionam esse processo, mas de acordo com esses trabalhos existentes e outros utilizando outros microrganismos como alvos, foi possível chegar a um consenso de ferramentas de imunoinformática para utilizar nesse trabalho. Foram utilizadas a combinação de 7 algoritmos de imunoinformática: Bepipred, Emini, ABCpred, ElliPro, BcePred, Lptope e Scratch para a predição de epítomos lineares de células B (Gamberini et al., 2005; Rappuoli, 2000; Yang, 2006). Todos os epítomos oriundos desse processo foram submetidos a análise pelo Vaxijen, que considerou 10 epítomos como sendo antigênicos.

Após a validação experimental desses epítomos, como resultado, a sensibilidade variou de 13% a 35%, observa-se um percentual um pouco mais alto em estudos semelhantes de identificação de epítomos imunogênicos de células B lineares em proteínas de membrana externa utilizando como alvo a bactéria *Coxiella burnetti*, onde a sensibilidade dos epítomos, na validação experimental foi maior que 50% (Fontes, 2021). Enquanto a especificidade dos epítomos de leptospira foi maior que 90%.

75% do grupo de indivíduos reagentes para leptospirose respondeu para pelo menos 1 epítipo predito, um percentual semelhante de 77% foi observado no estudo mencionado anteriormente da bactéria *Coxiella burnetti* (Fontes, 2021).

Considerando os indivíduos respondedores para as termolisinas no geral 73% dos indivíduos responderam para esse grupo de proteínas e 39% dos pacientes reativos para leptospirose responderam para Sph2. Isso pode indicar que uma combinação de epítopos bem formulada pode aumentar a resposta dos indivíduos para esses epítopos preditos, podendo ser utilizados em construções de diferentes formulações vacinais e reativos diagnósticos, embora vacinas peptídicas terem se mostrado menos imunogênicas que outras vacinas, algumas etapas no desenvolvimento delas, são essenciais para contornar essa desvantagem (Kalita, 2022).

De acordo com os resultados entre a associação da resposta aos peptídeos e dados clínicos, como já é conhecido, hemorragia pulmonar é um sintoma que pode estar presente em pacientes com casos graves de leptospirose, o que traz diversas complicações para o paciente (BRASIL, 2014; Daher et al., 2011; Evangelista e Coburn, 2010; Faine, 1970; Vale et al., 2014). A presença desse sintoma, neste estudo foi relatada apenas nos pacientes reagentes para leptospirose conforme demonstra a tabela 5, de dados clínicos da população estudada. Em relação desse sintoma entre os indivíduos respondedores para os peptídeos e o grupo não respondedor, a diferença é presente na maioria dos epítopos de termolisinas, de 8, houve diferença para 5 deles. Através de estudos, sabe-se que esse grupo de termolisinas estão associadas com a capacidade de danificar tecidos (Barbosa et al., 2009; Isaac, 2020), o que hipoteticamente pode estar associando a presença dessas proteínas com a hemorragia pulmonar exibida pelos pacientes que respondem a esses peptídeos. Em contraste com informações já conhecidas sobre a Sph2, a resposta para os seus epítopos preditos não apresentaram diferença significativa entre seu grupo respondedor e não respondedor para hemorragia pulmonar (Narayanavari et al., 2015).

Para os sintomas icterícia e insuficiência renal, não observamos diferenças significativas entre o grupo respondedor e não respondedor para os peptídeos, apenas entre o grupo respondedor e controle. Após esses resultados, esse epítopos parecem não estar envolvidos com ambos os sintomas.

Em relação a frequência de óbitos houve diferença para dois epítomos da termolisina LIC10715, e um da Sph2, como mencionado antes ambas relacionadas com a patogênese da doença sendo a primeira relacionada com danos aos tecidos e modulação da resposta imune (*Barbosa et al.*, 2009; *Isaac*, 2020) e a segunda envolvida com complicações hemorrágicas (*Narayanavari et al.*, 2015). Hemorragias podem estar presente em pacientes com leptospirose grave, e quando há presença desse sintoma as chances de letalidade da doença aumentam significativamente (*BRASIL*, 2014), corroborando com os resultado da análise de frequência de hemorragia pulmonar os mesmos epítomos da LIC1075 da análise de óbito tiveram também diferenças significativa com os grupos não respondedores e controle.

Após esses resultados, a utilização da vacinologia reversa, para identificação de epítomos para compor construções de vacinas peptídicas contra leptospirose em humanos, pode ser uma estratégia promissora, pois promove uma maior segurança e economia quando comparada com vacinologia convencional, essa técnica que foi empregada com sucesso para o desenvolvimento de vacinas contra outros microrganismos, como vírus (*Bazhan et al.*, 2019; *Kardani et al.*, 2020; *Naz et al.*, 2020), bactérias (*Shah et al.*, 2018) e outros organismos (*Kaur et al.*, 2020; *Pandey et al.*, 2018). Em corroboração com os resultados obtidos, em 2021, Kumar et al., demonstram a aplicação da imunoinformática e estratégias de biologia estrutural para desenvolver um epítopo específico para compor uma vacina quimérica contra leptospirose a partir de proteínas de múltiplos domínios.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, dez epítomos lineares de células B foram identificados por uma combinação de ferramentas *in silico* e, confirmados como imunogênicos em indivíduos expostos a leptospirosas patogênicas. Este foi o primeiro estudo avaliando a imunogenicidade de epítomos de células B lineares preditos em proteínas secretadas por leptospirosas patogênicas usando amostras de pacientes humanos oriundos do Brasil. Portanto, mais estudos sorológicos sobre esses epítomos são essenciais para estimar sua real especificidade e sensibilidade. Atualmente, peptídeos sintéticos representando sequências de epítomos de células B têm demonstrado ser uma ferramenta valiosa como novas moléculas para diagnóstico confiável e rápido de doenças infecciosas com resultados promissores para leptospirose conforme corroborado por este estudo. Quando comparado à proteína inteira, o uso de peptídeos sintéticos como antígeno diagnóstico permite maior especificidade e reprodutibilidade sem variação de lote para lote, aliado à facilidade e baixo custo de produção. Além disso, atualmente, esse epítomos identificados nesse trabalho se mostram uma alternativa interessante para desenvolvimento de novas e eficazes formulações vacinais, por resultar em uma abordagem rápida, segura e econômica quando comparada às estratégias vacinais tradicionais. Neste cenário, embora o uso desta abordagem para o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose em humanos seja incipiente, é uma alternativa interessante para contornar obstáculos frutos do amplo espectro de sorovares e diversidade antigênica de leptospirosas capazes de infectar o homem. Nesse contexto, acreditamos que o uso da imunoinformática aplicada à identificação de epítomos específicos de células B seja uma estratégia eficaz para melhorar e acelerar o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e para a identificação de novos candidatos vacinais.

8 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, os epítomos preditos e validados se mostraram um caminho promissor para desenvolvimento de novas e eficazes formulações vacinais, com isso, como perspectiva para esse trabalho, nossa proposta é utilizar esse epítomos, na construção de um antígeno vacinal quimérico que será testado em diferentes plataformas de nova geração, visando tanto avaliar o potencial protetor da resposta direcionada aos epítomos utilizados, quanto comparar o perfil de resposta imune induzido por diferentes plataformas vacinais de nova geração baseada em multi-epítomos peptídicos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgueguen, P., V. Delbos, J. Blanvillain, J. M. Chennebault, J. Cottin, S. Fanello, and E. Pichard (2008), Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France, *J Infect*, 57(3), 171-178, doi: 10.1016/j.jinf.2008.06.010.
- Adler, B., and P. A. Moctezuma (2010), *Leptospira* and leptospirosis, 140(3-4), 287-296, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- Adler, B., A. M. Murphy, S. A. Locarnini, and S. Faine (1980), Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 11(5), 452-457, doi: 10.1128/jcm.11.5.452-457.1980.
- Ahmed, N., S. Devi, M. Valverde, P. Vijayachari, R. Machang'u, and W. A. Ellis (2011), Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species, 23(5), 28, doi: 10.1186/1476-0711-5-28.
- Almeida, M. A., et al. (2020), Immunoproteomics Reveals Pathogen's Antigens Involved in *Homo sapiens*-*Histoplasma capsulatum* Interaction and Specific Linear B-Cell Epitopes in Histoplasmosis, *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 591121.
- Amamura, T. A., T. R. Fraga, S. A. Vasconcellos, A. S. Barbosa, and L. Isaac (2017), Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition, *Front Microbiol*, 8, 958, doi: 10.3389/fmicb.2017.00958.
- Armstrong, P. B. (2006), Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction, *Immunobiology*, 211(4), 263-281, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.002>.
- Barbosa, A. S., P. A. Abreu, S. A. Vasconcellos, Z. M. Morais, A. P. Goncales, A. S. Silva, M. R. Daha, and L. Isaac (2009), Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP, *Infect Immun*, 77(3), 1137-1143, doi: 10.1128/IAI.01310-08.
- Bazhan, S. I., D. V. Antonets, L. I. Karpenko, S. F. Oreshkova, O. N. Kaplina, E. V. Starostina, S. G. Dudko, S. A. Fedotova, and A. A. Ilyichev (2019), In silico Designed Ebola Virus T-Cell Multi-Epitope DNA Vaccine Constructions Are Immunogenic in Mice, *Vaccines (Basel)*, 7(2), doi: 10.3390/vaccines7020034.
- Bharti, A. R., et al. (2003), Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance, *Lancet Infect Dis*, 3(12), 757-771, doi: 10.1016/s1473-3099(03)00830-2.
- BRASIL, M. D. S. (2014), *Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico*, edited by V. e. Saúde, Brasília.
- BRASIL, M. D. S. (2021), *Doenças tropicais negligenciadas*, Boletim Epidemiológico, Número especial.
- BRASIL, M. D. S. (2022a), *Leptospirose, Ceará*, Boletim Epidemiológico.
- BRASIL, M. D. S. (2022b), *Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 25 de 2022*, Boletim Epidemiológico.
- Budihal, S. V., and K. Perwez (2014), Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests, *J Clin Diagn Res*, 8(1), 199-202, doi: 10.7860/JCDR/2014/6593.3950.

- Caimia, K., and P. Ruybalb (2020), *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion, *Infection, Genetics and Evolution*, 81, 1567-1348.
- Campos, M. P., et al. (2018), *Leishmania infantum* Virulence Factor A2 Protein: Linear B-Cell Epitope Mapping and Identification of Three Main Linear B-Cell Epitopes in Vaccinated and Naturally Infected Dogs., *Front Immunol.*, 9, 1690.
- Carvalho, E. D. (2008), Análise das proteínas de *Leptospira* com possível papel hemolítico através de expressão recombinante: detecção de expressão nativa, atividade biológica e potencial vacinal, Universidade de São Paulo.
- Cerqueira, G. M., and M. Picardeau (2009), A century of *Leptospira* strain typing, *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), doi: <https://doi.org/10.1016/j.meeqid.2009.06.009>.
- Che, R., S. Ding, Q. Zhang, W. Yang, J. Yan, and X. Lin (2019), Haemolysin Sph2 of *Leptospira interrogans* induces cell apoptosis via intracellular reactive oxygen species elevation and mitochondrial membrane injury, *Cell Microbiol*, 21(1), e12959, doi: 10.1111/cmi.12959.
- Chung, M. C., T. G. Popova, B. A. Millis, D. V. Mukherjee, W. Zhou, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, V. Chandhoke, C. Bailey, and S. G. Popov (2006), Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors, *J Biol Chem*, 281, 31408–31418.
- Conte, F. P., et al. (2019), Identification and validation of specific B-cell epitopes of hantaviruses associated to hemorrhagic fever and renal syndrome., *PLoS Negl Trop Dis*, 13(12), e0007915.
- Costa, F., E. A. Wunder, D. Oliveira, V. Bisht, G. Rodrigues, Reis G. M, A. I. Ko, M. C. Begon, and J. E. hilds (2015), Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission, *PLoS Negl Trop Dis*, 9, 6, doi: 10.1371/journal.pntd.0003819.
- Coursin, D. B., S. J. Updike, and D. G. Maki (2000), Massive rhabdomyolysis and multiple organ dysfunction syndrome caused by leptospirosis, *Intensive Care Med*, 26(6), 808-812, doi: 10.1007/s001340051252.
- Da Silva, L. B., et al. (2018), *Leptospira interrogans* Secreted Proteases Degrade Extracellular Matrix and Plasma Proteins From the Host, *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 92, doi: 10.3389/fcimb.2018.00092.
- Daher, E. F., G. B. Silva, Jr., , R. S. Lima, R. M. Mota, H. A. Rocha, K. L. de Abreu, A. G. Barreto, E. D. Pereira, S. M. Araujo, and A. B. Liborio (2011), Different patterns in a cohort of patients with severe leptospirosis (Weil syndrome): effects of an educational program in an endemic area, *Am J Trop Med Hyg*, 85(3), 479-484, doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0080.
- Davila, X. A., E. Y. G. Olivera, B. N. Z. Vasquez, and F. Romani (2019), (Leptospirosis in patients with negative results for dengue, zika, and chikungunya in Jaen, Peru), *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 36(3), 535-536, doi: 10.17843/rpmesp.2019.363.4457.
- Dellagostin, O. A., A. A. Grassmann, C. Rizzi, R. A. Schuch, S. Jorge, T. L. Oliveira, A. J. McBride, and D. D. Hartwig (2017), Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying *Leptospiral* Vaccine Candidates, *Int J Mol Sci*, 18(1), doi: 10.3390/ijms18010158.
- Eshghi, A., E. Pappalardo, S. Hester, B. Thomas, G. Pretre, and M. Picardeau (2015), Pathogenic *Leptospira interrogans* exoproteins are primarily involved in heterotrophic processes, *Infect Immun*, 83(8), 3061-3073, doi: 10.1128/IAI.00427-15.

Evangelista, K. V., and J. Coburn (2010), *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses, *Future Microbiol*, 5(9), 1413-1425, doi: 10.2217/fmb.10.102.

Faine, S. (1959), Iron as a growth requirement for pathogenic *Leptospira*, *J Gen Microbiol* 20, 246-251.

Faine, S. (1970), Epidemiology, diagnosis and control of leptospirosis in man, *Bull Off Int Epizoot*, 73(1), 93-99.

Faine, S., B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat (1999), *Leptospira* and leptospirosis, 2 ed., Medisci Press, Melbourne.

Feodorova, V. A., et al., (2020), *Yersinia pestis* Antigen F1 but Not LcrV Induced Humoral and Cellular Immune Responses in Humans Immunized with Live Plague Vaccine- Comparison of Immunoinformatic and Immunological Approaches, *Vaccines (Basel)*, 8(4).

Fontes, S. S. e. a. (2021), Identification of immunogenic linear B-cell epitopes in *C. burnetii* outer membrane proteins using immunoinformatic approaches reveals potential targets of persistent infections., *Pathogens*, 10.

Fraga, T. R., S. dos Courrol, M. M. Castiblanco-Valencia, I. Y. Hirata, S. A. Vasconcellos, L. Juliano, A. S. Barbosa, and L. Isaac (2014), Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins., *J Infect Dis*, 209, 876–886.

Gamberini, M., R. M. Gómez, M. V. Atzingen, E. A. L. Martins, S. A. Vasconcellos, E. C. Romero, L. C. C. Leite, P. L. Ho, and A. L. T. O. Nascimento (2005), Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis, *FEMS Microbiol Lett*, 244(2), 305-313, doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.004.

Gausepohl, H., C. Boulin, M. Kraft, and R. W. Frank (1992), Automated multiple peptide synthesis, *Pept Res*, 5(6), 315-320.

Gonzalez, C. R., J. Casseb, F. G. Monteiro, J. B. Paula-Neto, R. B. Fernandez, M. V. Silva, and e. al. (1998), Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in Sao Paulo, Brazil. , *Ver Inst Med Trop São Paulo*

Haake, D. A., and P. N. Levett (2015), Leptospirosis in humans, *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 65-97, doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.

Hartskeerl, R. A., M. Collares-Pereira, and W. A. Ellis (2011), Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world, *Clin Microbiol Infect*, 17(4), 494-501, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x.

Henry, R. A., and R. C. Johnson (1978), Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water, *Applied and Environment Microbiology*, 35(3), 492-499, doi: 10.1128/aem.35.3.492-499.1978.

Hovind-Hougen, K. (1979), *Leptospiraceae*, a New Family to Include *Leptospira Noguchi* 1917 and *Leptonema* gen. nov., *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 29(3), 6, doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-29-3-245>.

Inada, R., R. Hoki, and R. Kaneko (1916), The etiology, mode of infection, and specific therapy of well's disease (*spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *Journal of Experimental Medicine*, 23(3), 377-402, doi: <https://doi.org/10.1084/jem.23.3.377>.

- Isaac, A. S. B. L. (2020), Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system, *FEBS LETTERS*, 594, 2633–2644.
- Jin, F., O. Matsushita, S. Katayama, S. Jin, C. Matsushita, J. Minami, and A. Okabe (1996), Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease, *Infect Immun*, 64(1), 230-237, doi: 10.1128/iai.64.1.230-237.1996.
- Johnson, R. C., and P. Rogers (1964), Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. , *Journal Of Bacteriology*88(6), 1618-1623
- Kalita, P., e Tripathi, T. (2022), Methodological advances in the design of peptide-based vaccines, *Drug Discov Today*, 27(5), 1367-1380, doi: 10.1016/j.drudis.2022.03.004.
- Kalkanli, T. S., D. Kirkik, K. Öztürk, and A. Tanoglu (2020), Determination of B- and T- cell epitopes for *Helicobacter pylori* cagPAI: An in silico approach., *Turk J Gastroenterol*, 31(10), 713-720.
- Kardani, K., A. Hashemi, and A. Bolhassani (2020), Comparative analysis of two HIV-1 multiepitope polypeptides for stimulation of immune responses in BALB/c mice, *Mol Immunol*, 119, 106-122, doi: 10.1016/j.molimm.2020.01.013.
- Kasarov, L. B. (1970), Degradation of the erythrocyte phospholipids and haemolysis of the erythrocytes of different animal species by leptospirae., *J Med Microbiol*, 3, 29-37.
- Katz, A. R., P. V. Effler, and V. E. Ansdell (2003), Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii, 1979-1998, *Trop Med Int Health*, 8(7), 639-642, doi: 10.1046/j.1365-3156.2003.01071.x.
- Kaur, R., N. Arora, M. A. Jamakhani, S. Malik, P. Kumar, F. Anjum, S. Tripathi, A. Mishra, and A. Prasad (2020), Development of multi-epitope chimeric vaccine against *Taenia solium* by exploring its proteome: an in silico approach, *Expert Rev Vaccines*, 19(1), 105-114, doi: 10.1080/14760584.2019.1711057.
- Ko, A. I., C. Goarant, and M. Picardeau (2009), *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen, *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 736-747, doi: 10.1038/nrmicro2208.
- Koizumi, N., M. Muto, T. Tanikawa, H. Mizutani, Y. Sohmura, E. Hayashi, N. Akao, M. Hoshino, H. Kawabata, and H. Watanabe (2009), Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan, *J Med Microbiol*, 58(Pt 9), 1227-1230, doi: 10.1099/jmm.0.011528-0.
- Levett, P. N. (2001), Leptospirosis, *Clin Microbiol Rev*, 14(2), 296-326, doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- Levett, P. N. (2015), Systematics of Leptospiraceae, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 11-20, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2.
- Levett, P. N., and D. A. Haake (2010), *Leptospira* species (leptospirosis). Principles and practice of infectious diseases., Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.
- Louvel, H., S. Bommezzadri, N. Zidane, and e. al (2006), Comparativeand functional genomic analyses of iron transport and regulationin *Leptospira* spp, *J Bacteriol*, 188, 7893–7904.

Luu, T., S. Pham, and S. Deshpande (1996), Automated multiple peptide synthesis: improvements in obtaining quality peptides, *Int J Pept Protein Res*, 47(1-2), 91-97, doi: 10.1111/j.1399-3011.1996.tb00814.x.

MAPA (2016), Plano mais pecuária/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, edited.

Matos, A. D. S., et al., (2019), Antibody Responses Against Plasmodium vivax TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon., *Front Immunol.*, 10, 2230.

Matsunaga, J., M. A. Medeiros, Y. Sanchez, K. F. Werneid, and A. I. Ko (2007), Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release, *Microbiology (Reading)*, 153(Pt 10), 3390-3398, doi: 10.1099/mic.0.2007/007948-0.

McBride, A. J., D. A. Athanazio, M. G. Reis, and A. I. Ko (2005), Leptospirosis, *Curr Opin Infect Dis*, 18(5), 376-386, doi: 10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c.

McClain, J. B., W. R. Ballou, S. M. Harrison, and D. L. Steinweg (1984), Doxycycline therapy for leptospirosis, *Ann Intern Med*, 100(5), 696-698, doi: 10.7326/0003-4819-100-5-696.

Meri, T., R. Murgia, P. Stefanel, S. Meri, and M. Cinco (2005), Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires, *Microb Pathog*, 39(4), 139-147, doi: 10.1016/j.micpath.2005.07.003.

Miyoshi, S. (2013), Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic vibrio species, *Front Microbiol*, 4, 339, doi: 10.3389/fmicb.2013.00339.

Moeini, H., et al. (2021), Linear B-Cell Epitopes in Human Norovirus GII.4 Capsid Protein Elicit Blockade Antibodies, *Vaccines (Basel)*, 9(1).

Morgan, J., S. L. Bornstein, A. M. Karpati, M. Bruce, C. A. Bolin, C. C. Austin, C. W. Woods, J. Lingappa, and e. al. (2002), Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998., *Clin Infect Dis*, 34, 1593–1599.

Narayanavari, S. A., N. M. Kishore, and M. Sritharan (2012), Structural analysis of the *Leptospira* sphingomyelinases: in silico and experimental evaluation of Sph2 as an Mg-dependent sphingomyelinase, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 22(1), 24-34, doi: 10.1159/000337013.

Narayanavari, S. A., M. Sritharan, D. A. Haake, and J. Matsunaga (2015), Role of sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by *Leptospira interrogans*, *PLoS Negl Trop Dis*, 9(8), e0003952, doi: 10.1371/journal.pntd.0003952.

Nascimento, A. L., et al. (2004), Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis, *J Bacteriol*, 186(7), 2164-2172, doi: 10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004.

Naz, A., F. Shahid, T. T. Butt, F. M. Awan, A. Ali, and A. Malik (2020), Designing Multi-Epitope Vaccines to Combat Emerging Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) by Employing Immuno-Informatics Approach, *Front Immunol*, 11, 1663, doi: 10.3389/fimmu.2020.01663.

Noguchi, H., H. R. Muller, O. Torres, F. Silva, H. Martins, A. R. Santos, G. Vianna, and M. Bião (1924), Experimental studie in yellow fever in nothern Brazil, *Rockefeller Institute for Medical Research* 83(11), 820-823.

- Palaniappan, R. U., S. P. McDonough, T. J. Divers, C. S. Chen, M. J. Pan, M. Matsumoto, and Y. F. Chang (2006), Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection, *Infect Immun*, 74(3), 1745-1750, doi: 10.1128/IAI.74.3.1745-1750.2006.
- Pandey, R. K., M. Ali, R. Ojha, T. K. Bhatt, and V. K. Prajapati (2018), Development of multi-epitope driven subunit vaccine in secretory and membrane protein of *Plasmodium falciparum* to convey protection against malaria infection, *Vaccine*, 36(30), 4555-4565, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.082.
- Picardeau, M. (2013), Diagnosis and epidemiology of leptospirosis, *Med Mal Infect*, 43(1), 1-9, doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.
- Rappuoli, R. (2000), Reverse vaccinology, *Current Opinion in Microbiology*, 3(5), 445-450, doi: 10.1016/S1369-5274(00)00119-3.
- Rappuoli, R., M. Pizza, V. Masignani, and K. Vadivelu (2018), Meningococcal B vaccine (4CMenB): the journey from research to real world experience, *Expert Rev Vaccines*, 17(12), 1111-1121, doi: 10.1080/14760584.2018.1547637.
- Rappuoli, R., M. J. Bottomley, U. D'Oro, O. Finco, and E. De Gregorio (2016), Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design, *J Exp Med*, 213(4), 469-481, doi: 10.1084/jem.20151960.
- Reis, R. B., et al. (2008), Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums, *PLoS Negl Trop Dis*, 2(4), e228, doi: 10.1371/journal.pntd.0000228.
- Salarpour, A., et al. (2020), In silico prediction of linear B-cell epitopes for S1 protein of two Iranian 793/B isolates and their changes after 90 serial passaging, *Vet. Res. Forum*, 11(4).
- Sehgal, S. C., A. P. Sugunan, M. V. Murhekar, S. Sharma, and P. Vijayachari (2000), Randomised controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. , *Int J Antimicrob Agents*
- Sejvar, J., E. Bancroft, K. Winthrop, J. Bettinger, M. Bajani, S. Bragg, K. Shutt, R. Kaiser, and e. al. (2003), Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000., *Emerg Infect Dis*, 9, 702-707.
- Serruto, D., M. J. Bottomley, S. Ram, M. M. Giuliani, and R. Rappuoli (2012), The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens, *Vaccine*, 30 Suppl 2, B87-97, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.033.
- Shah, P., J. Mistry, P. A. Reche, D. Gatherer, and D. R. Flower (2018), In silico design of *Mycobacterium tuberculosis* epitope ensemble vaccines, *Mol Immunol*, 97, 56-62, doi: 10.1016/j.molimm.2018.03.007.
- Sianez-Estrada, L. I., et al. (2020), Immunoinformatics approach for predicting epitopes in HN and F proteins of Porcine rubulavirus, *PLoS One*, 15(9).
- Socolovschi, C., E. Angelakis, A. Renvoise, P. E. Fournier, J. L. Marie, B. Davoust, A. Stein, and D. Raoult (2011), Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France, *Int J Infect Dis*, 15(10), e710-715, doi: 10.1016/j.ijid.2011.05.017.
- Stimson, A. M. (1907), Note on an organism found in yellow-fever tissue. , *Public Health Reports*, 22(18), 541, doi: <https://doi.org/10.2307/4559008>.

- Takafuji, E. T., J. W. Kirkpatrick, R. N. Miller, J. J. Karwacki, P. W. Kelley, M. R. Gray, and e. al. (1984), An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. , N Engl J Med.
- Teichmann, D., K. Gobels, J. Simon, M. P. Grobusch, and N. Suttorp (2001), A severe case of leptospirosis acquired during an iron man contest, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 20(2), 137-138, doi: 10.1007/s100960000433.
- Vale, T. C., G. C. Santos, S. F. Saturnino, A. S. Antunes Neto, F. F. Amancio, M. A. Oliveira, B. F. Fernandes, R. S. Gomez, M. V. Andrade, and A. L. Teixeira (2014), Weil syndrome: a rare cause of cerebral venous thrombosis, JAMA Neurol, 71(2), 238-239, doi: 10.1001/jamaneurol.2013.2175.
- Vincent, A. T., et al. (2019), Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics, PLoS Negl Trop Dis, 13(5), e0007270, doi: 10.1371/journal.pntd.0007270.
- Vinetz, J. M. (2001), Leptospirosis, Curr Opin Infect Dis, 14(5), 527-538, doi: 10.1097/00001432-200110000-00005.
- Watt, G., L. P. Padre, M. L. Tuazon, C. Calubaquib, E. Santiago, C. P. Ranoa, and L. W. Laughlin (1988), Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis, Lancet, 1(8583), 433-435, doi: 10.1016/s0140-6736(88)91230-5.
- Weil, A. (1886), Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit., Archiv für klinische Medizin, 39, 209-232.
- WHO., W. H. O. (2003), HUMAN LEPTOSPIROSIS: GUIDANCE FOR DIAGNOSIS, SURVEILLANCE AND CONTROL.
- Wolbach, S. B., and C. A. Binger (1914), Notes on a filterable Spirochete from fresh Water. *Spirocheta biflexa* (new Species), Journal of Medical Research, 30(1), 23-26
- Wolgemuth, C. W., N. W. Charon, S. E. Goldstein, and R. E. Goldstein (2006), The flagellar cytoskeleton of the spirochetes, Journal of Molecular Microbiology, 11.
- Xu, Y., and Q. Ye (2018), Human leptospirosis vaccines in China, Hum Vaccin Immunother, 14(4), 984-993, doi: 10.1080/21645515.2017.1405884.
- Yang, H. L., et. al. (2006), In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*, BMC Genomics, 7, 293, doi: 10.1186/1471-2164-7-293.
- Zargaran, F. N., et al., (2020), B Cell Epitopes of Four Fimbriae Antigens of *Klebsiella pneumoniae*: A Comprehensive In Silico Study for Vaccine Development., Int J Pept Res Ther, 1-12.
- Zhang, Y., X., , Y. Geng, J. W. Yang, and e. al (2008), Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai, BMB Rep, 49, 119-125.