

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Avanços no estabelecimento de bases para o desenvolvimento de vacinas
recombinantes contra a leptospirose**

Liana Nunes Barbosa

Pelotas, 2021

Liana Nunes Barbosa

**Avanços no estabelecimento de bases para o desenvolvimento de vacinas
recombinantes contra a leptospirose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia)

Orientador: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B238a Barbosa, Liana Nunes

Avanços no estabelecimento de bases para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose / Liana Nunes Barbosa ; Alan John Alexander McBride, orientador. — Pelotas, 2021.

188 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. *Leptospira*. 2. Crescimento *in vitro*. 3. Virulência. 4. Candidatos vacinais. I. McBride, Alan John Alexander, orient. II. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Liana Nunes Barbosa

Avanços no estabelecimento de bases para o desenvolvimento de vacinas
recombinantes contra a leptospirose

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento
Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de Novembro de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Orientador), Doutor em Bioquímica e Biologia
Molecular Aplicada pela Universidade de Manchester (Reino Unido).

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto, Doutor em Ciências pela Universidade Federal de
Pelotas (Brasil).

Dr. André Alex Grassmann, Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas
(Brasil).

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Doutor em Ciências Veterinárias pela
Universidade de Wisconsin (Estados Unidos).

Profa. Dra. Thaís Larré Oliveira, Doutora em Ciências pela Universidade Federal de
Pelotas (Brasil).

A minha família e amigos, com amor e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer o meu orientador Prof. Alan McBride pelos ensinamentos, apoio e amizade durante esses 8 anos que fiz parte do LPDI. Obrigado Alan, ter sido tua orientada me fez crescer muito profissionalmente.

Aos queridos estagiários e amigos que incansavelmente me ajudaram durante esse processo. Em especial André, Jéssica, Guilherme, Elias, Vítor e Alice. Vocês foram indispensáveis na minha Pós-Graduação, e ao lado de vocês foi tudo mais fácil e divertido.

Aos queridos profissionais do Biotério Central da UFPel, pela disponibilização dos animais utilizados nesse trabalho, e pela parceria durante os experimentos.

Aos queridos colegas e professores da Biotecnologia, pelos anos de ensinamentos, parceria, ajuda e suporte nos momentos de dificuldades. Aqui estendo o agradecimento a secretária Daiane e ao Amilton, sempre dispostos a ajudar em qualquer processo.

Aos meus amigos e familiares, a ajuda de vocês foi muito importante e trouxe leveza durante esse período. Vocês são essenciais na minha vida, obrigado gurizada.

Aos meus pais Eliane e Antônio, por toda força e apoio. Tudo isso é por vocês.

À minha irmã Bárbara, que é uma das pessoas que mais acredita no meu potencial. Obrigado por tudo mana.

Aos meus avós Clovani, Rosa Maria, Jozino (*in memoriam*) e Maria (*in memoriam*), que sempre deram apoio financeiro e emocional na vida acadêmica.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERGS, CNPq e Royal Society pelas bolsas e financiamentos nos projetos desenvolvidos.

Obrigado de coração a todos que fizeram parte deste processo.

Com carinho,

Liana.

*There is grandeur in this view of life, with its several powers,
having been originally breathed into a few forms or into one; and
that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed
law of gravity, from so simple a beginning endless forms most
beautiful and wonderful have been, and are being, evolved.*

Charles Darwin

Resumo

BARBOSA, Liana Nunes. **Avanços no estabelecimento de bases para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose.** Orientador: Alan John Alexander McBride. 2021. 188f. Tese (Doutorado em Ciências, ênfase em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A leptospirose é uma zoonose de incidência mundial causada por leptospirosas patogênicas. O crescimento *in vitro* de espécies patogênicas de *Leptospira* permanece difícil e pode ser um processo demorado. Uma importante contribuição para a microbiologia do gênero *Leptospira* foi o desenvolvimento do meio de cultura EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), que possibilitou o cultivo de diversas cepas fastidiosas e tornou-se um meio amplamente utilizado na área. Entretanto, o conhecimento acerca da influência do crescimento *in vitro* na virulência leptospiral é limitado, o que pode resultar em culturas bacterianas com virulência alterada e influenciar os testes com vacinas candidatas. Vacinas recombinantes têm sido estudadas como uma alternativa promissora para o controle da leptospirose, porém poucos antígenos apresentaram o potencial para compor uma vacina universal contra a doença. Novas abordagens na fase de descoberta, incluindo a vacinologia reversa (RV) e estrutural (SV), imunoprecipitação de superfície celular (CSIP) e o uso de leptospirosas ao hospedeiro têm sido utilizadas para identificar novas proteínas. Essas abordagens identificaram antígenos diferencialmente expressos com potencial imunogênico e que preditos como expostos na superfície celular. Esta tese apresenta quatro manuscritos sobre os desafios enfrentados nos estudos com vacinas recombinantes contra a leptospirose. Uma revisão de literatura publicada destacando esses tópicos na pesquisa de uma vacina recombinante para humanos também está incluída. O cultivo *in vitro* das cepas patogênicas de *L. interrogans* Fiocruz L1-130 e RCA e de *L. kirschneri* 61H foi utilizado para comparar duas composições diferentes de meio EMJH (comercial e caseiro), a 28°C e 37°C, usando três frascos diferentes. Posteriormente, o impacto das condições de crescimento *in vitro* foi avaliado da dose letal para 50% (DL₅₀) no modelo hamster de leptospirose. Ambos os meios IHM e EMJH, incubados a 28°C, em tubos estáticos, proporcionaram as melhores condições de crescimento. Para o isolamento de leptospirosas de amostras clínicas, o meio IHM ofereceu uma melhoria significativa em comparação com o meio EMJH. O inóculo inicial mais baixo em IHM foi de uma leptospira em comparação com 1000 leptospirosas para o meio EMJH, quando cultivadas nas seguintes condições: 28°C e tubos estáticos. Leptospirosas em fase de crescimento exponencial (inicial, intermediário e tardio) foram altamente virulentas (a DL₅₀ variou de uma a 13 leptospirosas). Enquanto a virulência das leptospirosas em fase estacionária foi significativamente reduzida em >250 vezes (DL₅₀ >1000 leptospirosas). Esses resultados nos permitiram desenvolver um protocolo otimizado para o cultivo *in vitro* de leptospirosas virulentas. A cepa Fiocruz L1-130 foi utilizada para produzir leptospirosas adaptadas ao hospedeiro pela técnica de DMC, seguida por CSIP (utilizando anticorpos em soros humanos de pacientes convalescentes com leptospirose) para identificar novas proteínas leptospirais. CSIP identificou 24 proteínas imunogênicas que foram preditas como localizadas na membrana externa de leptospirosas. Destas, o potencial imunogênico das LICs 10496, 10881, 11086 foi avaliado no modelo de hamster de leptospirose aguda. Os alvos vacinais foram imunogênicos por *western blot*, no entanto, eles não induziram

respostas imunes protetoras contra a leptospirose. Em resumo, os resultados obtidos representam avanços na busca de vacinas recombinantes contra a leptospirose e devem contribuir para a avaliação de vacinas candidatas em modelos animais de leptospirose. Isso permite a comparação de resultados de diferentes laboratórios de pesquisa, uma grande limitação no momento.

Palavras-chave: *Leptospira*. Crescimento *in vitro*. Virulência. Candidatos vacinais.

Abstract

BARBOSA, Liana Nunes. **Advances in establishing bases for the development of recombinant vaccines against leptospirosis**. Advisor: Alan John Alexander McBride. 2021. 188p. Thesis (PhD in Sciences, emphasis in Biotechnology) – Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Leptospirosis is a zoonosis with worldwide incidence that is caused by pathogenic leptospires. The *in vitro* growth of pathogenic *Leptospira* spp. remains difficult and can be a time-consuming process. An important contribution to the microbiology of the genus *Leptospira* was the development of the EMJH culture medium (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), which enabled the cultivation of several fastidious strains and became a widely used medium in the field. However, knowledge of the influence of *in vitro* growth on leptospiral virulence is limited, resulting in altered virulence that can negatively influence the evaluation of vaccine candidates. Recombinant vaccines have been studied as promising alternatives for the control of leptospirosis, however only a few antigens have shown potential as universal vaccine candidates. New approaches in the discovery phase, including reverse vaccinology (RV) and structural vaccinology (SV), cell surface immunoprecipitation (CSIP) and the use of host-adapted leptospires have been used to identify novel proteins. These approaches identified differentially expressed antigens with immunogenic potential, and which were predicted to be exposed on the cell surface. This thesis includes four manuscripts on the challenges faced in studies using recombinant vaccines against leptospirosis. A published literature review highlighting these topics in the research for a human recombinant vaccine is also included. The *in vitro* cultivation of *L. interrogans* pathogenic strains Fiocruz L1-130 and RCA and the *L. kirschneri* 61H strain was used to compare two different EMJH compositions (commercial and in-house), at 28°C and 37°C, using three different flasks. Subsequently, the impact of *in vitro* growth conditions on virulence was evaluated via the 50% lethal dose (LD₅₀) in the hamster model of leptospirosis. Both the IHM and commercial EMJH media, incubated at 28°C, in static tubes provided the best growth conditions. For the isolation of leptospires from clinical samples, the IHM offered a significant improvement compared to commercial EMJH. The lowest initial inoculum for IHM was one leptospira compared to 1000 leptospires for commercial EMJH when grown under the following conditions: 28°C and static tubes. Leptospires in the exponential growth phase (early, mid and late) were highly virulent (LD₅₀ ranged from one to 13 leptospires). While the virulence of leptospires in the stationary phase was significantly reduced by >250 fold (LD₅₀ >1000 leptospires). These results allowed us to develop an optimized protocol for the *in vitro* cultivation of virulent leptospires.. The Fiocruz L1-130 strain was used to produce host-adapted leptospires by the DMC technique followed by CSIP (using antibodies in human sera from convalescent leptospirosis patients) to identify novel leptospiral proteins. CSIP identified 24 immunogenic proteins that were predicted to be localized on the leptospiral outer membrane. Of these, the immunoprotective potential of LICs 10496, 10881 and 11086 were evaluated in the hamster model of acute leptospirosis. The vaccine targets were immunogenic by Western blotting, however they did not induce protective immune responses against leptospirosis. In summary, the results obtained represent advances in the search for recombinant vaccines against leptospirosis and should contribute towards the evaluation of vaccine candidates in

animal models of leptospirosis. Permitting the comparison of results from different research laboratories, a major limitation at present.

Keywords: *Leptospira*. *In vitro* growth. Virulence. Vaccine candidates.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	12
2 Revisão bibliográfica.....	14
2.1 Epidemiologia.....	14
2.2 Fatores de risco relacionados à leptospirose.....	15
2.3 O gênero <i>Leptospira</i>	17
2.4 O metabolismo e o cultivo <i>in vitro</i> de leptospiros.....	20
2.5 Fatores de virulência em leptospiros.....	23
2.6 Resposta imune.....	26
2.7 Prevenção.....	29
2.8 Novas abordagens na seleção de alvos vacinais para vacinas recombinantes.....	33
3 Objetivos.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 Capítulos.....	38
4.1 Artigo publicado - An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives.....	38
4.2 Manuscrito 1 - <i>In vitro</i> culture conditions affect virulence of pathogenic <i>Leptospira</i> spp. in the hamster model of acute leptospirosis....	50
4.3 Manuscrito 2 - Host-adapted <i>Leptospira interrogans</i> immunoreactive proteins as immunodiagnostic and vaccine candidates identified by cell surface immunoprecipitation.....	98
4.4 Manuscrito 3 - Potencial imunoprotetor de novos antígenos vacinais de membrana externa identificados por vacinologia reversa e estrutural e imunoproteômica em leptospiros adaptadas ao hospedeiro.....	124
5 Conclusões gerais.....	167
6 Referências.....	168
7 Anexos.....	180
7.1 Anexo A - Depósito de Patente das proteínas recombinantes identificadas por Vacinologia reversa e Estrutural e Imunoproteômica.....	180

7.2 Anexo B - Parecer do Comitê de Ética e Experimentação Animal para o projeto de Microbiologia básica, gerando o manuscrito 1.....	187
7.3 Anexo C - Parecer do Comitê de Ética e Experimentação Animal para o projeto de Vacinologia reversa e Estrutural e imunoproteômica, gerando o manuscrito 2 e 3.....	188

1. Introdução geral

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, em especial em regiões tropicais e países em desenvolvimento (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU *et al*, 2014). As espécies patogênicas do gênero *Leptospira* são as responsáveis pela infecção (AHMED *et al*, 2006), sendo capazes de infectar uma gama de hospedeiros e também de sobreviver no meio ambiente por longos períodos (ADLER, 2015). A transmissão da doença está associada ao contato, direto ou indireto, de hospedeiros suscetíveis com a urina e tecidos de animais reservatórios infectados, ou com água, solo, lama e alimentos contaminados por leptospiros. Humanos são hospedeiros acidentais (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA 2010; ADLER, 2015; PICARDEAU, 2017; THIBEAUX *et al*, 2018; GUGLIELMINI *et al*, 2019; CAIMI E RUYBAL, 2020), onde a doença pode se apresentar de forma leve, e evoluir para formas graves como a Síndrome de Weil (LEVETT, 2001; BHARTI *et al*, 2003) caracterizada por hemorragias, icterícia, insuficiência renal aguda (YANG *et al*, 2001; KO *et al*, 2009) e também a síndrome hemorrágica pulmonar grave (CRODA, 2008; KO *et al*, 2009; HAAKE E LEVETT, 2015).

Vacinas contra a leptospirose são o foco das pesquisas devido à falta de medidas de controle efetivas implementadas. Diversas vacinas recombinantes compostas por antígenos de membrana externa já foram avaliadas, revisadas em Dellagostin *et al* (2011) e Félix *et al* (2020), entretanto, nenhum alvo apresentou todas as características necessárias para compor uma vacina universal contra a doença. Um conjunto de problemas são associados a ineficácia das vacinas, como aspectos da biologia básica de leptospiros que ainda são desconhecidos, além de fatores *in vitro* que influenciam a virulência bacteriana. Da mesma forma, o isolamento de novas cepas ambientais e de hospedeiros é um passo importante para entender aspectos como a distribuição das espécies nos hospedeiros e os contextos ambientais (CAIMI E RUYBAL, 2020). Nesse contexto, o uso de um meio adequado para o cultivo de leptospiros a partir de amostras biológicas, é uma ferramenta valiosa para aprimorar as técnicas e elucidar aspectos da microbiologia que são essenciais para a evolução dos estudos na área.

Outro problema importante é que poucos fatores de patogenicidade e virulência são conhecidos, impedindo um delineamento de estratégias vacinais mais racionais. Um conjunto de proteínas codificadas no genoma de *L. interrogans* são

anotadas como hipotéticas e sem função caracterizada, incluindo possíveis proteínas de membrana externa que desempenham funções relacionadas à virulência em leptospiros (MURRAY, 2015). Além disso, a resposta imune induzida por leptospiros e antígenos recombinantes é pouco investigada em estudos de imunoproteção, em função do modelo hamster utilizado (ZUERNER, 2015). A partir dessas informações, é evidente a necessidade da identificação de novos alvos vacinais. As abordagens como a vacinologia reversa (VR, do inglês *Reverse Vaccinology*) e estrutural (SV, do inglês *Structural Vaccinology*) (GRASSMANN *et al*, 2017; LESSA-AQUINO *et al*, 2017; ZENG *et al*, 2017; DHANDAPANI *et al*, 2018), bioinformática (LATA *et al*, 2018; VALIDI *et al*, 2018; NAZIFI *et al*, 2018), obtenção de leptospiros adaptadas ao hospedeiro (CAIMANO *et al*, 2014; GRASSMANN *et al*, 2015; NALLY *et al*, 2017) e imunoprecipitação de superfície celular (NEWCOMBE *et al*, 2014; CUNHA *et al*, 2017) foram aplicadas na identificação de novos alvos vacinais de membrana externa. Esses alvos vacinais, selecionados em abordagens racionais, são candidatos promissores para testes com vacinas recombinantes.

Nesta tese são apresentados quatro artigos relacionados aos problemas encontrados no campo da vacinologia para a leptospirose. Uma revisão de literatura publicada na revista *Expert Opinion on Drug Discovery* trazendo o estado da arte de vacinas recombinantes para humanos contra a leptospirose é apresentada, com os principais problemas e possíveis soluções relacionados ao tema. O cultivo *in vitro* utilizando o meio de cultura EMJH (ELLINGHAUSEN E MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON E HARRIS, 1967) foi otimizado e a sua influência na virulência bacteriana foi determinada. Isso garantirá a consistência dos experimentos envolvendo a virulência das espécies patogênicas e auxiliará na reprodutibilidade dos experimentos de vacinologia. Em um experimento piloto, foram obtidas leptospiros adaptadas ao hospedeiro pela técnica de DMC (do inglês, *Dialysis Membrane Chamber*) e a seleção de antígenos imunogênicos expressos no hospedeiro pela técnica de CSIP (do inglês, *Cell Surface Immunoprecipitation*) utilizando soros humanos convalescentes. Foram identificados diversos alvos que possuem o potencial para testes em vacinas recombinantes. Por fim, o último artigo desta tese apresentou o potencial imunoprotetor dos antígenos LIC10496, LIC10881, LIC11086 e de uma quimera contendo regiões expostas a membrana externa das proteínas LIC10496 e LIC10881, identificados pela abordagem acima no modelo hamster de leptospirose letal aguda.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, presente em todos os continentes, em especial nos países tropicais (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU *et al*, 2014; NAING *et al*, 2019). Esta doença é considerada a zoonose mais difundida mundialmente, com estimativa superior a 1 milhão de novos casos em humanos ao ano, e aproximadamente 6% dessas infecções resultando em óbitos (COSTA, HAGAN *et al*, 2015). No Brasil, entre os anos de 2007 e 2017, foram confirmados 42.310 casos de leptospirose, com as regiões norte e sul apresentando as maiores taxas de prevalência no país (MARTELI *et al*, 2020).

A carga global da doença é comparável, e muitas vezes maior, que outras doenças tropicais negligenciadas como dengue e leishmaniose (PICARDEAU, 2017, CDC, 2020). Entretanto, apesar do seu impacto na saúde pública e caráter emergente, a leptospirose não está presente na lista de doenças infecciosas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Uma vez que não existem ferramentas disponíveis para a rápida detecção da doença, ou capazes de prevenir a infecção pela administração de tratamentos seguros/efetivos em massa como vacinas, a leptospirose é considerada uma doença infecciosa *“tool deficient”*. Esse *status* a define como não sendo uma prioridade para as iniciativas de saúde governamentais, e conseqüentemente, o destino de investimentos em pesquisas que resultariam em uma maior visibilidade da doença (OMS, 2011; PEREIRA *et al*, 2018; GOARANT *et al*, 2019).

Dados epidemiológicos mundiais demonstram a complexidade dos ciclos de transmissão da leptospirose, que envolvem uma gama de hospedeiros carreadores, várias espécies e sorovares, além de diferentes fatores ambientais que desafiam o controle efetivo da infecção (PEREIRA *et al*, 2018). Entretanto, os dados disponíveis são bastante limitados, e conseqüentemente, resulta em poucas informações sobre cepas circulantes que seriam essenciais para compreender melhor o cenário epidemiológico, desenvolver novas vacinas e avaliar testes diagnósticos para a doença (PICARDEAU, 2013). Apesar dos esforços, o peso global da leptospirose ainda é amplamente subestimado por vários motivos, incluindo o fato de que a grande maioria dos países não possui sistema de notificação ou este não é obrigatório (HAAKE E LEVETT, 2015). Da mesma forma, questões como a propagação e

aumento de casos da doença permanecem desconhecidas, uma vez que a qualidade e disponibilidade do diagnóstico, instalações para a testagem e sistemas de vigilância são altamente variáveis e muitas vezes ausentes (HARTSKEERL *et al*, 2011).

Mesmo sendo uma doença infecciosa subestimada, as estimativas atuais apontam que aproximadamente 2,9 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs, do inglês *Disability-Adjusted Life Years*) são perdidos ao ano mundialmente por leptospirose, com 80% desse impacto representado por homens, em especial com idades entre 20-49 anos (TORGERSON *et al*, 2015). Isso reflete, principalmente, o impacto da leptospirose na capacidade produtiva econômica global, apresentando uma magnitude de DALYs semelhante a doenças como esquistossomose, leishmaniose, filariose linfática e cólera (TORGERSON *et al*, 2015). Além disso, a morbidade e impacto na saúde de animais de criação ocasionados pela infecção resultam em grandes perdas econômicas na pecuária, entretanto, não se tem estudos suficientes que quantifiquem esses custos apropriadamente (PEREIRA *et al*, 2018). Em consequência da alta interação entre humanos e animais, além da invasão de ambientes naturais, a leptospirose é uma infecção emergente de importância para a saúde pública global (PAL, 2021). Dessa forma, a doença pode ser considerada o maior problema de saúde pública em alguns países, especialmente na América Latina e sudeste da Ásia (PICARDEAU, 2013).

2.2 Fatores de risco relacionados à leptospirose

A leptospirose é uma das doenças infecciosas de maior ocorrência especialmente porque é de difícil diagnóstico e prevenção (PUTZ *et al*, 2020). A incidência da doença é maior em regiões tropicais, devido ao aumento de estações chuvosas e a ocorrência de enchentes sazonais. Além disso, a sobrevivência de leptospiros nos ambientes úmidos potencializa o risco de exposição para os animais suscetíveis (HAAKE *et al*, 2002; BHARTI *et al*, 2003). O aumento significativo no número de casos de leptospirose após períodos de enchentes está associado, principalmente, à três fatores: i) sexo masculino, provavelmente como resultado de práticas diárias e exposição ocupacional; ii) exposição à animais de criação, e iii) a presença de cortes ou abrasões na pele e membranas mucosas (NAING *et al*, 2019).

O aumento da migração de populações rurais pobres para comunidades urbanas desfavorecidas (favelas) em países em desenvolvimento, tornou a leptospirose um problema de saúde pública em crescimento (GOARANT *et al*, 2019;

HAGAN *et al*, 2016). Além disso, o número de casos em humanos cresce a cada ano, e isso pode ser explicado também pela invasão dos habitats silvestres em resultado do aumento da população, potencializando a interação com outros animais e a exposição a diferentes cepas de leptospiros (PINTO *et al*, 2017). Em países desenvolvidos a doença está relacionada a viagens turísticas, prática de esportes e atividades recreativas em regiões de incidência da infecção (MCBRIDE *et al*, 2005; ADLER 2015). Já nas populações rurais, a agricultura e produção animal são práticas de risco para os trabalhadores expostos aos ambientes contaminados (ADLER AND DE LA PENA MOCTEZUMA 2010). Os indivíduos que possuem ocupações de risco incluem veterinários e profissionais que tenham contato direto com os animais infectados, além dos riscos associados ao trabalho ao ar livre, como exercícios militares e agricultura em regiões tropicais de alta precipitação, sendo este último, o mais importante numericamente (HARTSKEERL *et al*, 2011; HAAKE E LEVETT, 2015).

As espécies patogênicas são generalistas na natureza, o que reflete na colonização dos rins de muitos hospedeiros reservatórios selvagens e domésticos, especialmente roedores, pequenos marsupiais, bovinos, suínos e caninos (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Quase todos os mamíferos, incluindo os aquáticos e marsupiais, são hospedeiros de leptospiros (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009; EVANGELISTA E COBURN, 2010). O principal reservatório para a bactéria são os roedores, que apresentam a infecção de forma crônica e assintomática, excretando leptospiros ao ambiente por longos períodos através da urina uma vez dada a colonização dos túbulos renais desses animais (PICARDEAU, 2013). Ratos são animais sociáveis, e o contato individual dentro dos grupos de roedores pode facilitar a transmissão da doença na colônia (PUTZ *et al*, 2020). Roedores resistentes aos raticidas (anticoagulantes de primeira geração), carreando leptospiros são um fator de risco para animais de produção e subsequente exposição a humanos (MARQUEZ *et al*, 2019). Alguns fatores de risco para infecções em bovinos, caprinos e ovinos no nordeste do Brasil são sistemas intensivos de manejo, instalações de madeira suspensas, rebanhos de mais de 20 animais agrupados, pastejo, ausência de tratamento veterinário e desverminação, e o uso de fontes de água naturais como açudes e riachos (CAMPOS *et al*, 2017). A exposição de rações bovinas a roedores e o acesso de cães aos pastejos, são fatores de risco comprovados para a infecção em bovinos no sul do Brasil (FÁVERO *et al*, 2019).

Os cães são reconhecidos como hospedeiros crônicos do sorogrupo *Canicola*, sendo especialmente importantes pela disseminação desse sorogrupo no ambiente e um risco para a população humana em contato direto com esses animais (ELLIS, 2015; PINTO *et al*, 2017). Diferentemente dos cães, os gatos e felídeos selvagens são considerados bastante resistentes à leptospirose (ELLIS, 2015). Apesar da soroprevalência facilmente detectada em gatos, até recentemente não havia evidências da colonização renal por leptospiros nesses animais, além de poucas confirmações de doença clínica (ELLIS, 2015). Entretanto, um estudo recente avaliou 231 amostras de urina de gatos de rua e comprovou que pelo menos 15% desses animais excretavam leptospiros na urina, tornando-se uma fonte de infecção para outros animais ainda subestimada (DORSCH *et al*, 2020). Leptospiros já foram isoladas de diferentes hospedeiros não-convencionais, como leões, elefantes e lobos marinhos, focas, guaxinims, raposas, baleias, golfinhos, gambás, tatus, diversos pequenos roedores selvagens, capivaras, porco-espinho, esquilos, tenreques, morcegos, primatas não humanos como lêmures, macaco-esquilo, macaco-prego e sagui, cobras, sapos/rãs, peixes e aves (revisado em CILIA *et al*, 2021; ELLIS, 2015; COPOLLA *et al*, 2020). Considerar hospedeiros selvagens no cenário epidemiológico da leptospirose é importante, uma vez que é possível que estes animais desempenham um papel na circulação da infecção no meio ambiente, embora possam ser ou não reservatórios significativos para a infecção humana. Entretanto, a infecção por leptospiros em animais silvestres ainda é pouco conhecida e a função destes animais como hospedeiros de cepas de leptospiros que podem infectar animais domésticos e humanos diverge (VIEIRA *et al*, 2017). De fato, uma região com uma ampla gama de hospedeiros domésticos e selvagens, vai permitir a coexistência de diversos sorogrupos, em comparação com regiões com poucos animais hospedeiros.

2.3 O gênero *Leptospira*

A leptospirose é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. As leptospiros são bactérias espiraladas, flexíveis e móveis, impulsionadas por dois flagelos periplasmáticos ancorados nas suas extremidades, e que se estendem em direção ao meio da célula sem se sobrepor (MURRAY, 2015; PICARDEAU, 2017; TAHARA *et al*, 2018). A motilidade é um fator de virulência importante, e as leptospiros alternadamente utilizam duas fases de motilidade – nadar e arrastar-se - para invadir e se dispersar no ambiente do hospedeiro (TAHARA *et al*, 2018; XU, 2020). Possuem

de 10-20 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro, e curvatura em forma de gancho em uma ou ambas extremidades. A membrana de leptospiras é composta por uma membrana interna com proteínas α -hélices transmembranares, seguido por uma camada de peptidoglicano no espaço periplasmático, e finalmente uma membrana externa que apresenta lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas barril- β transmembranares (GRASSMANN *et al*, 2017; PICARDEAU, 2017) (Figura 1). A membrana externa de leptospiras é uma das estruturas mais estudadas, em especial as proteínas que a compõe. Essas proteínas são essenciais e desempenham funções importantes como o fluxo de componentes entre o ambiente intracelular e extracelular, além de diversos fatores de virulência.

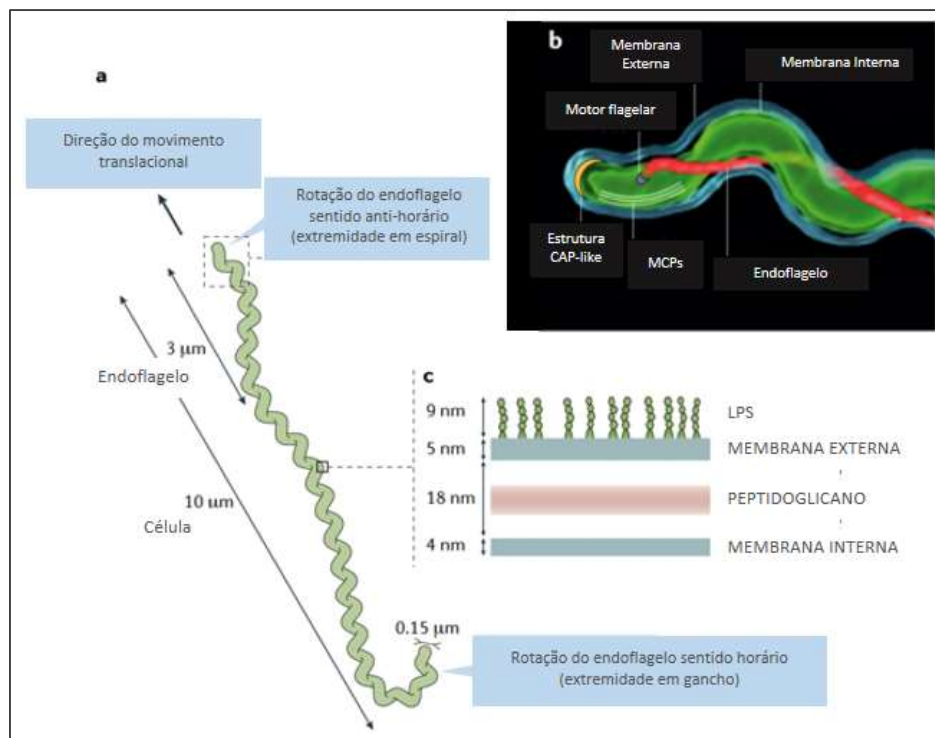


Figura 1. Morfologia celular e arquitetura da membrana de *Leptospira interrogans*. Adaptado de PICARDEAU, 2017. MCPs – Proteínas de quimiotaxia aceitadoras de metil.

O gênero *Leptospira* compreende 66 espécies descritas até o momento, reclassificadas recentemente em dois grandes clados, saprófitas e patogênicas, e quatro subclados designados S1, S2, P1 e P2 (Figura 2). Os subclados S1 e S2 compreendem as espécies ambientais isoladas que não são responsáveis pela doença, enquanto que os subclados P1 e P2 são compostos pelas espécies que causam a infecção em humanos e/ou animais, bem como espécies ambientais que ainda não tiveram seu *status* de virulentas comprovados (VICENT *et al*, 2019; CAIMI

E RUYBAL, 2020; CASANOVAS-MASSANA *et al*, 2020; ABDULLAH *et al*, 2021). Dentre as espécies do gênero *Leptospira*, pelo menos 17 são comprovadamente patogênicas, e possuem a capacidade de infectar diversos hospedeiros mamíferos (ADLER, 2015). Atualmente, mais de 300 sorovares são classificados entre todas as espécies do gênero e distribuídos em 32 sorogrupos. Destes, mais de 260 sorovares são relacionados às espécies patogênicas, bem como, pelo menos 60 sorovares associados às espécies saprófitas (ADLER AND DE LA PENA MOCTEZUMA 2010; ADLER, 2015; PICARDEAU, 2017; THIBEAUX *et al*, 2018; GUGLIELMINI *et al*, 2019; CAIMI E RUYBAL, 2020).

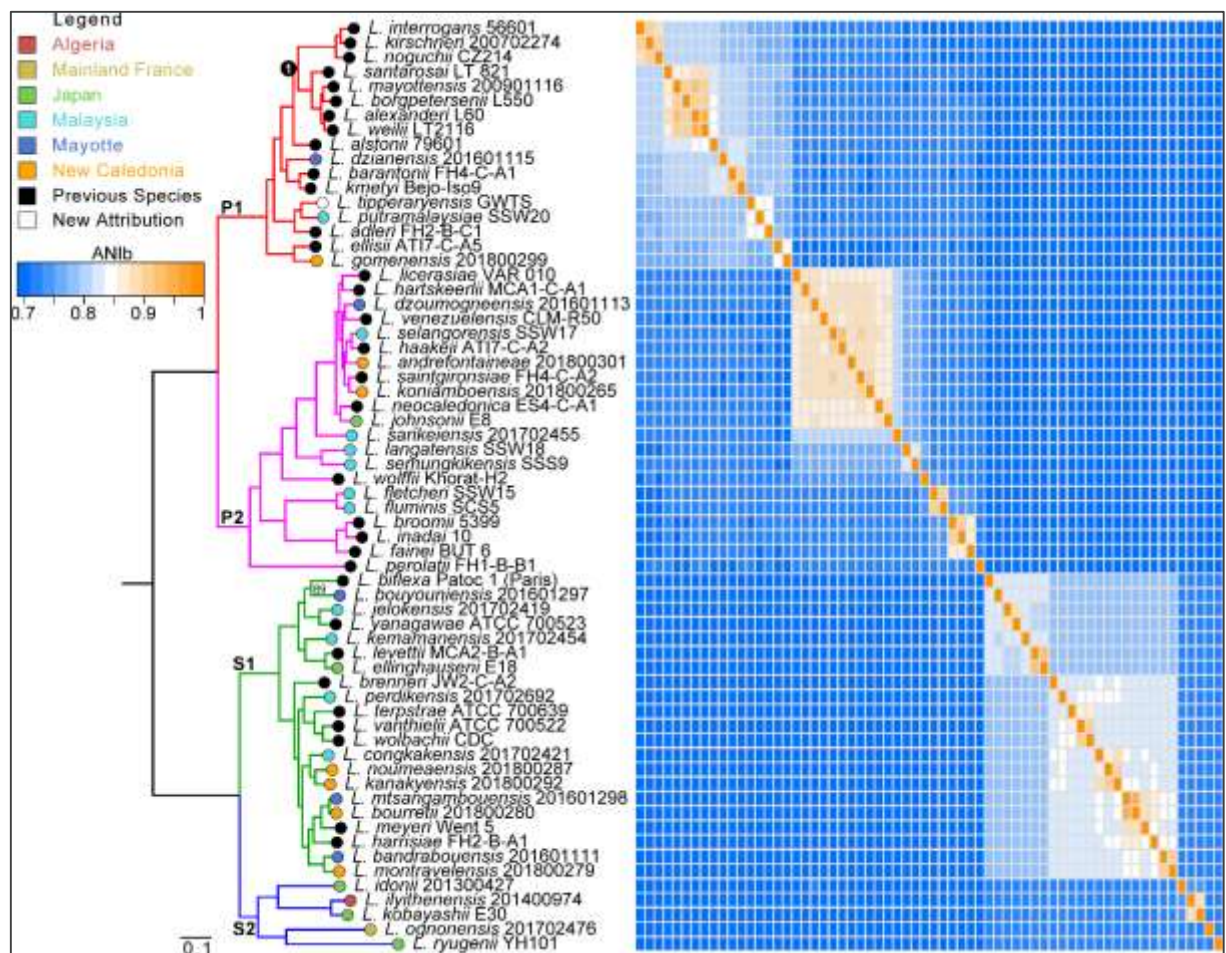


Figura 2. Árvore filogenética baseada na sequência de 1371 genes inferidos como ortólogos. Os ramos vermelho e rosa representam as espécies patogênicas, e/ou não caracterizadas quanto a virulência, pertencentes aos subclados P1 e P2. De forma similar, os ramos verde e azul compreendem as espécies classificadas como saprófitas de vida livre, agrupadas nos subclados S1 e S2. Fonte: VICENT *et al*, 2019.

Os dois primeiros genomas completos sequenciados foram da espécie *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovares Lai e Copenhageni (REN *et al*, 2003; NASCIMENTO *et al*, 2004). Atualmente, mais de 620 genomas já foram sequenciados, o que expandiu a compreensão da diversidade e estrutura do gênero. Além disso, essas sequências auxiliaram o entendimento de aspectos como a distribuição das espécies nos diferentes hospedeiros, os contextos ambientais, a biodiversidade, evolução e dispersão geográfica de sorogrupos e sorovares (CAIMI E RUYBAL, 2020). Os sequenciamentos desses genomas têm revelado diversas características, inclusive a alta plasticidade genômica que as leptospiros apresentam. Dessa forma, leptospiros patogênicas possuem um repertório gênico diverso, e consequentemente, um pangenoma mais aberto (VICENT *et al*, 2019; ABDULLAH *et al*, 2021). O gênero *Leptospira* vem apresentando um crescimento exponencial de novas informações relacionadas a diversidade genômica nos últimos anos. Isso gera um grande banco de novos dados e cria um cenário ainda inexplorado, onde será interessante verificar se diferentes variantes genéticas estão associadas a diferentes resultados e manifestações clínicas (CAIMI E RUYBAL, 2020).

2.4 O metabolismo e cultivo *in vitro* de leptospiros

O genoma de leptospiros codifica vias completas para a biossíntese de aminoácidos e ácidos nucleicos (REN *et al*, 2003). Leptospiros realizam a β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, presentes em meios de culturas ou ambientes naturais onde elas estão presentes, conferindo as fontes de carbono e energia essenciais para o seu metabolismo (BASEMAN, 1969; NASCIMENTO *et al*, 2014; PICARDEAU *et al*, 2008; CAMERON, 2015). Da mesma forma, o genoma também possui um conjunto completo de genes relacionados ao transporte de elétrons da cadeia respiratória e do ciclo de Krebs, uma vez que são microrganismos aeróbicos (REN *et al*, 2003; NASCIMENTO *et al*, 2004). As leptospiros necessitam de uma fonte de nitrogênio que é normalmente fornecida pela adição de sais de amônio aos meios de cultura, ou pela desaminação de aminoácidos (ADLER, 2015). Além disso, a espécie saprófita *L. biflexa* pode sintetizar purinas e pirimidinas e pode crescer na presença da 8-azaguanina (análoga de purina), diferentemente das espécies patogênicas, e a adição desse composto aos cultivos proporciona a diferenciação entre leptospiros patogênicas e saprófitas (CAMERON, 2015).

Em contrapartida, as espécies patogênicas possuem o repertório completo de genes necessários para a biossíntese de vitamina B₁₂ (CAMERON, 2015), o que pode permitir que as bactérias patogênicas sobrevivam em nichos com nutrientes limitados dentro do hospedeiro, sugerindo que a produção de vitamina B₁₂ é um processo crítico *in vivo* (CAMERON, 2015; FOUTS *et al*, 2016). A maioria das leptospirosas patogênicas possui todo ou parte do conjunto de genes para a biossíntese de ácido siálico, e proteínas modificadas com este ácido podem desempenhar funções nas interações patógeno-hospedeiro (FOUTS *et al*, 2016). As leptospirosas com todo o cluster de biossíntese de ácido siálico possuem sintetases preditas para produzir os ácidos legionamínico e pseudamínico. Esses dois ácidos se mostraram necessários tanto para a biogênese flagelar quanto para a virulência em outras bactérias, sugerindo um mesmo papel nas leptospirosas (FOUTS *et al*, 2016).

Os requerimentos nutricionais para o crescimento *in vitro* incluem fontes de carbono (ácidos graxos de cadeia longa), nitrogênio, desintoxicantes como ácidos graxos complexados com sorbitol (Tweens) e/ou albumina, tiamina, cobre, manganês, ferro, fosfatos de cálcio e magnésio (CAMERON, 2015). Para otimizar o isolamento e manutenção de cepas patogênicas, a adição de soro animal, vitamina B₁₂, piruvato de sódio e superóxido dismutase têm apresentado resultados satisfatórios para o cultivo *in vitro* de cepas fastidiosas (FAINE *et al*, 1999; CAMERON, 2015). O meio EMJH, descrito por Ellinghausen e McCullough (1965), e posteriormente aprimorado por Johnson e Harris (1967), tornou-se amplamente utilizado no cultivo de leptospirosas (ELLINGHAUSEN, 1973; RODRIGUEZ *et al*, 2002; ADLER 2015). Apesar da sua qualidade, o alto custo de seus reagentes e a necessidade de grande rendimento celular em experimentos com vacinas, por exemplo, o torna dispendioso para pesquisa básica de laboratório. Alternativamente, outros meios de cultura eficazes foram desenvolvidos, como os meios T80/40LH (tween 40 e 80, lactalbumina hidrolase) e HAN (Horsny-Alt-Nally), além do aprimoramento do EMJH pela adição de diferentes componentes nutricionais (ELLIS, 1985; HORNSBY, 2020). Componentes como tween 80, piruvato de sódio, superóxido dismutase, hemina e soro de coelho proporcionaram o aumento do rendimento celular nas culturas, o crescimento a partir de pequenos inóculos e o isolamento de cepas exigentes nutricionalmente e fastidiosas, além da recuperação mais efetiva de leptospirosas transformadas geneticamente por conjugação (JOHNSON *et al*, 1973; ELLIS, 1985; ADLER E DE LA PENA, 2009; RODRIGUEZ *et al*, 2002; ZUERNER, 2005; ADLER, 2015; HORNSBY,

2020). Para reduzir o crescimento de contaminantes a partir de amostras biológicas, podem ser adicionados coquetéis de antibióticos seletivos contendo 5-fluorouracil, anfotericina B, fosfomicina, trimetoprim, sulfametoxazol, neomicina e vancomicina (CHAKRABORTY *et al*, 2010; CAMERON, 2015; LOUREIRO *et al*, 2015).

Entretanto, apesar do uso de meios de cultura enriquecidos para o cultivo de leptospiros *in vitro*, a manutenção das cepas ainda é um processo lento e que necessita de profissionais treinados para execução. O isolamento por cultura não é sensível, podendo levar meses para apresentar um resultado definitivo, além de introduzir um viés significativo na população patogênica em uma amostra específica (CAIMI E RUYBAL, 2020). Para o cultivo de cepas mais fastidiosas, torna-se necessário pelo menos 16 semanas de incubação para obter um crescimento visível sob microscopia de campo escuro, especialmente no isolamento primário de amostras clínicas (ZUERNER, 2005; ADLER E DE LA PENA, 2009). Os tempos de duplicação de leptospiros patogênicos em modelos animais, e culturas *in vitro* previamente adaptadas aos meios de cultura, são estimados em 6-8 h, enquanto o tempo de duplicação para espécies patogênicas recentemente isoladas de seu hospedeiro é em torno 14-18 h (CAMERON, 2015). Em contrapartida, o crescimento *in vitro* de cepas saprófitas é mais rápido, com um tempo de duplicação de aproximadamente 4,5 h (CAMERON, 2015). As densidades finais alcançadas são rotineiramente 10^9 bactérias/ml para cepas laboratoriais bem adaptadas. Em fase estacionária, as células podem sofrer mudanças consideráveis, resultando em degradação rápida do DNA genômico e autólise (ZUERNER, 2005; CAMERON, 2015).

O pH ótimo para o crescimento é de 7.2-7.6 e a temperatura ideal de crescimento para as espécies de *Leptospira* spp. é de 28-30 °C. Entretanto, as espécies de vida livre são capazes de crescer em temperaturas de 11-13 °C (CAMERON, 2015). Diferentemente, as cepas patogênicas não crescem em temperaturas mais baixas, e são mantidas nas temperaturas mais altas acima citadas (CAMERON, 2015). Além disso, o cultivo sob temperatura de 37 °C também pode ser realizado, especialmente em estudos que objetivam mimetizar a temperatura do hospedeiro mamífero (ELLINGHAUSEN, 1973; CAIMANO *et al*, 2014; CAMERON, 2015; HORNSBY *et al*, 2020). Entretanto, o efeito de temperaturas elevadas sobre o crescimento de leptospiros *in vitro* ainda é pouco compreendido, e a ausência de crescimento em temperaturas mais altas como 37 °C, em especial para cepas não adaptadas ao cultivo *in vitro*, é um problema frequente. Dessa forma, a propagação

laboratorial eficiente exige incubação entre 28-30 °C normalmente. Rotineiramente, a manutenção das culturas é realizada semanalmente para cepas bem adaptadas *in vitro*, através de sucessivas passagens em meio líquido e/ou meio semi-sólido, utilizando inóculos iniciais de 1-10% do volume final de meio fresco (CAMERON, 2015). Para estocagem a longo prazo, idealmente utiliza-se nitrogênio líquido, que proporciona bons resultados e é o método indicado para manter a virulência (ADLER AND DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

2.5 Fatores de virulência em leptospiros

Apesar de esforços recentes para elucidar aspectos da patogênese de leptospiros, diversos aspectos da virulência bacteriana e as suas interações com o sistema imunológico do hospedeiro permanecem desconhecidos (CHIN *et al*, 2019; CHIN *et al*, 2018). O transcriptoma de leptospiros foi estudado *in vitro* em resposta a estresses como mudanças na temperatura, osmolaridade, níveis de ferro, exposição ao soro e sua interação com células fagocíticas, a radiação UV do ambiente e cultivadas dentro do hospedeiro mamífero (LO *et al*, 2006; QIN *et al*, 2006; MATSUNAGA *et al*, 2007; LO *et al*, 2009; PATARAKUL *et al*, 2010; CAIMANO *et al*, 2014; FRASER E BROWN, 2017; PICARDEAU, 2017; ZHUKOVA *et al*, 2017). As leptospiros possuem um elevado número de sistemas sensoriais de dois componentes (TCS, do inglês *Two Component Systems*), que se correlacionam com a diversidade de nichos ecológicos que as espécies podem encontrar (FOUTS *et al*, 2016). O menor número de TCSs é encontrado nas espécies patogênicas, mais de 70 genes TCSs, que podem estar relacionados aos processos de adaptação do hospedeiro (FOUTS *et al*, 2016). Diferentemente, um maior número de TCSs únicos em intermediárias, e ainda maior em saprófitas, sugerindo a detecção e adaptação a uma gama mais ampla de condições ambientais. Isso indica que as leptospiros necessitam de uma rede complexa de processos de sinalização no seu ciclo de vida (FOUTS *et al*, 2016).

A motilidade é um fator de virulência comum e diversos mutantes para os genes *lb139*, *fliY*, *FlaA2* e família *Che* resultaram na atenuação das cepas, redução da motilidade e quimiotaxia, porém os mecanismos envolvidos na atenuação ainda são desconhecidos (PICARDEAU, 2017). O estresse oxidativo ocasionado pela resposta imune do hospedeiro após a infecção, ou até mesmo durante o metabolismo aeróbico, é regulado pelo sensor de peróxido e regulador de transcrição *PerR* (PICARDEAU, 2017). A aquisição de genes nas espécies patogênicas codificadores

da catalase, TCS e proteínas MCPs podem ter habilitado leptospiros patogênicas a colonizar seus hospedeiros (PICARDEAU, 2017). As proteínas de virulência identificadas nesta categoria incluem a catalase KatE e a chaperona ClpB, onde o nocaute dos respectivos genes resulta numa susceptibilidade ao estresse oxidativo (ADLER, 2014). A catalase KatE é necessária para a sobrevivência *in vitro* na presença de H₂O₂ e para a virulência em modelos animais (PICARDEAU, 2017). Além disso, a adaptação a exposição à radiação UV do ambiente pode envolver LexA, que está relacionada a resposta ao dano do DNA induzido por UV (PICARDEAU, 2017).

O LPS é um importante componente para a virulência em bactérias Gram-negativas (ADLER, 2014; PICARDEAU, 2017). Leptospiros podem modificar a estrutura do LPS para evitar o reconhecimento pelo sistema imune dos hospedeiros e se adaptar ao ambiente (PICARDEAU, 2017). Dois mutantes para o LPS foram completamente atenuados em hamsters e também perderam a capacidade de colonizar os rins de camundongos (MURRAY *et al*, 2010; MARCSISIN *et al*, 2013). A adesão aos tecidos e componentes dos hospedeiros é um pré-requisito importante para a infecção bem sucedida (VIEIRA *et al*, 2020). Da mesma forma, sugere-se que um homólogo em leptospiros da proteína micobacteriana para entrada em células de mamífero (Mce, do inglês *Mammalian cell entry*) também possui um papel na adesão celular e virulência (ZHANG *et al*, 2012). Além disso, a inativação dessa proteína resultou em uma redução da adesão e invasão de macrófagos, e virulência em hamsters (ZHANG *et al*, 2012). Através da interação das suas proteínas com os fatores do hospedeiro, as leptospiros se equipam com uma atividade proteolítica associada a membrana. Isso contribui para a degradação dos componentes da matriz extracelular (EMC, do inglês *Extracellular matrix*) e das respostas imunes inata e adaptativa, como fatores do complemento, peptídeos antimicrobianos, imunoglobulinas, redução da opsonização, penetração dos tecidos e evasão do sistema imune (VIEIRA *et al*, 2020). Diversas proteínas de leptospiros já foram relatadas por interagir com as moléculas da EMC purificadas, como as proteínas LenA, Lsa, LipL53, OmpL1, Lp95, OmpL37, OmpL47, TlyC, LipL32, Loa22, OmpL45, LIC10774, LIC10920 (laminina, colágeno tipo I, II, III e IV, fibronectina, plasminogênio), sugerindo que estas proteínas são importantes para a patogênese e na virulência leptospiral (FERNANDES *et al*, 2015; PICARDEAU, 2017; PASSALIA *et al*, 2020; ROSSINI *et al*, 2020; VIEIRA *et al*, 2020).

As proteínas Lig também são consideradas importantes na patogênese do microrganismo. LigA e LigB foram descritas como proteínas de ligação capazes de interagir com fibronectina, laminina, elastina, plasminogênio, heparina, tropoelastina, colágeno I, III e IV, e complemento *in vitro* (ADLER, 2014; FERNANDES *et al*, 2015; PICARDEAU, 2017; SUN *et al*, 2020; VIEIRA *et al*, 2020). As proteínas LigA, LigB, Lsa25.6, LIC12238, Lsa33, LIC11975, LIC10508, Lsa37, ErpY-like, OmpL1 e OmpL37 foram descritas como proteínas de ligação ao fibrinogênio (FERNANDES *et al*, 2015; VIEIRA *et al*, 2020). Loa22 e LipL32 são as duas lipoproteínas mais abundantes na parede celular de leptospiros, mas apenas Loa22 é necessária para a virulência da bactéria (PICARDEAU, 2017). A lipoproteína de membrana externa LipL41 demonstrou se ligar a hemina (LIN *et al*, 2013), no entanto, um mutante nocauteado para essa proteína manteve a virulência no modelo hamster (KING *et al*, 2013). Além disso, a partir do uso de outros mutantes nocauteados para as proteínas LigB, LipL41 e LipL32, alguns dos alvos expressos no hospedeiro, conservados e únicos em espécies patogênicas, demonstraram ser dispensáveis para a virulência, infecção aguda e/ou para colonização renal (CRODA *et al*, 2008; KING *et al*, 2013; MURRAY *et al*, 2013). Os estudos *in vitro* com as proteínas LipL32 e LigB demonstraram que mutantes silenciados para essas proteínas não perderam a habilidade de se aderir e nem de colonizar os rins de hamsters (ADLER, 2014). Entretanto, quando ambas as expressões de LigA e LigB foram reduzidas por TALEs (do inglês *Transcription Activator-Like Effectors*) ou silenciadas por CRISPi (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat interference*) concomitantemente, resultou em leptospiros avirulentos e incapazes de colonizar os rins dos animais infectados (PAPPAS *et al*, 2015; FERNANDES *et al*, 2021). Isso indica que as proteínas possuem funções que se sobrepõem e são essenciais na virulência bacteriana (PAPPAS *et al*, 2015; HAAKE E MATSUNAGA, 2021).

A atividade proteolítica de metaloproteases do tipo M-16 e as proteínas recombinantes dessas enzimas, foram capazes de hidrolisar proteínas da ECM (GE *et al*, 2020). Mutantes nocauteados para essas enzimas apresentaram atenuação na transmigração através das camadas monocelulares, redução de carga leptospiral no sangue, pulmões, fígado, rins e urina. Além disso, apresentou uma Dose Letal para 50% dos animais (DL₅₀) reduzida, com danos histopatológicos mais leves em hamsters. Esses resultados sugerem que Lep-MP1e3 estão envolvidas na virulência, invasão e difusão de *L. interrogans* no hospedeiro (GE *et al*, 2020). Exceto pelo LPS,

muitas hemolisinas demonstram uma habilidade poderosa para induzir citocinas pró-inflamatórias e apoptose de hepatócitos (SUN *et al*, 2020). Fatores de virulência conhecidos, e que foram identificados em modelos animais de leptospirose aguda e em modelos de macrófagos *in vivo*, foram revisados em Kedzierska-mieszkowaska *et al* (2020) e Abdullah *et al* (2021).

2.6 Resposta imune

Leptospiras patogênicas desenvolveram diversas estratégias para a evasão do sistema imune, e esses mecanismos são importantes para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (MURRAY, 2015; CHIN *et al*, 2019). O estabelecimento da infecção bacteriana frequentemente resulta em invasão, colonização, disseminação e extração de nutrientes dos seus hospedeiros (CHIN *et al*, 2019). Leptospiras patogênicas resistem à fagocitose por macrófagos e neutrófilos na ausência de anticorpos específicos (ADLER, 2014). Já foi sugerido que leptospiras são capazes de sobreviver dentro dos macrófagos, induzindo a apoptose nessas células através da liberação do fator mitocondrial indutor de apoptose e endonucleases (EndoG), o que facilita a sobrevivência e proliferação no hospedeiro (ADLER, 2014; RAMIREZ-GARCIA *et al*, 2019). Um estudo recente demonstrou que as leptospiras, macrófagos e células endoteliais dos hospedeiros secretam exoproteínas em resposta a infecção (HU *et al*, 2021). As proteínas leptospirais secretadas estão envolvidas nas respostas ao estresse dentro do hospedeiro, fatores de virulência e transdução de sinal. Em contrapartida, as exoproteínas secretadas pelos hospedeiros infectados foram relacionadas ao estresse, sistema complemento, citocinas inflamatórias, proteínas da matriz extracelular e fatores de coagulação do sangue (HU *et al*, 2021).

A imunidade inata do hospedeiro, especialmente os neutrófilos e o sistema complemento, estão envolvidos na primeira linha de defesa e são importantes no controle da leptospirose (MURRAY, 2015; CHIN *et al*, 2019; SILVA *et al*, 2020). Porém, neutrófilos e o complemento são mais efetivos contra leptospiras saprófitas do que as patogênicas (CHIN *et al*, 2019; BARBOSA E ISAAC, 2020). A participação de neutrófilos, bem como suas armadilhas extracelulares (NETs), são importantes na fase inicial da infecção, tanto para impedir a disseminação bacteriana, como a secreção de antimicrobianos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ao invés da fagocitose (SCHARRIG *et al*, 2015; VIEIRA *et al*, 2018). As NETs estão envolvidas na resposta imune inata a infecção, onde o DNA de neutrófilos e proteínas

bactericidas resultam no aprisionamento e morte de leptospiros (SCHARRIG *et al*, 2015; CHIN *et al*, 2019). Entretanto, as leptospiros patogênicas são capazes de escapar das NETs ao produzir DNases extracelulares (PICARDEAU, 2017).

Durante o estresse oxidativo no hospedeiro as ROSs são produzidas, incluindo peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ácido hipocloroso (HOCl), e medeiam a morte bacteriana (VIEIRA *et al*, 2018). As leptospiros possuem resistência as ROSs produzidas pela resposta imune em resposta a atividade da enzima KatE (ESHGHI *et al*, 2012). De forma semelhante, as proteínas LipL21 e LipL45 são inibidoras de mieloperoxidase (MPO), uma enzima que catalisa oxidantes que reagem com proteínas, lipídios e DNA bacterianos (VIEIRA *et al*, 2018; CHIN *et al*, 2019). A MPO é estocada nos grânulos primários de neutrófilos e liberada nos fagossomos durante a fagocitose, sendo um agente antimicrobiano potente. Uma vez que LipL21 é uma das mais abundantes proteínas na membrana externa de leptospiros, a sua ação contra o estresse oxidativo pela inibição da MPO pode ser um passo crucial para a virulência bacteriana, evasão do sistema imune e sobrevivência nos hospedeiros (VIEIRA *et al*, 2018; CHIN *et al*, 2019).

Citocinas pró-inflamatórias desempenham função importante na iniciação da resposta imune nos estágios iniciais da infecção (XIA, 2017). A ativação de linfócitos T durante a infecção inicia a resposta inflamatória, principalmente a produção de citocinas, para a eliminação da bactéria no início da infecção. As células leucocitárias e linfócitos T produzem 1L-1b, IL-6, IL-12, INF- γ e TNF- α que atuam como quimioatrativos para intensificar a ação dos leucócitos no local da infecção (VIEIRA *et al*, 2018; SILVA *et al*, 2020; BARBOSA E ISAAC, 2020; CHIN *et al*, 2019). Um estudo sugere que a regulação da expressão de citocinas, especialmente a IL-10 anti-inflamatória, pode ser de importante para a patogênese na leptospirose (MATSUI *et al*, 2017). Dessa forma, usando um neutralizador de IL-10 no modelo de camundongo, foi também evidenciado uma possível função dessa citocina na suscetibilidade do hospedeiro, eliminação bacteriana e regulação da expressão gênica de citocinas (MATSUI *et al*, 2017).

Receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) e *NOD-like* (NLRs) presentes nos hospedeiros reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos e danos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*, e DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular patterns*) de leptospiros, como LPS e peptidoglicano presentes nas membranas da bactéria (HAAKE E LEVETT, 2015; MURRAY, 2015;

ZUERNER, 2015). Em humanos e animais suscetíveis, os PAMPs são capazes de ativar somente o TLR2, enquanto que em hospedeiros resistentes TLR2 e TLR4 são ativados (HAAKE E LEVETT, 2015; MURRAY, 2015; ZUERNER, 2015). A ativação de TLR4 é importante para a produção de anticorpos, e consequentemente, a eliminação da bactéria do sangue (HAAKE E LEVETT, 2015; MURRAY, 2015). Hemolisinas do tipo esfingomielinases 1, 2 e 3, proteína A semelhante a histona HlpA e hemolisina A TlyA são secretadas, tem atividade hemolítica e induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos e de camundongos, através das vias de sinalização c-Jun N-terminal quinase (JNK) e fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *Nuclear Factor Kappa B*) dependentes de TLR2 e TLR4 (WANG *et al*, 2012; CHIN *et al*, 2018). O heterodímero TLR2/TLR1 reconhece o LPS e a proteína LipL32 de leptospirosas, induzindo a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor α*), e é reconhecido como o principal receptor envolvido no reconhecimento da bactéria (RAMIREZ-GARCIA *et al*, 2019).

É bem estabelecido que o reconhecimento do LPS pode iniciar as rotas de sinalização imune, e essas podem ser protetoras ou danosas para o hospedeiro, estando associadas a hemorragias subcutâneas e pulmonares provavelmente através de mediadores da cascata pró-inflamatória, em especial, a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (XIA *et al*, 2017). LPSs que estimulam fracamente as respostas do tipo TLR4 podem ser essenciais para que leptospirosas causem a doença, evitando assim a contenção pela resposta imune local (XIA *et al*, 2017). O óxido nítrico é um mediador crucial de disfunção endotelial na sepse, e tem similaridades no espectro clínico de sepse severa e leptospirose severa (CHIN *et al*, 2018). Além disso, TLR5 é o receptor que reconhece flagelinas (FlaB) que compõem o endoflagelo bacteriano, especialmente em humanos e bovinos, sugerindo que este receptor poderia ser importante para o controle da leptospirose nesses hospedeiros (HOLZAPFEL *et al*, 2020). Além disso, sugere-se uma possível função da proteína FlaB na evasão da resposta imune, uma vez que essa proteína é localizada no *core* do endoflagelo bacteriano, e a sua expressão foi reduzida no ambiente do hospedeiro, levando a crer que é importante durante a infecção (HOLZAPFEL *et al*, 2020).

As leptospirosas são resistentes à atividade bactericida do complemento, e têm desenvolvido estratégias para escapar dele mediante a ligação de proteínas as moléculas do complemento e a secreção de proteases que diretamente clivam moléculas chave do complemento (ADLER, 2014; MURRAY, 2015; PICARDEAU,

2017; RAMIREZ-GARCIA *et al*, 2019). As proteínas de *Leptospira* spp. que se ligam ou degradam componentes do sistema complemento foram revisadas em Barbosa e Isaac (2020). A proteína LIC10774 é uma proteína de membrana externa (OMP, do inglês *Outer Membrane Protein*) que se liga a íons de cálcio e a vários componentes do soro e da matriz extracelular (PASSALIA *et al*, 2020). Ensaios *in vitro* sugerem possíveis funções na adesão aos tecidos do hospedeiro, evasão do sistema imune e participação no processo de disseminação bacteriana durante a infecção (PASSALIA *et al*, 2020). As OMPs de *L. interrogans* LcpA, LigA e LigB possuem domínios específicos de ligação a proteína regulatória do sistema complemento C4b (BREDA *et al*, 2015). LcpA, a proteína A de aquisição do regulador do complemento de *Leptospira* spp., também interfere nos passos finais da cascata do complemento sendo capaz de reduzir a atividade de vários pontos de controle dessa cascata (BARBOSA E ISAAC, 2020). Um estudo recente demonstrou que o 11º domínio da proteína LigA está envolvido na modulação da resposta imune inata do hospedeiro dependente de TLR4 (KUMAR *et al*, 2020). Essa sinalização em macrófagos de camundongos através da rota de proteínas quinases ativadas por mitógenos, leva a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , além da expressão das moléculas coestimulatórias CD80, CD86, CD40 e o marcador de maturação MHC-II (KUMAR *et al*, 2020).

O domínio 11 de LigA está também envolvido na aquisição de inibidores como o Fator H, além de possuir função como nuclease na degradação das NETs (KUMAR *et al*, 2020). Esses resultados sugerem que a sinalização dependente de TLR4 pelo domínio 11 de LigA, poderia ativar células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen-presenting cell*) para produzir efetores bactericidas e citocinas que eventualmente aumentariam a sua atividade fagocítica, e subsequente ativação de leucócitos B para produzir anticorpos contra as leptospiros (KUMAR *et al*, 2020). Dessa forma, as leptospiros interferem no sistema imunológico inato, o que promove a disseminação das bactérias nos tecidos do hospedeiro e contribuem para danos teciduais (PICARDEAU, 2017; BREDA *et al*, 2015; CHIN *et al*, 2019). A interação com a cascata do complemento é necessária nos estágios iniciais da infecção, não somente para promover a inibição dessa cascata e lise celular, mas também para potencialmente reduzir o recrutamento e ativação de fagócitos, bem como da opsonofagocitose (MURRAY, 2015).

2.7 Prevenção

A leptospirose pode ser prevenida pela conscientização da população a respeito da doença e dos seus problemas atuais. Esse objetivo pode ser alcançado por meio da implementação de atividades de promoção de saúde, e de medidas preventivas especialmente antes, durante e após períodos de ocorrência de enchentes (HARTSKEERL *et al*, 2011; AIDID *et al*, 2018; ALI E BASAK, 2019). O cuidado deve ser direcionado também as populações de áreas de risco baixo e moderado, bem como grupos de faixa etária mais jovem e renda mais altos para prevenir surtos da infecção nessas configurações (AIDID *et al*, 2018). Diferentemente de populações em locais de alto risco, populações em áreas de risco baixo ou moderado não possuem tanta consciência a respeito das medidas preventivas (AIDID *et al*, 2018).

A prevenção da infecção também pode ser adquirida pelo uso de equipamentos de proteção individual adequados. Além disso, o melhoramento nos estoques de água e alimentos, bem como a drenagem de áreas alagadas, e melhorias em estradas e ambientes externos, podem ter um impacto positivo na prevenção (AIDID *et al*, 2018). O constante monitoramento da população, e a vacinação dos animais de produção anualmente, são necessários para predizer a situação epidemiológica da leptospirose na população, além do melhoramento do diagnóstico para a infecção (VASYLIEVA *et al*, 2017). Além disso, animais suscetíveis, outras medidas preventivas em animais suscetíveis estão relacionadas à antibiótico terapia, vacinação com vacinas tradicionais de bacterina e finalmente a manutenção do ambiente onde esses animais permanecem (MARTINS E LILENBAUM, 2017). As boas práticas de prevenção podem reduzir o número de casos e de mortes ocasionados pela leptospirose. Nesse contexto, uma opção adequada para detectar a infecção em fase inicial pode ser a aplicação rotineira de testes de sorológicos, que detectariam a infecção e possibilitariam o início do tratamento precocemente (AIDID *et al*, 2018).

Além disso, o controle constante e intensivo das populações de roedores poderia prevenir a transmissão da infecção em um determinado ambiente (HARTSKEERL *et al*, 2011; VASYLIEVA *et al*, 2017). O uso de raticidas constantemente gera um um risco na resistência desses animais ao seu efeito, e necessita de mão de obra especializada na sua aplicação (HARTSKEERL *et al*, 2011; MARQUEZ *et al*, 2019). Uma opção viável e realista em áreas urbanas é a redução

da atratividade dos ambientes onde esses animais habitam, como descarte de lixo adequadamente e melhorias sanitárias (HARTSKEERL *et al*, 2011). Entretanto, como tentativa de controlar a população de roedores geneticamente resistentes aos raticidas tradicionais, anticoagulantes de segunda geração que são mais tóxicos, persistem por mais tempo nos tecidos, e frequentemente associados com envenenamentos primários e secundários podem ser utilizados (MARQUEZ *et al*, 2019).

As vacinas de bacterinas são amplamente utilizadas na medicina veterinária para o controle e prevenção de infecções. Essas vacinas são efetivas, com 100% de proteção nos animais imunizados, porém ainda possuem muitas limitações a serem ajustadas para o uso em humanos (ADLER, 2015). Apesar disso, as vacinas de bacterinas são as únicas disponíveis para o uso animal, enquanto seu uso em humanos ainda é restrito a situações de surtos e risco de exposição aumentados em países como França, Cuba, China e Japão (ADLER E DE LA PENA, 2010). Os problemas que impedem o uso dessas vacinas em humanos estão relacionados a proteção de curta duração em decorrência da ausência de resposta de memória, as reações adversas provocadas pelos componentes presentes nas vacinas, além de que são sorovares-específicas, resultando em uma resposta imune direcionada somente contra os sorovares presentes na composição vacinal (ADLER, 2015; HAAKE E LEVETT, 2015; ZUERNER, 2015). Embora as vacinas de bacterina tenham problemas inerentes, sua eficácia pode ser melhorada (NAIR *et al*, 2020).

Estudos recentes com vacinas de bacterinas e outras cepas vivas atenuadas, têm proposto diversas abordagens para melhorar o funcionamento das vacinas tradicionais. *L. interrogans* sorovar Manilae M1352 com biossíntese de LPS comprometida foi capaz de proteger contra o desafio homólogo e heterólogo com o sorovar Pomona, também apresentando resultados superiores a vacina tradicional de bacterina (SRIKRAM *et al*, 2011). Além disso, o mesmo grupo de pesquisa avaliou a cepa M1352 quanto a proteção heteróloga contra os sorovares Grippotyphosa, Australis, Canícola, Autumnalis e Pomona, demonstrando a capacidade de proteção cruzada e aumentada e comparação a bacterina, porém sem impedir a colonização renal (MURRAY *et al*, 2018; PHOKA *et al*, 2021). Um modelo vacinal utilizando uma cepa não-virulenta viva e atenuada de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, deficiente na produção da proteína flagelar FcpA, apresentou uma bacteremia transitória e foi capaz de proteger hamsters contra o desafio homólogo e heterólogo contra as

espécies *L. kirschneri* e *L. borgpetersenii*, superando os resultados da vacina de bacterina (WUNDER *et al*, 2021). Além disso, em camundongos imunizados com doses vacinais acima de 10^3 leptospiras, a proteção heteróloga de 100% foi alcançada contra mais de um sorovar de *L. interrogans*, com colonização renal dos animais variando de 25-100%. Dessa forma, a vacina viva atenuada *fcpA*^{-/-} foi a primeira a conferir proteção cruzada entre diferentes espécies (WUNDER *et al*, 2021).

Experimentos com vacinas de bacterinas monovalentes e bivalentes para os sorovares Copenhageni e Canícola, que tiveram a quantidade de LPS reduzida, foram testadas recentemente (LAURETTI-FERREIRA *et al*, 2020). As vacinas monovalentes foram 100% protetoras nos desafios homólogos, e as vacinas bivalentes foram 100% protetoras nos desafios com o sorovar Canicola, apresentando imunidade esterilizante. Os anticorpos presentes nos soros dos animais vacinados foram incubados com extratos bacterianos de diferentes sorovares de leptospiras não presentes nas formulações vacinais, e reagiram com proteínas de massa molecular entre 17 e 60 kDa que podem ser relacionadas a proteção cruzada observada contra o sorovar Canicola. Além disso, transcritos de citocinas, quimiocinas e receptores também foram observados nos animais vacinados. Essa alternativa poderia ser interessante na redução dos efeitos colaterais de bacterinas pela presença do LPS, além de demonstrar a capacidade de gerar proteção cruzada e de reconhecer antígenos proteicos que podem estar relacionadas a essa proteção (LAURETTI-FERREIRA *et al*, 2020).

A abordagem *One health*, que reconhece que a saúde humana está diretamente relacionada à saúde animal e do nosso ambiente compartilhado (CDC, 2018), sugere algumas alternativas potencialmente eficazes na redução do impacto da leptospirose. Essas alternativas consistem na integração das instituições de saúde, agências médicas e governamentais, indústrias ambientais e de cuidados veterinários para trabalhar em conjunto na tentativa de mudar o cenário mundial da leptospirose. O conhecimento e consciência pública devem ser criados no âmbito econômico e de saúde pública e a abordagem deve ser endereçada para melhorar o desenvolvimento e iniciativas para a detecção, prevenção e estratégias de controle com o objetivo maior de salvar vidas (PEREIRA *et al*, 2018; PAL *et al*, 2021). Dessa forma, identificar falhas no conhecimento técnico e científico, que impedem a vigilância epidemiológica e a manutenção clínica, devem ser endereçadas aos diferentes níveis de políticas de saúde na intenção de apoio para o desenvolvimento técnico e científico (CILIA *et al*,

2021; PEREIRA *et al*, 2018). Por fim, o desenvolvimento de modelos matemáticos que predizem a evolução de surtos da infecção, e quais aspectos podem estar relacionados a estes fenômenos, é uma ferramenta que poderia auxiliar eficientemente na antecipação das medidas preventivas da infecção (GUALTIER E HECHT, 2019).

2.8 Novas abordagens na seleção de alvos vacinais para vacinas recombinantes

Apesar dos resultados promissores recentes com vacinas de bacterinas e vivas atenuadas, as pesquisas atuais com vacinas contra a leptospirose permanecem focadas em vacinas de nova geração, que sejam capazes de gerar proteção heteróloga, de longa duração e induzam a imunidade esterilizante. Entretanto, pouco foi conquistado em relação a prevenção da infecção em humanos através vacinação. As abordagens atuais se concentram na identificação de proteínas associadas à superfície, que podem servir como alvos para respostas imunes bactericidas. Já foram identificadas várias proteínas supostamente expostas na superfície da bactéria, como por exemplo as proteínas LemA (HARTWIG *et al*, 2013; OLIVEIRA *et al*, 2018), LigA (KOIZUMI E WATANABE, 2004; SILVA *et al*, 2007; FAISAL *et al*, 2009; COUTINHO *et al*, 2011; BACELO *et al*, 2014; HARTWIG *et al*, 2014; LOURDAULT *et al*, 2014; MONARIS *et al*, 2015; EVANGELISTA *et al*, 2017; DA CUNHA *et al*, 2019; OLIVEIRA *et al*, 2019), LigB (KOIZUMI E WATANABE, 2004; YAN *et al*, 2009; FORSTER *et al*, 2013; FORSTER *et al*, 2015; CONRAD *et al*, 2017; EVANGELISTA *et al*, 2017; DA CUNHA *et al*, 2019), LipL21 (LIN *et al*, 2016), LipL32 (SEIXAS *et al*, 2007; GRASSMANN *et al*, 2012; LIN *et al*, 2016; OLIVEIRA *et al*, 2019), LipL41 (HAAKE *et al*, 1999), Lsa14, LIC13259 e LIC11711 (TEIXEIRA *et al*, 2020) e outras lipoproteínas (FAISAL *et al*, 2009; FAISAL *et al*, 2009), administradas sozinhas ou como quimeras combinadas, e induziram uma resposta imune protetora contra leptospirose letal em modelos animais. Essas proteínas foram testadas utilizando diferentes formulações vacinais, como diferentes adjuvantes, doses de proteína e modelos animais para infecção letal aguda, conferindo proteção de 40-100% revisado em Dellagostin *et al* (2011) e Felix *et al* (2020). No entanto, das proteínas avaliadas até o momento, poucas conferiram proteção cruzada entre diferentes sorovares e/ou foram eficientes na indução de imunidade esterilizante (SEIXAS *et al*, 2007; FORSTER *et al*, 2013; FORSTER *et al*, 2015; LIN *et al*, 2016; CONRAD *et al*, 2017; OLIVEIRA *et al*, 2018; OLIVEIRA *et al*, 2019). Apesar de mais de 20 anos de estudos com proteínas

recombinantes, até o momento todas as proteínas testadas permaneceram em ensaios pré-clínicos. Dessa forma, ainda há a necessidade para identificar novas vacinas protetivas contra a leptospirose, e para isso, diferentes abordagens vêm sendo utilizadas para a seleção de novos antígenos vacinais de superfície.

A vacinologia reversa (RV) e estrutural (SV) consiste em prever as estruturas e a localização de proteínas de interesse nos microrganismos a partir da sequência do genoma, utilizando ferramentas de bioinformática (RAPPUOLI, 2000; RAPPUOLI *et al*, 2016; DELLAGOSTIN *et al*, 2017). Essa abordagem reduz o tempo de triagem de novos antígenos vacinais, sem a necessidade de realizar diversos ensaios *in vitro* e em modelos animais para identificar proteínas protetoras. Avanços na genômica, transcriptômica, proteômica e outros campos de pesquisa têm contribuído para a triagem racional de alvos vacinais *in silico*, refinando a seleção antígenos candidatos para os testes *in vitro* e *in vivo*. Um resumo dos estudos relacionados a vacinologia reversa aplicados à leptospirose é revisado em Dellagostin *et al* (2017). Com a aplicação da vacinologia reversa e estrutural, 18 proteínas barril- β transmembrana e 8 lipoproteínas de superfície foram identificadas em *Leptospira* sp. como novos potenciais candidatos vacinais, todos eles conservados entre espécies patogênicas de leptospirosas (GRASSMANN *et al*, 2017). De forma similar, 121 novas proteínas antigênicas foram identificadas pela vacinologia reversa empregando uma nova estratégia de seleção negativa, combinada com a análise do pan-genoma de 17 cepas de *L. interrogans* (ZENG *et al*, 2017). Além das proteínas LigB, LipL45 e OmpL1 já conhecidas como OMPs, as outras proteínas foram identificadas e apresentam potencial como antígenos para uma vacina contra a leptospirose (ZENG *et al*, 2017). Um estudo encontrou 21 OMPs que são comuns entre as espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* pela aplicação de parâmetros que caracterizam a exposição na membrana externa (DHANDAPANI *et al*, 2018). Esses alvos podem ser investigados quanto a capacidade de gerar a proteção contra a doença (DHANDAPANI *et al*, 2018).

As abordagens de imunoinformática podem auxiliar na identificação de OMPs mais conservadas e imunogênicas. Um estudo recentemente utilizando essa abordagem analisou todo o proteoma de *L. interrogans* identificando 2 OMPs, uma proteína hipotética e a LIC20172 (LruC), que apresentaram um *score* antigênico expressivo (LATA *et al*, 2018). Esse resultado indica a capacidade dessas proteínas de induzir uma resposta imunológica potente, o que é interessante em antígenos vacinais (LATA *et al*, 2018). Validi e colaboradores (2018) desenvolveram uma

quimera contendo epítomos das proteínas LigA, Hap1, LAg42, SphH e HSP58. Através da imunoinformática, os antígenos foram analisados quanto a predição de epítomos para linfócitos T, INF- γ e epítomos adicionais relacionados a CD4⁺ e linfócitos T auxiliares (VALIDI *et al*, 2018). O antígeno quimérico desenvolvido a partir desses epítomos apresentou potencial na indução das respostas imunes mediadas por linfócitos B e T, o que o torna um alvo vacinal interessante para testes *in vivo* (VALIDI *et al*, 2018). Além disso, a predição de epítomos de linfócitos B, linfócitos T e epítomos comuns entre eles nas proteínas OmpL1 e LipL32 foram realizados, com a intenção de desenvolver uma quimera com múltiplos epítomos para ser analisada posteriormente em modelos animais como uma vacina contra a leptospirose (NAZIFI *et al*, 2018). Utilizando o ORFoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni em um microensaio proteico, foram determinados os perfis de anticorpos de pacientes associados com a severidade da doença (LESSA-AQUINO *et al*, 2017). Um conjunto de 36 antígenos foram identificados usando os soros agudos e convalescentes humanos, com 11 proteínas identificadas em soros na fase aguda da infecção, que podem ser utilizadas como antígenos no sorodiagnóstico da infecção. Além disso, 33 dessas proteínas são relacionadas a pacientes convalescentes após a recuperação da leptospirose, demonstrando ter o potencial para o uso em vacinas contra a doença. As proteínas LigA/B domínios 1 ao 6, e LigB domínios 8 ao 12 apresentaram os melhores resultados no diagnóstico de infecções leves e severas, respectivamente (LESSA-AQUINO *et al*, 2017).

Estudos avaliando vacinas de bacterinas e de cepas vivas avirulentas e atenuadas, têm realizado a triagem de diversos antígenos a partir dos soros de animais vacinados que sobreviveram aos desafios letais homólogos e heterólogos (SRIKRAM *et al*, 2011; LAURETTI-FERREIRA *et al*, 2020; PHOKA *et al*, 2021; WUNDER *et al*, 2021). Esses antígenos podem ser os responsáveis pelas proteções cruzadas entre diferentes sorovares e espécies que essas vacinas promoveram. De forma similar, para identificar novos antígenos expostos na superfície de *Neisseria meningitidis*, foi desenvolvido um método para rastrear proteínas de *N. meningitidis* por imunoproteômica, que consiste na identificação das proteínas envolvidas na resposta imune. Para isso, foi realizada a técnica CSIP utilizando células meningocócicas intactas com soro imune, e a identificação de proteínas que estavam precipitadas com os anticorpos através de espectrometria de massas. Este método foi bem sucedido na identificação de antígenos protetores, incluindo os atuais

componentes da vacina para meningite (NEWCOMBE *et al*, 2014; DA CUNHA *et al*, 2017). Em um estudo piloto com *Leptospira interrogans*, o mesmo método de CSIP foi utilizado para identificar vários dos candidatos vacinais mais comuns e 164 novos antígenos alvo de *Leptospira* (dados não publicados, manuscrito 2). Enquanto esses dados confirmaram o potencial de aplicar a CSIP a *Leptospira* spp., também foram identificados antígenos que não estão expostos à superfície, demonstrando que a técnica requer mais refinamento. Além disso, outra fraqueza potencial da abordagem acima é que ela só detecta antígenos que são expressos *in vitro*.

Estudos de muitos organismos demonstraram que os agentes patogênicos expressam um conjunto de antígenos apenas no ambiente do hospedeiro (CAIMANO *et al*, 2014). Nesse contexto, um modelo desenvolvido para estudar os sinais ambientais que influenciam a expressão gênica diferencial em *Borrelia burgdorferi* foi adaptado para *Leptospira* spp., como um modelo promissor para adaptação *in vivo* das bactérias (CAIMANO *et al*, 2014; GRASSMANN *et al*, 2015). Esse modelo utiliza DMCs que são implantadas no peritônio de ratos (*rattus norvegicus*), os hospedeiros reservatórios da bactéria. As DMCs possuem pequenos poros que permitem eficientemente a troca de alguns nutrientes como glicose, íons e aminoácidos livres, fazendo com que as bactérias tenham acesso aos nutrientes do hospedeiro e permaneçam protegidas do sistema imune, de forma similar ao ambiente encontrado nos túbulos renais dos hospedeiros mamíferos. Através da utilização da técnica de DMC foram identificados 166 genes diferencialmente expressos no ambiente do hospedeiro por RNAseq, incluindo genes que codificam proteínas associadas à patogênese e fatores de virulência em leptospiros (CAIMANO *et al*, 2014). Estes antígenos regulados no ambiente do hospedeiro são potenciais candidatos como alvos vacinais.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Definir a influência das condições de cultivo *in vitro* na virulência de *Leptospira* e identificar antígenos imunoreativos como potenciais alvos vacinais contra a leptospirose.

3.2 Objetivos específicos

- Apresentar o panorama atual do desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose para humanos, e os desafios que impedem o avanço das pesquisas na área.
- Otimizar o cultivo *in vitro* de leptospiros garantindo a estabilidade da virulência das bactérias.
- Selecionar novos antígenos vacinais expostos na membrana externa de leptospiros pela aplicação das abordagens de vacinologia reversa e estrutural, adaptação das leptospiros ao hospedeiro mamífero e imunoprecipitação de superfície celular.
- Caracterizar os antígenos selecionados quanto a sua estrutura, função predita e capacidade imunogênica através de ferramentas de bioinformática. Testar quatro antígenos vacinais quanto as suas capacidades de gerar uma resposta imune protetora no modelo animal de leptospirose aguda.

4. Capítulos

4.1 Artigo 1 – An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives

Carolina R. Félix, Bianca S. Siedler, Liana N. Barbosa, Gabriela R. Timm, Johnjoe McFadden & Alan J. A. McBride

Artigo publicado na Revista Expert Opinion on Drug Discovery



An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives

Carolina R. Felix, Bianca S. Siedler, Liana N. Barbosa, Gabriela R. Timm, Johnjoe McFadden & Alan J. A. McBride

To cite this article: Carolina R. Felix, Bianca S. Siedler, Liana N. Barbosa, Gabriela R. Timm, Johnjoe McFadden & Alan J. A. McBride (2019): An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives, Expert Opinion on Drug Discovery, DOI: [10.1080/17460441.2020.1694508](https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 28 Nov 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

REVIEW



An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives

Carolina R. Felix^a, Bianca S. Siedler^{a,b}, Liana N. Barbosa^a, Gabriela R. Timm^a, John Joe McFadden^{a,b} and Alan J. A. McBride^{a*}

^aBiotechnology Department, Centre for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; ^bSchool of Biosciences and Medicine, Faculty of Health & Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK

ABSTRACT

Introduction: It's been 20 years since the first report of a recombinant vaccine that protected against leptospirosis. Since then, numerous recombinant vaccines have been evaluated; however, no recombinant vaccine candidate has advanced to clinical trials. With the ever-increasing burden of leptospirosis, there is an urgent need for a universal vaccine against leptospirosis.

Areas covered: This review covers the most promising vaccine candidates that induced significant, reproducible, protection and how advances in the field of bioinformatics has led to the discovery of hundreds of novel protein targets. The authors also discuss the most recent findings regarding the innate immune response and host-pathogen interactions and their impact on the discovery of novel vaccine candidates. In addition, the authors have identified what they believe are the most challenging problems for the discovery and development of a universal vaccine and their potential solutions.

Expert opinion: A universal vaccine for leptospirosis will likely only be achieved using a recombinant vaccine as the bacterins are of limited use due to the lack of a cross-protective immune response. Although there are hundreds of novel targets, due to the lack of immune correlates and the need for more research into the basic microbiology of *Leptospira* spp., a universal vaccine is 10–15 years away.

ARTICLE HISTORY

Received 29 July 2019
 Accepted 14 November 2019

KEYWORDS

Leptospira; universal vaccine;
 reverse vaccinology;
 structural vaccinology

1. Introduction

Considered to be the most widespread zoonosis in the world, leptospirosis is caused by pathogenic spirochetes belonging to the genus *Leptospira*, with 17 pathogenic species currently described [1–4]. This disease is responsible for more than 1 million new, severe cases per year and almost 60 million deaths, especially in underdeveloped countries where its impact remains significantly underestimated [5]. The global burden of leptospirosis is comparable, or higher, to that of other neglected infectious diseases, such as dengue and malaria [6]. However, while leptospirosis is an important public health problem in many countries, especially South America and Asia, it remains a neglected disease [7]. In addition, global estimates show that almost 2.9 million disability-adjusted life years (DALYs) are lost to leptospirosis every year. Men from 20 to 49 years of age are most affected and this demonstrates the impact of leptospirosis on global economic productive capacity. This puts the burden of leptospirosis on the same scale as schistosomiasis, leishmaniasis, lymphatic filariasis and even cholera [8]. Therefore, an effective vaccine against leptospirosis is urgently needed, especially given the fragile social-economic situation in which remain most people affected by this disease.

Transmission of leptospires occurs by direct or indirect contact with infected animals as, uniquely among the spirochetes, can survive outside the host [3], although this is

reduced in *L. borgpetersenii* [9]. The bacteria enter their hosts mainly through abrasions in the skin and mucous membranes [6]. However, current knowledge on the mechanisms involved in leptospiral pathogenesis and virulence is limited, hindering attempts at vaccine development. Key aspects include two periplasmic flagella [10] and components of these are essential for motility and virulence of pathogenic *Leptospira* spp [11]. Adherence to host tissues is likely to be important for the establishment of an initial infection and several outer membrane proteins (OMPs) have been shown to bind extracellular matrix components from the host [12]. On the surface of leptospires, OMPs and lipopolysaccharide (LPS) are the main virulence factors interacting with the host tissues and immune response [12]. During disease, most of the specific antibodies produced are against the immuno-dominant LPS structure [13]. Unfortunately, the anti-LPS cross-protective response is limited to closely related serovars [6], and there are 24 serogroups containing over 300 serovars [14]. In the bloodstream, leptospires are able to escape coagulation and the innate immune system, thereby promoting their dissemination in host tissues and resultant tissue damage [6,15]. Invasion, dissemination, and colonization by the pathogen are supported by the differential expression of numerous virulence factors [16]. Nevertheless, surface-exposed molecules are of particular interest to vaccinologists, considering their vantage point at the interface of host-pathogen interactions.

CONTACT Alan J. A. McBride alan.mcbride@ufpel.edu.br Biotechnology Department, Centre for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Vaccine development studies are mainly focused on recombinant antigens, with the most promising targets being the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins, Table 1 and Table S1. In this review, we aim to provide an update on the state-of-the-art of leptospirosis vaccinology, to present a streamlined protocol for the discovery of new vaccine candidates and to identify the knowledge gaps which need to be filled in order to accelerate development of an effective universal vaccine against this deadly disease.

2. The current landscape of leptospirosis vaccinology

Even though it is over 100 years since the bacteria was identified, the real impact of leptospirosis on public health remains underestimated. To reduce the incidence and control the disease, there is an urgent need for new approaches to vaccine development. Here, we will focus on the recombinant vaccines against leptospirosis, highlighting the main achievements and their impacts. For the purposes of this review, we adopted the following inclusion criteria for vaccine candidates: that they conferred significant protection (Fisher exact test (two-tailed), $P < 0.05$) [25]; and that they were tested in more than one independent experiment.

Vaccines composed of inactivated whole cells (bacterins) have been used for over 100 years and are the only vaccines currently licensed for the control of leptospirosis [1,15,26].

They are mainly for animal use, but in countries such as France, Cuba, China and Japan, bacterins are approved for use in at-risk human populations [27]. Although there are some downsides to the use of bacterins, they have significantly reduced the incidence of the disease and remain one of the most viable strategies to control the infection in humans [28]. These disadvantages include adverse reactions related to bacterial LPS and/or growth media components, short-term protection (memory B-cells are not induced as LPS, the predominant immunogen in bacterins, is a T-independent antigen) and the lack of cross-protection [3,25,29,30]. These factors are the most probable explanation for the rejection of bacterins by the developing countries most affected by leptospirosis.

Several studies are ongoing to investigate whether vaccination with live attenuated strains can achieve longer-lasting protection. A promising study of a live attenuated vaccine reported an efficacy of 60–100% and heterologous cross-protection [31]. However, live attenuated vaccines are considered less safe due to concerns over the possibility of reversion to virulence, an issue previously observed with attenuated viral vaccines [32]; although this risk can be minimized by deleting several virulence genes, as reviewed in [33]. These concerns stimulated more recent research into recombinant vaccines and their development [34,35], either as live recombinant strains or subunit

Table 1. Recombinant vaccines that induced significant, reproducible, protection against leptospirosis.

Protein ^a	Vaccine formulation			Challenge				Sterile immunity	References
	Type	Adjuvant ^b	Route ^c	LD ₅₀ equivalent	Type ^d	% Efficacy ^e			
LigA (68–1224) + LigB (68–1191) ^f	Subunit	FA	SC	1000x	HOM	100	No		[17]
LigA (852–1224) ^g				20x		100			
LigA (625–1224)						62.5–100			
LigA (631–1224) ^g		Xanthan gum		36x		100			
LigA (631–1224) ^g		FA		20x		100			
LigA (631–1224)		AlOH		100x		100			[45]
		FIC				87.5–100			
		AlOH				80.0–100			
		FIC				75.0–100			
LigA (631–1224) + 6 OMPs ^h		Liposomes		10x		87.5			
LigA (631–1225)		PLGA	IM	2.5x		75.0		Yes	[22]
LigA (631–1225)		AlOH				80.0–100			
LigB (131–645)						66.6–85.7			
LigB (31–630) + (630–1418) + (1418–1890) ^h						50.0–71.4			
LigB (31–630) ^h						100			
RecA ^g	Prime-boost	DNA	IM	5x	HET	83.3–100	Yes	No	[44]
						100			
						83.3–100			
						100			
						83.3			
FlitD ^g	Subunit	Leptosomes	SC	10x	HOM	75.0			[47]
Lp0607 + Lp1118 + Lp1454									
Lp0607 + Lp1118 + Lp1454		Smegmosomes		100x		75.0			[48]
6 OMPs ^h									
		AlOH				50.0–70.0			[45]

^aProtein: the amino acids in the recombinant protein (or encoded in the DNA) are shown in brackets.

^bAdjuvant type: AlOH: Aluminum hydroxide; FIC: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium flagellin; Xanthan gum: Polysaccharide derived from *Xanthomonas* spp.; FA: Freund's adjuvant: one dose with complete Freund's adjuvant and a subsequent dose with incomplete Freund's adjuvant; Leptosomes: Liposomes from lipids of *L. biflexus*; Escheriosomes: Liposomes made from *Escherichia coli* lipids; Smegmosomes: Liposomes made from *Mycobacterium smegmatis* lipids; PLGA: Microspheres composed of poly lactic-co-glycolic acid.

^cImmunization route: IM: Intramuscular; SC: Subcutaneous.

^dChallenge type: HOM: Challenge with a homologous serovar; HET: Challenge with a heterologous serovar.

^eEfficacy is expressed as the proportionate reduction in disease attack rate between the control and vaccinated groups [24].

^fA mouse model was used in these experiments.

^gTwo independent experiments, all the others were from three or more independent experiments.

^hTwo experiments were significant.

ⁱ6 OMPs: Pool of the outer membrane proteins Lp11 + Lp21 + Lp22 + Lp25 + Lp35 + Lsa30.

vaccines composed of recombinant antigens that are relatively easy to produce as highly purified proteins that can be either synthesized or heterologously expressed in large scale [15,36].

The most extensively studied vaccine candidates to date are the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins [37]. These surface-exposed proteins are highly conserved and are only found in the pathogenic *Leptospira* spp., reviewed in [38]. Initially discovered using convalescent human sera, they were later shown to be upregulated during infection [37,39] and are likely to be involved in adhesion to host cells [40]. Vaccines using the LigA or LigB recombinant proteins have demonstrated a wide range of protection, dependent on the vaccine composition and the challenge methods. Recombinant proteins based on the unique C-terminal region of LigA (LigANI) and the N-terminal portion of LigB (LigBrep), which is almost identical to that of LigA, have been used in different approaches to confer protection against leptospirosis, see Table 1. Numerous independent research groups have shown that LigANI and aluminum hydroxide (AlOH) adjuvant confers robust protection against lethal challenge, ranging from 80% to 100%. However, LigA is not present in all pathogenic species, potentially limiting its role in a universal vaccine against leptospirosis. LigBrep and AlOH elicited high protection levels (50–100%) in several studies and, importantly, LigB is highly conserved in all pathogenic *Leptospira* spp. Recently, Hsieh and collaborators demonstrated the importance of understanding the molecular structure of epitopes for intelligent vaccine design [41]. Using X-ray scattering, the authors determined the structure of the region of LigB that is involved in protein adhesion and identified the epitopes available for interaction with antibodies. When the antigenic epitopes were combined in a chimeric recombinant protein this improved efficacy compared to previous LigB vaccine preparations. In an additional study, Ptak and collaborators analyzed the thermostability of the LigA and LigB domains and observed that not all domains were stable at physiologically relevant temperatures, suggesting that thermostability could play a role in protein function [42]. These findings highlight the importance of dissecting the structural and biophysical characteristics of vaccine candidates toward improved understanding of challenge outcomes. This information will be increasingly important in structure-activity-relationship (SAR) studies during the pre-clinical development stage.

FlhD, a flagellar hook-associated protein required for flagellar elongation, was identified from an expression library of *L. interrogans* serovar Autumnalis, which was screened using pooled patient sera [43]. Further analysis found that FlhD is highly conserved among pathogenic leptospires. However, it induced significant protection (83%) as either a DNA or a prime-boost vaccine only following a heterologous challenge [44]. In the homologous challenge, while 4/6 hamsters were protected, this was not significant using the Fisher two-tailed analysis, possibly as a result of using too few animals per group.

Several OMPs (Lp11, Lp21, Lp22, Lp25, Lsa30, and Lp35), identified using a bioinformatics approach, induced a partially protective immune response when pooled in a single vaccine preparation, see Table 1 [45]. In addition, when these six OMPs

co-administered with LigANI and the adjuvant FlhC, hamsters were significantly protected (75%) against lethal challenge and 72% of the animals exhibited sterilizing immunity.

Another bioinformatics study identified 12 OMPs [46], and while none of the OMPs induced a protective response when administered individually, three Lp0607 (Mcell), Lp1118 and Lp1454 showed promising results. When these three recombinant proteins were mixed with liposomes from nonpathogenic bacteria, they significantly protected hamsters against challenge [47,48].

Surprisingly, cytosolic proteins have also been shown to elicit protective immunity even though they are not the logical choice for vaccine candidates as they are not generally thought to be expressed on the bacterial surface. Recently, recombinase A (RecA), a cytosolic protein, protected 83% of immunized animals against homologous and heterologous challenges and induced sterilizing immunity [44]. Although several antigens have elicited sterilizing immunity (Table 1), this is not generally considered a priority for a leptospiral vaccine since person-to-person transmission of leptospirosis is not considered to be a risk [27]. As the search for novel protective candidates is limited by several logistical constraints, including the indispensable use of experimental animals and funding, the field has tended to focus on OMPs, as these are more likely to elicit protective immunity than cytosolic proteins.

Overall, these findings provide a source of antigens that can be moved forward in the vaccine development pipeline, although novel targets are necessary for the development of a universal vaccine. Screening surface antigens recognized by convalescent sera have led to successful outcomes with LigA and LigB. However, this has proven to be a weak predictor for the development of an effective leptospiral vaccine as several other OMPs have been tested in different vaccine compositions and the spectrum of protection ranged from non-protective to 100%, as reviewed in [38]. It seems likely that a focus on the discovery phase of vaccine development with strategies such as reverse and structural vaccinology data should improve the identification of novel vaccine candidates. Furthermore, target discovery based on host-adapted bacteria is an emerging approach in several infectious disease fields, ranging from antimicrobial discovery to diagnostics and vaccine development [49–51]. In addition, host-adapted *Borrelia burgdorferi* upregulate expression of OspA, a component of the human vaccine against Lyme disease [52]. This approach relies on the widely accepted notion that pathogens perceive and respond to host-specific stimuli during infection through differential gene expression and, thereby, *in vitro*-grown organisms are unlikely to be an accurate model of the *in vivo* state of the pathogen. The use of host-adapted bacteria in leptospirosis vaccine development will enrich the pool of candidate targets in the discovery phase and potentially reduce the attrition rate in challenge studies.

3. Adjuvants

Although subunit vaccines are inherently safer than bacterins, the immunogenicity of these antigens is not as efficient as whole-cell vaccines [53,54]. The use of material that improves

the establishment of cellular or humoral immune responses against these antigens is therefore an important step in vaccine development [54]. In addition, adjuvants can reduce the amount of antigen required per immunization, potentially minimizing side-effects at the vaccination site [15]. Furthermore, screening the same antigen with different adjuvants may provide insights into the specific immune mechanisms by which the antigen protects, and therefore help to guide vaccine design. Leptospiral recombinant vaccines have been formulated with several adjuvants and the most commonly used are AIOH and Freund's adjuvant (FA), see Table 1 and S1 [34]. Other adjuvants used included: FlIC, a protein from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium flagellin; xanthan gum; liposomes derived from nonpathogenic microorganisms; and microspheres, reviewed in [34]. The most important conclusion we can draw is that AIOH should be regarded as the adjuvant of choice for screening new vaccine candidates. When the recombinant vaccine conferred protection and more than one adjuvant was tested, the formulation containing AIOH always induced a protective immune response, Table 1. This strategy will allow us to significantly reduce the number of challenge experiments being carried out during target discovery and validation and thereby the number of animals, see Figure 1. Once a vaccine candidate has been shown to protect, different adjuvants can be evaluated toward improving the efficacy of the vaccine formulation.

4. Recent developments in leptospiral vaccine target discovery

Most of the conventional methods used to identify leptospiral vaccine candidates were based on *in vitro* grown leptospires [25]. However, Caimano and colleagues [55] and Nally and colleagues [56] showed that leptospires cultivated in dialysis membrane chambers (DMCs) implanted in the peritoneal

cavity of rats substantially altered their transcriptome and proteome in response to mammalian host-specific signals. These host-adapted proteins represent a potentially valuable source of vaccine candidates.

Target discovery can be performed *in silico* by reverse vaccinology (RV), which starts with an analysis of the entire genome using bioinformatics to predict surface-exposed antigens that represent potential vaccine candidates, without any requirement to cultivate the pathogen [57,58]. This usually results in the identification of hundreds of target proteins that are expressed heterologously, in, e.g. *E. coli*, these recombinant proteins are subsequently screened in the laboratory to evaluate their potential to induce a protective immune response. The recently proven success of RV in the form of a licensed Meningitis B vaccine provides an optimistic perspective for leptospirosis vaccinology [59,60]. RV has been used to screen leptospirosis immunogens during vaccine design and is discussed extensively in [61]. Recently, our research group discovered novel antigens by mining the genome of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain L1-130 (LIC), and we were able to refine the list down to 18 transmembrane β -barrel proteins and eight OMPs that were well conserved among 20 different *Leptospira* spp [62]. Predicting 3D structures, known as structural vaccinology (SV), is laborious, seldom performed and, until recently, confidence in the predicted structures was not high [63]. Nevertheless, this SV approach allowed us to assign function to the proteins found by RV and, more importantly, map their major histocompatibility complex II (MHC-II) surface-exposed immunogenic epitopes [62].

Lata and collaborators [64] also analyzed the proteome of LIC, ranking proteins by antigenicity and subcellular location. Of the 21 proteins with the highest antigenicity score, two were identified as OMPs and one of these, a lipoprotein, was analyzed for B-cell (linear and conformational) and T-cell

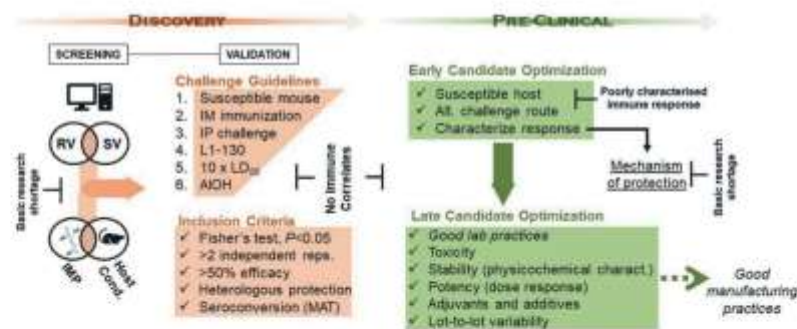


Figure 1. Schematic representation of a standardised protocol for the evaluation of vaccine candidates. In the discovery phase, reverse (RV) and structural vaccinology (SV) are utilized. The data are cross-referenced with results obtained from experimental approaches in which host adapted leptospires are immunoprecipitated (IMP) with patient sera. A lack of knowledge regarding the basic microbiology of this pathogen is limiting at this stage. Candidate antigens arising from the screening steps should be tested in challenge experiments, which could, if standardized to follow pre-set guidelines, provide valuable information for the following steps. Antigens meeting the inclusion criteria can be pushed forward into pre-clinical development. The lack of immune correlates generates a bottleneck at the end of the discovery stage since every antigen must go through a challenge experiment before moving forward. Utilization of susceptible hosts and alternative challenge routes should occur early-on in the pre-clinical development phase. The poorly characterised immune responses of such hosts and lack of basic knowledge of the pathogen hinder attempts at characterizing the responses generated by the vaccine candidates. At this stage, the lack of immune correlates severely limits the optimization of candidates which should occur moving forward.

(helper and cytotoxic-T-lymphocytes (CTL)) epitopes. In a novel approach, the CTL epitopes were evaluated for docking with HLA class I molecules and the stability of these structures was determined and a potential peptide vaccine candidate for leptospirosis. Using an inverted approach, Zeng [65] applied a negative RV selection strategy, combining a pan-genome analysis to identify cytoplasmic and inner membrane proteins (non-vaccine candidates) among 17 *L. interrogans* strains. Once these proteins were excluded from the list the remainder were novel potential vaccine candidates. Together, these results exemplify the vast array of unexplored antigens that can be revealed by RV that, combined with SV, could lead to the development of effective leptospirosis vaccines.

Our group is evaluating whether these approaches can be further refined using cell-surface immunoprecipitation (CSIP) techniques in combination with a comprehensive bioinformatics analysis to identify only the antigens exposed on the surface of the pathogen [62,66,67]. CSIP experimentally identifies antigens exposed on the surface of live intact bacterial cells [66]. Immunoprecipitation with sera from convalescent patients followed by protein identification using mass spectrometry can detect potentially immunoprotective seroreactive proteins [66]. Although this approach may provide satisfactory results when applied alone, there are potential synergistic benefits when combined with *in silico* RV and SV data to generate a rigorously selected pool of antigens. Currently, our group is utilizing *in vivo*-adapted leptospiral cells for CSIP to detect surface-exposed antigens that are differentially expressed in response to mammalian host signals during infection. Cross-referencing this data with RV and SV results has identified promising, novel, vaccine candidates, which are now being evaluated in challenge experiments.

Additionally, these approaches can provide valuable information regarding host-pathogen interactions. Increasing efforts toward understanding the basic mechanisms underlying leptospiral pathogenesis and the host immune response will lead to improvements in rational vaccine design. Overcoming major hurdles such as the discovery of immune correlates will likely enable high-throughput antigen validation and optimization propelling the field of human leptospirosis vaccinology toward clinical trials.

5. The host-pathogen interface and vaccine development

Leptospiral pathogens infect mammalian hosts through mucosal barriers or skin lesions, initially triggering an innate immune response through NOD-like (NLR) and toll-like receptor (TLR) recognition [15]. Recently, the surface-exposed LipL21 antigen was shown to bind peptidoglycan, thereby preventing its degradation into NOD-recognizable muropeptides and enabling leptospires to bypass NOD1 and NOD2 activation [68,69]. These receptors signal through the NF- κ B and MAPK pathways, leading to the production of inflammatory cytokines, leukocyte recruitment and the production of inducible antimicrobial molecules. Importantly, NLRs acting in synergy with TLR receptors can coordinate an adaptive immune response [70]. Furthermore, the activity of leptospiral

glycolipoprotein in coordination with TLR signaling leads to NLRP3 inflammasome activation and ultimately to the secretion of interleukin (IL)-1 β [71]. IL-1 β is a potent proinflammatory cytokine mediating pyroptosis, fever, inflammatory pain, cell proliferation and other effects central to inflammation.

The activities of the TLRs during leptospirosis have been demonstrated in human and murine cells. The most important leptospiral virulence factor involved in TLR signaling is lipopolysaccharide (LPS). Mutating the genes in the LPS biosynthetic pathway leads to virulence attenuation in the acute disease model and failure to colonize kidneys of the carrier host [72,73]. Nevertheless, the mechanisms by which LPS promotes virulence remain unclear. In the non-susceptible murine host, leptospiral LPS is recognized by TLR4, which triggers early production of leptospire-specific IgM [74]. However, in humans, this virulence determinant is recognized by TLR2/TLR1 heterodimers and not TLR4, which is unusual compared to other Gram-negative pathogens [75,76]. This is likely due to the structurally unique leptospiral lipid A, although it seems to require the polysaccharide components of LPS or a lipoprotein for TLR2 recognition [76].

Leptospiral lipoproteins, including the immunodominant LipL32, are recognized by the innate immune system via TLR2 [75]. Although the function of LipL32 is poorly understood, it has been shown to bind plasminogen and extracellular matrix components possibly contributing to invasion and renal colonization [77,78]. The non-essential nature of this protein for virulence or *in vitro* growth illustrates perfectly the redundancy often seen among leptospiral lipoproteins [79]. LipL32 is the most abundant lipoprotein of leptospires, eliciting a strong, albeit, non-protective immune response [77]. TLR2-mediated inflammation in the kidneys leading to nephritis was LipL32 dependent in a zebrafish model, with LipL32 expressed soon after infection [80]. Interestingly, post-translational modifications (PTMs) unique to host-adapted leptospires have been observed in LipL32, and the modified lipoprotein was approximately fivefold less immunogenic than LipL32 from bacteria grown *in vitro*, suggesting that PTMs can play a role in immune evasion [81]. PTMs, specific to host-adapted leptospires, have since been shown on several other antigens in a study done in collaboration with our research group using DMCs implanted in the rat peritoneal cavity [56]. Further dissecting when and how these modifications occur in leptospires and in the context of heterologous protein expression may prove useful for the development of vaccine candidates.

Following recognition by the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), e.g. LPS, internalization of leptospires occurs via actin cytoskeleton rearrangement, mediated by bacterial and host factors [82]. Important leptospiral proteins are thought to facilitate phagocytosis. Deletion of the mammalian cell entry protein (Mce) in the genome of pathogenic leptospires hampered their ability to infect macrophages and hamsters and this was restored upon complementation [83]. Additionally, when Mce was heterologously expressed in *L. biflexa*, the mutant saprophytes gained the capability to adhere to and invade macrophages [83].

Upon entry, leptospires could survive and replicate in human macrophages, but less so in murine macrophages,

probably due to their subcellular location, which is cytosolic in human and lysosomal in murine phagocytes [84]. Even though the factors enabling intramacrophage survival remain unclear, it is possible that phagocytes may provide temporary respite from the immune response as the pathogen traffics to the kidney. In the zebrafish model, leptospires survived for up to 2 days within macrophages, with infected cells migrating to a specific tissue site, suggesting that these phagocytic cells contributed to tissue invasion [85]. However, reproducing these results in a mammalian host is needed to further corroborate this hypothesis. Additionally, a recent study showed that macrophage depleted mice infected with *L. interrogans* showed increased bacteremia [86], suggesting that if there is a role for macrophages in promoting dissemination, it may be limited to susceptible hosts. Recruitment of neutrophils is mediated by pro-inflammatory cytokines such as IFN γ . Neutrophilia is often observed during leptospirosis, although its role is still being investigated. A recent study showed that leptospires induced a pro-inflammatory phenotype in human neutrophils via TLR2 [87]. This resulted in increased neutrophil adhesion to collagen, secretion of IL-8 associated with greater migration, as well as IL-1 β and IL-6 that prolonged neutrophil survival. Although only the pathogenic leptospires avoided phagocytosis. Importantly, the activated neutrophils secreted antimicrobial agents with extracellular activity. This included neutrophil extracellular DNA traps (NETs), which is the release of DNA and bactericidal enzymes that form barriers known as NETs [88]. Leptospires induced the formation of NETs by human neutrophils and NETosis, resulting in the trapping and killing of pathogens [89]. However, pathogenic leptospires can secrete nucleases which degrade DNA, suggesting that they may be able to evade NETosis [89]. Furthermore, the surface lipoproteins LipL21 and LipL45 inhibited the activity of neutrophil myeloperoxidase, an enzyme which acts both in phagosomes and extracellularly, producing the highly toxic hypochlorous acid from peroxide and chloride anions [90]. This data, together with results demonstrating the role of leptospiral surface lipoproteins for immune evasion, highlights their importance as potential vaccine candidates.

The complement system is an important part of the innate immune arsenal. Nonetheless, it is widely accepted that leptospires can bypass all three complement pathways. The mechanisms underlying complement evasion by leptospires have been extensively reviewed by Fraga and collaborators [91]. A pool of leptospiral surface antigens has been shown to be involved in complement evasion. Importantly, LigA and LigB have been shown to mediate complement evasion by binding plasminogen, which when converted to plasmin can degrade complement components [92,93]. These leptospiral surface proteins, together with LenA, LenB, and LcpA, recruited complement regulators, such as factor H, which retained its activity as an inhibitor of the alternative pathway [91]. Also, a novel protein on the surface of *L. interrogans* has been shown to interact with plasminogen and complement proteins [94]. Furthermore, this pathogen can directly inhibit the complement cascades by secretion of proteases which cleave complement components. Novel proteins with proteolytic activities against complement continue to be described [95]. Recently, the downregulation of factor H-binding

proteins was demonstrated in culture-attenuated leptospires and this was associated with diminished survival in human serum [96]. This underlines the importance of these virulence factors for bacterial invasion and dissemination through the bloodstream.

Since a significant part of disease control is done innately, leptospires have evolved a vast array of virulence factors to counteract and evade this aspect of the immune system. Utilizing these factors in combination with infection routes which mimic a real infection and do not bypass important innate barriers could lead to the development of a more effective vaccine. Several challenge methods using mucosal or transcutaneous infection routes have been successfully optimized for mice [97], hamsters [98] and guinea pigs [99]. The Haake and Gomes-Solecki groups used a lipidated form of the LigANI in an oral vaccine against two challenge routes [100]. Interestingly, higher levels of protection were observed with challenges via the natural route of infection (intradermal) emphasizing the important role of biologically relevant challenge routes during vaccine candidate optimization. Further exploring these methods may highlight previously unknown or underrepresented antigens.

Moreover, the stimulation of innate immune factors indirectly through adjuvants or directly is an important aspect of vaccine development. Exciting results have been obtained using a synthetic molecule or *Lactobacillus plantarum* as agonists of TLR-2 and NOD2 to prime the immune system and trigger innate immune memory, where increased reactivity of innate immune cells was observed in pre-treated mice [101]. The responses of several elements of innate immunity were systemically enhanced for up to 3 months after treatment with a synthetic agonist, including bactericidal macrophage activity, IL6, and IFN γ production [102]. Pre-treatment with these innate immune agonists also decreased dissemination and overall bacterial burdens [101,102]. Together, these studies provide new tools for vaccine development, and further elucidate the innate immune mechanisms underlying leptospirosis. As the role of the innate immune system continues to be dissected, it will certainly improve our understanding of challenge experiment outcomes, driving the optimization of existing vaccine candidates and the discovery of novel approaches.

6. Conclusions

The development of a universal vaccine against leptospirosis is only likely to be achieved through the recombinant vaccine route, and although we appear to be no closer than we were 20 years ago, there are encouraging results that show the field is making progress. Several hundred novel vaccine candidates have been identified using *in silico* approaches combined with the novel application of experimental confirmation of the surface-exposure of these proteins. However, progress is inhibited by the lack of correlates of immunity and absence of a consensus on the protocols used to evaluate vaccine candidates in a suitable animal model. This has made it difficult to interpret the published data and overcome the hurdles toward moving potential vaccine candidates into pre-clinical and clinical trials. We propose that establishment of a standardized protocol for the evaluation of efficacy of recombinant vaccines

be a priority for the field that would enable it to overcome these shortcomings.

7. Expert opinion

The year 2019 is the 20th anniversary of the first paper that described a recombinant vaccine that conferred significant protection in a lethal model of leptospirosis [35]. Since then, many recombinant vaccines have been evaluated, however, no vaccine candidates have progressed to clinical trials. There are several reasons for this: 1) we need better vaccine candidates; 2) there is a lack of consensus on the ideal laboratory animal model of leptospirosis, including the challenge dose and strain; 3) the poor reproducibility between protection studies; and most importantly 4) the lack of correlates of immunity for leptospirosis. The authors therefore believe that a universal vaccine is likely to take at least 10–15 years for product approval.

However, it is not all doom and gloom. For this review, we collated all of the published data associated with recombinant vaccines for leptospirosis since 1999 and we have been able to draw several conclusions that should aid the discovery and development of vaccine candidates toward the goal of a universal vaccine. We also note that the discovery phase for the identification of novel antigens has been significantly improved with the use of the techniques such as RV, SV, CSIP; together with epitope mapping of the surface-exposed domains of these proteins. We should also recognize that there are significant knowledge gaps in the basic microbiology of *Leptospira* spp., including host–pathogen interactions. However, this field is rapidly evolving, and the availability of hundreds of genomes should be of benefit. Nevertheless, the meaningful interpretation of this data represents a potential holdup that will slow progress. A large number of leptospiral genes, including virulence factors, do not have an assigned function and many are unique to *Leptospira* spp. with no known orthologues in other bacteria [103,104]. The functional characterization of these proteins will provide much needed information and could identify additional vaccine candidates. The application of a systems biology approach would greatly aid our understanding and provide new targets for possible interventions. In addition, we now know that post-translation modifications occur in *Leptospira* spp. and this will likely have a major impact on the production of the recombinant proteins used in vaccine preparations. However, unless we can identify *in vitro* assays to screen the hundreds of proteins that have and will be identified, there will be a serious bottleneck between discovery and the evaluation of these potential vaccine candidates.

Several small animal models have been used to evaluate vaccine candidates, and while the hamster is the currently recommended model, mouse, guinea pig, and gerbil models have been used. The main advantage of the hamster is that it recapitulates human symptoms, e.g. kidney failure and pulmonary hemorrhaging are frequently observed following challenge. However, the only commercially available tools for the characterization of the immune response are anti-hamster antibodies. There are no available kits to characterize the cellular immune response; a shortcoming that could significantly impact vaccine discovery.

Most studies have focused on inducing a humoral immune response, and little thought has been given to any potential role for a T-cell response. Recently, the Wertz and Gomes-Solecki groups evaluated several mouse models and while wildtype mice are resistant to leptospirosis, a number of knockout (KO) models showed promising results. Importantly, there are a wide range of commercially available kits for the characterization of the immune response in these KO mouse models [105].

The field also urgently needs to agree upon an improved classification system for *Leptospira* spp. The current system of serological typing has identified over 300 pathogenic serovars belonging to 18 serogroups and this has caused a certain amount of confusion with respect to claims of cross-protection. While several multilocus sequence typing, variable number tandem repeat, and pulsed-field gel electrophoresis schemes have been proposed for the molecular typing of *Leptospira* spp., none has emerged as the typing method of choice. The adoption of a standard molecular typing scheme would allow us to clearly define homologous and heterologous challenges. At present, strains that belong to the same serogroup should be considered as homologous challenges; while challenge strains belonging to different serogroups should be regarded as heterologous challenges, with respect to the source of the recombinant vaccine. Furthermore, inspection of the results of the evaluation of the numerous vaccine candidates to date reveals that there are no accepted standards for the routes of immunization, adjuvant or challenge strain, dose and route of infection, see Table 1 and S1.

While the lack of immune correlates for leptospirosis is a significant barrier, several research groups are focusing on this problem using the information from other spirochetes, e.g. *Treponema* spp. and *Borrelia* spp. This includes the development of an opsonophagocytosis assay using macrophages from vaccinated animals or potentially *in vitro* stimulated macrophages, thereby reducing the need for laboratory animals during the initial screening stage. Another potential assay is the inhibition of leptospiral growth by sera from immunized animals, similar to one of the assays used in the screening of the MenB vaccine candidates identified by RV [60].

If we look at the vaccine data available to date, Table 1 and Table S1, a wide range of challenge doses (2.5 to 1000× LD₅₀) and strains were used. The route of infection tended to be intraperitoneal but also included more natural routes, e.g. ocular and intradermal. Most animals were immunized either by subcutaneous or intramuscular injection; also, the amount of recombinant protein used in the vaccine formulation varied considerably between 3 and 100 µg/dose. These variations could account for the different efficacies reported. This problem could potentially be solved centralizing the evaluation of the most promising of the vaccine candidates at one or two laboratories. This would dramatically improve reproducibility as the animal model, vaccine formulation, challenge strain; and the dose could be standardized.

Funding

A McBride and J McFadden are supported by a research grant from the Royal Society (IC170171). A McBride is also supported by a stipend from

the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development [CNPq - 311460/2017-8]. CR Felix and BS Siedler are also the recipients of postdoctoral stipends from the Royal Society (IC170171) while LN Barbosa is the recipient of a PhD stipend and GR Timm the recipient of an MSC stipend from CAPES, Brazil.

Declaration of interest

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Reviewer Disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

ORCID

Bianca S. Siedler <http://orcid.org/0000-0002-8916-6677>
 John Joe McFadden <http://orcid.org/0000-0003-2145-0046>
 Alan J. A. McBride <http://orcid.org/0000-0001-9682-540X>

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (+) or of considerable interest (++) to readers.

- Adler B. History of leptospirosis and *Leptospira*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:1–9.
- Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010 Sep;5(9):1413–1425.
- Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:65–97.
- Vincent AT, Schietekkatte O, Goarant C, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 May;13(5):e0007270.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003898.
- An estimation of the global burden of leptospirosis using published epidemiological data.**
- Picardieu M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*. 2017 May;15(5):297–307.
- ++ An excellent review in which leptospiral virulence factors are discussed and includes how genomics, taxonomy and molecular factors are involved in pathogenesis.**
- Picardieu M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013 Jan;43(1):1–9.
- Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, et al. Global burden of leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0004122.
- Bulach DM, Zuercher RL, Wilson P, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 26;103(39):14560–14565.
- Goldstein SE, Charon NW. Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1988;9(2):101–110.
- Wunder EA Jr, Figueira CP, Benaroudj N, et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. *Mol Microbiol*. 2016 Aug;101(3):457–470.
- Rossini AD, Teixeira AF, Souza Filho A, et al. Identification of a novel protein in the genome sequences of *Leptospira interrogans* with the ability to interact with host's components. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019 Jan 22;S1684–1182(18):30200–7.

- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 2011 May;73(5):408–419.
- Levett PN. Systematics of leptospiroaceae. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:11–20.
- Vernel-Paulliac F, Werts C. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. *Microbes Infect*. 2018 Oct-Nov;20(9–10):578–588.
- This review highlights the main immunological barriers against leptospirosis and the pathogen's ways of bypassing these barriers.**
- Vk C, Ty L, WY L, et al. Leptospirosis in human: biomarkers in host immune responses. *Microbiol Res*. 2018;207:108–115.
- Kozumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 2004 Mar 29;22(11–12):1545–1552.
- Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, et al. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Dec;5(12):e1422.
- A research paper that describes the LigA domains that are necessary for protection against leptospirosis.**
- Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. 2007 Aug 14;25(33):6277–6286.
- Bacelo KL, Hartwig DD, Seikas FK, et al. Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:636491.
- Faisal SM, Yan W, McDonough SP, et al. Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine*. 2009 Jan 14;27(3):378–387.
- Conrad NL, Cruz McBride FW, Souza JD, et al. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Mar;11(3):e0005441.
- A research paper describing a LigB sub-unit vaccine that conferred high, reproducible, levels of protection and sterilizing immunity.**
- Yan W, Faisal SM, McDonough SP, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect*. 2009 Feb;11(2):230–237.
- Orenstein WA, Bernier RH, Dondero TJ, et al. Field evaluation of vaccine efficacy. *Bull World Health Organ*. 1985;63(6):1055–1068.
- Adler B. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:251–272.
- Ido Y, Hoki R, Ito H, et al. The prophylaxis of Weil's disease (*Spirochaeta* *icterohaemorrhagica*). *J Exp Med*. 1916 Nov 1;24(5):471–483.
- Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3–4):287–296.
- Xu Y, Ye Q. Human leptospirosis vaccines in China. *Hum Vaccin Immunother*. 2018 Apr 3;14(4):984–993.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, et al. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Oct;18(5):376–386.
- Zuercher RL. Host response to leptospira infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:223–250.
- Murray GL, Simawaranon T, Kaewraemruan C, et al. Heterologous protection elicited by a live, attenuated, *Leptospira* vaccine. *Vet Microbiol*. 2018;223:47–50.
- Bull JJ. Evolutionary reversion of live viral vaccines: can genetic engineering subdue it? *Virus Evol*. 2015 Jan;1(1):vex005.
- Galen JE, Curtiss R 3rd. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine*. 2014 Jul 31;32(35):4376–4385.
- Teixeira AF, Fernandes LGV, Cavenague MF, et al. Adjuvanted leptospiral vaccines: challenges and future development of new leptospirosis vaccines. *Vaccine*. 2019 Jul 9;37(30):3961–3973.
- An important review of the adjuvants tested in leptospiral vaccines.**
- Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*. 1999 Dec;67(12):6572–6582.

36. da Cunha CEP, Bettin EB, Bakry A, et al. Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera. *Vaccine*. 2019 Mar 22;37(13):1844–1852.
37. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*. 2003 Aug;49(4):929–945.
38. Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin*. 2011 Nov;7(11):1215–1224.
39. Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, et al. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):70–78.
40. Pinne M, Matsunaga J, Haake DA. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol*. 2012 Nov;194(22):6074–6087.
41. Hsieh CL, Ptak CP, Tseng A, et al. Extended low-resolution structure of a *Leptospira* antigen offers high bactericidal antibody accessibility amenable to vaccine design. *Elife*. 2017 Dec 6;6:e30051.
- **A report of the most complete 3D structure of the LigB immunoglobulin-like domains to date.**
42. Ptak CP, Akif M, Hsieh CL, et al. Comparative screening of recombinant antigen thermostability for improved leptospirosis vaccine design. *Biotechnol Bioeng*. 2019 Feb;116(2):260–271.
43. Raja V, Natarajaseenivasan K. Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). *Crit Rev Microbiol*. 2015 Feb;41(1):1–17.
44. Raja V, Sobana S, Mercy CSA, et al. Heterologous DNA prime-protein boost immunization with RecA and Flid offers cross-clade protection against leptospiral infection. *Sci Rep*. 2018 Apr 24;8(1):6447.
- **A research paper that describes DNA and prime-boost vaccines that induced significant and heterologous protection against leptospirosis.**
45. Monaris D, Sbraggio-Almeida ME, Dib CC, et al. Protective immunity and reduced renal colonization induced by vaccines containing recombinant *Leptospira interrogans* outer membrane proteins and flagellin adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*. 2015 Aug;22(8):965–973.
46. Chang YF, Chen CS, Palaniappan RU, et al. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. *Vaccine*. 2007 Nov 23;25(48):8190–8197.
47. Faisal SM, Yan W, McDonough SP, et al. Leptosoma-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model. *Vaccine*. 2009 Nov 5;27(47):6537–6545.
48. Faisal SM, Yan W, McDonough SP, et al. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. 2009 Oct 19;27(44):6129–6136.
49. Rodrigues Felix C, Gupta R, Geden S, et al. Selective killing of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by marine natural products. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Aug;61(8):e00743–17.
50. Pethe K, Bifani P, Jang J, et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat Med*. 2013 Sep;19(9):1157–1160.
51. Sorrentino F, Gonzalez del Rio R, Zheng X, et al. Development of an intracellular screen for new compounds able to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan;60(1):640–645.
52. Crowley H, Huber BT. Host-adapted *Borrelia burgdorferi* in mice expresses OspA during inflammation. *Infect Immun*. 2003 Jul;71(7):4003–4010.
53. Bastola R, Noh G, Keum T, et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*. 2017 Nov;40(11):1238–1248.
54. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, et al. Adjuvants—a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 1993;11(3):293–306.
55. Caimano MJ, Sivasankaran SK, Allard A, et al. A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *PLoS Pathog*. 2014 Mar;10(3):e1004004.
- **An important research paper that describes host-adapted leptospires and how this influenced the transcriptome.**
56. Nally JE, Grassmann AA, Planchon S, et al. Pathogenic leptospires modulate protein expression and post-translational modifications in response to mammalian host signals. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:362.
- **An important research paper on the proteome and PTMs in host-adapted leptospires.**
57. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. 2000 Oct;3(5):445–450.
58. Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, et al. Reverse vaccinology 2.0: human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med*. 2016 Apr 4;213(4):469–481.
- **An important review of the field of reverse vaccinology and the latest advances in vaccine design.**
59. Flacco ME, Manzoli L, Rosso A, et al. Immunogenicity and safety of the multicomponent meningococcal B vaccine (4CMenB) in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr;18(4):461–472.
60. Serruto D, Bottomley MJ, Ram S, et al. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*. 2012 May 30;30(Suppl 2):B87–97.
61. Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, et al. Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 14;18(1):158.
62. Grassmann AA, Kremer FS, Dos Santos JC, et al. Discovery of novel leptospirosis vaccine candidates using reverse and structural vaccinology. *Front Immunol*. 2017;8:463.
63. Yang J, Zhang W, He B, et al. Template-based protein structure prediction in CASP11 and retrospect of I-TASSER in the last decade. *Proteins*. 2016 Sep;84(Suppl 1):233–246.
64. Lata KS, Kumar S, Vagharia V, et al. Exploring Leptospiral proteomes to identify potential candidates for vaccine design against Leptospirosis using an immunoinformatics approach. *Sci Rep*. 2018 May 28(1):6935.
65. Zeng L, Wang D, Hu N, et al. A novel pan-genome reverse vaccinology approach employing a negative-selection strategy for screening surface-exposed antigens against leptospirosis. *Front Microbiol*. 2017;8:396.
66. Newcombe J, Mendum TA, Ren CP, et al. Identification of the immunoproteome of the meningococcus by cell surface immunoprecipitation and MS. *Microbiology*. 2014 Feb;160(Pt 2):429–438.
67. da Cunha CE, Newcombe J, Dellagostin O, et al. Immunoprecipitation of cell surface proteins from gram-negative bacteria. *Bio-Protocol*. 2017;7(9):e2250.
68. Ratet G, Santicchia L, Fanton d'Andon M, et al. LipL21 lipoprotein binding to peptidoglycan enables *Leptospira interrogans* to escape NOD1 and NOD2 recognition. *PLoS Pathog*. 2017 Dec;13(12):e1006725.
69. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*. 2003 May;71(5):2414–2421.
70. Chen G, Shaw MH, Kim YG, et al. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:365–398.
71. Lacroix-Lamande S, d'Andon MF, Michel E, et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 2012 Mar 15;188(6):2805–2814.
72. Murray GL, Srikram A, Henry R, et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*. 2010 Nov;78(3):701–709.
73. Marosián RA, Bartpho T, Bulach DM, et al. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J Med Microbiol*. 2013 Oct;62(Pt 10):1601–1608.
74. Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2669–2677.
75. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001 April;2(4):346–352.

76. Nahori MA, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):6022–6031.
77. Murray GL. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol*. 2013 Mar 23;162(2–4):305–314.
78. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, et al. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One*. 2010;5(6):e11259.
79. Murray GL, Srikanth A, Hoke DE, et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):952–958.
80. Chang MY, Cheng YC, Hsu SH, et al. Leptospiral outer membrane protein LipL32 induces inflammation and kidney injury in zebrafish larvae. *Sci Rep*. 2016 Jun 9;6:27838.
81. Mitchell TD, Eshghi A, Nally JE, et al. Post-translational modification of LipL32 during *Leptospira interrogans* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct;8(10):e3280.
82. Liu B, Wang Y, Guo X, et al. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling method to study the interaction between *Leptospira* and macrophages. *J Microbiol Methods*. 2014;107:205–213.
83. Zhang L, Zhang C, Ojcius DM, et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol Microbiol*. 2012 Mar;83(5):1006–1023.
84. Li S, Ojcius DM, Liao S, et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun*. 2010 Apr;16(2):80–92.
85. Davis JM, Haake DA, Ramakrishnan L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jun 23;3(6):e463.
86. Ferrer MF, Scharrig E, Charo N, et al. Macrophages and galectin 3 control bacterial burden in acute and subacute murine leptospirosis that determines chronic kidney fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:384.
87. Charo N, Scharrig E, Ferrer MF, et al. *Leptospira* species promote a pro-inflammatory phenotype in human neutrophils. *Cell Microbiol*. 2019 Feb;21(2):e12990.
88. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–1535.
89. Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, et al. Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jul;9(7):e0003927.
90. Vieira ML, Teixeira AF, Piddie G, et al. *Leptospira interrogans* outer membrane protein LipL21 is a potent inhibitor of neutrophil myeloperoxidase. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):414–425.
91. Fraga TR, Isaac L, Barbosa AS. Complement evasion by pathogenic *Leptospira*. *Front Immunol*. 2016;7:623.
92. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Breda LC, et al. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunol Lett*. 2016;173:61–68.
93. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, et al. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. *Immunobiology*. 2016 May;221(5):679–689.
94. Cavenague MF, Teixeira AF, Filho AS, et al. Characterization of a novel protein of *Leptospira interrogans* exhibiting plasminogen, vitronectin and complement binding properties. *Int J Med Microbiol*. 2019 Mar;309(2):116–129.
95. Fraga TR, Courrol Ddos S, Castiblanco-Valencia MM, et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis*. 2014 Mar;209(6):876–886.
96. Moreno-Torres A, Malvido-Jimenez IR, Pena-Moctezuma A, et al. Culture-attenuated pathogenic *Leptospira* lose the ability to survive to complement-mediated-killing due to lower expression of factor H binding proteins. *Microbes Infect*. 2019 Mar 25;S1286–4579 (19)30045–0.
97. Sullivan JP, Nair N, Potula HH, et al. Eyedrop inoculation causes sublethal leptospirosis in mice. *Infect Immun*. 2017 Apr;85(4):01050–16.
98. Wunder EA Jr, Figueira CP, Santos GR, et al. Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. *Infect Immun*. 2016 Jul;84(7):2105–2115.
99. Zhang Y, Lou XL, Yang HL, et al. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect Dis*. 2012 Jan 25;12(1):20.
100. Lourdaul K, Wang LC, Vieira A, et al. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun*. 2014 Feb;82(2):893–902.
101. Potula HH, Richer L, Werts C, et al. Pre-treatment with *Lactobacillus plantarum* prevents severe pathogenesis in mice infected with *Leptospira interrogans* and may be associated with recruitment of myeloid cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Aug;11(8):e0005870.
102. Santeccchia I, Vernel-Pauillac F, Rasid O, et al. Innate immune memory through TLR2 and NOD2 contributes to the control of *Leptospira interrogans* infection. *PLoS Pathog*. 2019 May;15(5):e1007811.
103. Bulach D, Adler B. Leptospiral genomics and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018 Apr 26;415:189–214.
104. Zhukova A, Fernandes LG, Hugon P, et al. Genome-wide transcriptional start site mapping and sRNA identification in the pathogen *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:10.
105. Gomes-Solecki M, Santeccchia I, Werts C. Animal models of leptospirosis: of mice and hamsters [Review]. *Front Immunol*. 2017;8(58):58.

An important review of the animal models of leptospirosis with emphasis on the importance of susceptible mouse models.

4.2 Manuscrito 1 - *In vitro* culture conditions affect virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in the hamster model of acute leptospirosis

Manuscrito a ser submetido à Revista Plos Neglected Tropical Diseases

In vitro culture conditions affect virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in the
hamster model of acute leptospirosis

Liana N. Barbosa¹; Guilherme A. Rosa¹; Elias E. B. da Rosa¹; Gabriela N. R. Timm¹; Vítor da Silveira Alba¹; Alice L. de Ávila¹; Johnjoe McFadden³; André A. Grassmann² and Alan J. A. McBride^{1*}

¹ Biotechnology Unit, Technological Development Centre, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Medicine, Pediatrics and Molecular Biology and Biophysics, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, United States of America

³ School of Biosciences and Medicine, Faculty of Health & Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, United Kingdom

*Corresponding author, E-mail: alan.mcbride@ufpel.edu.br (AJAM)

Abstract

Leptospirosis is considered the most widespread zoonosis worldwide, with an estimated of more than 1 million new cases in humans per year and approximately 59,000 deaths. Although leptospires have been cultivated *in vitro* for more than a century, several aspects of the basic microbiology remain unknown, especially the impact of *in vitro* cultivation on the virulence of leptospires. The aim of this work was to evaluate different conditions for *in vitro* growth of *Leptospira* spp. and the corresponding virulence in a hamster model of acute leptospirosis. *L. interrogans* strains Fiocruz L1-130 and RCA and *L. kirschneri* strain 61H were cultivated using commercial EMJH (Difco) medium and in house EMJH (IHM) supplemented with rabbit serum. Temperatures of 28°C and 37°C, different flasks and initial inoculums from 5 to 5×10^4 leptospires in 5 ml were tested to evaluate the *in vitro* growth dynamics of leptospires. Hamsters were infected intraperitoneally with leptospires from different bacterial growth phases to determine the lethal doses for 50% of infected animals (LD₅₀). Leptospires cultivated in both EMJH media at 28 °C showed growth with densities of 10^8 leptospires/ml from 8 to 12 days post-inoculum. Static tubes provided the best growth conditions in both media, and effective bacterial duplication times for the pathogenic strains. Using the IHM at 28°C initial inoculums of five leptospires in 5 ml took 14, 16 and 18 days post-inoculum to be observed under microscopy for the strains Fiocruz L1-130, RCA and 61H, respectively. The commercial EMJH was not effective to growth inoculums smaller than 10^4 leptospiras/ml. The growth of leptospires at 37°C was not effective in either medium. Cultures in the stationary phases demonstrated a significant decline on LD₅₀ when using the IHM medium for the strains Fiocruz L1-130 at 28°C ($P < 0.001$) and 37°C ($P < 0.01$)

and RCA at 28°C ($P < 0.001$). Together, these results show that the IHM medium at 28°C was effective in the growth of leptospires. In addition, leptospires in exponential growth phase are more virulent than spirochetes from stationary cultures in the strains Fiocruz L1-130 and RCA. A protocol for *in vitro* cultivation was established ensuring satisfactory densities of leptospires, growth from smaller inoculums without impact bacterial virulence. This protocol is an important tool for studies of pathogenesis and vaccinology.

Author summary

Leptospirosis has been a global health problem, especially in tropical regions and developing countries. Leptospirosis control requires improvements in basic sanitation, use of EPIs, awareness of at-risk population and vaccination. One of the most important steps of vaccine experiments is the challenge of vaccinated animals using virulent leptospires. However, the survival of animals from the control groups in these experiments may influence the vaccine's efficacy, suggesting that the virulence of the bacteria was reduced. The *in vitro* cultivation of leptospires is underexplored, especially the influence of microbiological practices on virulence of pathogenic strains. This study aimed to evaluate several *in vitro* conditions involving leptospiral growth and determine if the *in vitro* growth can influence on leptospiral virulence. Our results demonstrated that leptospires grew satisfactorily at 28°C in static tubes reaching densities of 10^8 leptospiras/ml in exponential phase, even when smaller inoculums of 5 leptospires were used. Interestingly, we demonstrated that leptospires in the stationary phase presented a reduced LD₅₀, suggesting that these leptospires were less virulent when compared to the bacteria in exponential phase. These observations suggest that

in vitro practices may affect the growth, isolation of new strains from biological samples and it is important to maintain the bacterial virulence stable.

Introduction

Leptospirosis affects more than 1 million people annually, resulting in approximately 60.000 deaths. The disease is considered the most widespread zoonosis in the world [1,2]. Pathogenic species of the genus *Leptospira* are the etiologic agent of leptospirosis and the pathogenic clade of leptospires contains 17 species currently described [3,4]. The bacteria infect humans and other animals, especially mammals, through direct contact with contaminated urine or indirectly via contaminated water and soil [2,5]. The infection has a high impact on public health with serious economic consequences, leading to loss of 2.9 million of Disability Adjusted Life Years (DALY) per year [6]. The incidence of leptospirosis is likely underestimated because of inaccessible and insufficiently rapid laboratory diagnostics, lack of awareness and structured notification systems [5,7]. The implementation of measures such as close the open sewers and the use of appropriated personal protective equipment, could reduce the human and animal risk in endemic areas. In addition, one efficient approach for disease prevention is vaccination of animals and human population at increased risk of exposure [7-9]. However, even after 20 years of research towards the development of modern vaccines, no recombinant vaccine is available to control the disease [10].

Leptospires were isolated from guinea pigs inoculated with infected human blood and were cultivated *in vitro* for the first time in 1916 [11]. This led to the development of several culture media that provided essential nutrients and

optimized the manipulation of leptospiral strains (see the main media in Zuerner 2005 and Adler 2015). The *in vitro* maintenance of leptospires is a time-consuming activity with a high risk of contamination and a need for quality control, as well as specialized/trained individuals [12]. One of the most important contributions to the microbiology of leptospires was the development of the Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium (EMJH) [13,14]. The use of EMJH allowed *in vitro* cultivation of several species and strains to be grown *in vitro* and became widely used for leptospires [8,9,15]. For *in vitro* growth leptospires require carbon, nitrogen, and long chain fatty acids [16,17]. In addition, detoxicants and important nutritional supplements include thiamine, copper, manganese, calcium phosphate, magnesium phosphate and iron [16,17]. To improve the *in vitro* growth of pathogenic leptospires, additional components such as animal sera, vitamin B12, sodium pyruvate and superoxide dismutase can be added to the culture medium [16,17].

Leptospires are difficult to growth *in vitro* and the cultures are often subject to contamination, resulting in qualitative and quantitative problems for the long-term maintenance of viable bacterial collections [5,8,18]. Furthermore, there is still a knowledge gap for leptospiral microbiology. There is little information available on the influence of different techniques during the cultivation of leptospires, e.g. how to optimize growth and their impact of virulence in animal models. The use of different temperatures, oxygenation (leptospires are microaerophilic), inoculum size, and type of container for cultivation remain unanswered questions. To overcome these shortcomings, the present study evaluated the *in vitro* growth kinetics of three pathogenic strains in EMJH, towards establishing the optimal protocol. In addition, we evaluated the impact of

these changes on virulence and we have described a protocol for *in vitro* growth. Our results showed that the virulence was affected by growth phase and that the minimum inoculum was dependent on the growth media.

Methods

Ethics statement

This project was evaluated and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEAA) at the Federal University of Pelotas, under CEEAA No. 4337-2015. The CEEAA at UFPel is accredited by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). The animals used in this project were kept at the Central Vivarium of the Federal University of Pelotas in appropriate micro isolator boxes, with temperature and aeration control, a 12 h dark-light cycle and *ad libitum* water and feed supply, in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation.

Bacterial strains and *in vitro* culture media

Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae strain RCA isolated from a domestic dog [19], *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 [21] and *L. kirschneri* serogroup Pomona serovar Mozdok strain 61H [20] both isolated from human patients, were used in the experiments. Commercial EMJH medium (commercial EMJH, BD Difco, Sparks, Maryland, USA) was prepared following the manufacturer's instructions. The medium was supplemented with 10% of *Leptospira* Enrichment EMJH (BD Difco, Sparks, Maryland, USA) and 1% 5-Fluoruracil (final concentration of 10

ug/ml, Sigma-Aldrich F6627, Missouri, USA) [13, 14]. An in house EMJH medium (IHM) was prepared as previously described [22], and supplemented with 1% rabbit sera (Bio Nutrientes, São Paulo, Brazil) and 1% 5-Fluoruracil (final concentration 10 ug/ml, Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Bacterial growth

Frozen stocks of *Leptospira* spp. were thawed at room temperature, inoculated into 5 ml of commercial EMJH or IHM media, and incubated at 28°C for 7 days prior to the experiments. All the strains were used under no more than five passages *in vitro* after isolation from kidneys of infected hamsters. The growth curves were started using an initial inoculum of 5×10^5 leptospires in 5 ml and/or 1×10^6 leptospires in 10 ml, in three different cultivation strategies: static 15 ml polypropylene tubes (static tubes), 15 ml polypropylene tubes with constant agitation at 180 rpm (agitated tubes), both containing 5 ml of medium, and 50 ml polystyrene culture tissue flasks (static flasks) containing 10 ml of medium. Cultures were incubated at 28°C or 37°C. Intact and motile leptospires were counted for 20 consecutive days using a Petroff-Hausser chamber under dark-field microscopy. The cultures were visually observed for the presence of spirochetes, cell morphology and motility. Three independent experiments were performed using *L. interrogans* and *L. kirschneri* for all conditions above.

Leptospiral growth rates

The doubling times (in hours) under different growth conditions were calculated based on the exponential growth phase, considering:

$$\text{Doubling time} = \frac{t * \log(2)}{\log b - \log a}$$

Where: t = time; a = number the leptospires per ml at start; b = number the leptospires per ml after time t [56,66]

Determination of the minimum inoculum for *in vitro* growth

In order to determinate the minimum inoculum of different *Leptospira* strains to obtain a viable culture of leptospires in different medium, 5×10^0 - 5×10^4 leptospires were inoculated in 5 ml and maintained under the same conditions as described for growth curves. Cultures were evaluated daily under dark-field microscopy for the presence of viable leptospires for up to 10 weeks post-inoculum. All the analysis were performed in triplicate.

Virulence test

The 50% lethal dose (LD₅₀) was calculated for leptospires from different growth phases, different media compositions and at 28°C or 37°C using static tubes. LD₅₀ was calculated as previously described [24]. Briefly, 8 to 14 weeks-old Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*, male or females), 3 per group, were injected with $1-1 \times 10^3$ leptospires in 1 ml of commercial EMJH or IHM media by the intraperitoneal route. The animals were monitored daily for clinical signs of

leptospirosis for up to 28 days post-infection. Animals showing 10% reduction in body weight after infection, with failure to respond to stimulus, nasal or/and genital bleeding, prostration (endpoint criteria), or those animals that survived to the end of the experiment were euthanized by CO₂ narcosis.

Statistical analysis

All data were analysed using GraphPad Prism version 7.0. Fisher's exact test (two-tailed) was used to determinate significant differences between the experimental groups in the LD₅₀ experiments. The bacterial doubling times were analysed using Student's *t* test. A *P*-value ≤ 0.05 was considered significant for all analyses.

Results

Optimal growth conditions for pathogenic *Leptospira* spp.

As expected, leptospires incubated at 28°C were mobile, with no evidence of cellular degradation for up to 20 days post-inoculation. Interestingly, when examined qualitatively under dark-field microscopy, leptospires cultured in IHM medium appeared to be more motile and widely dispersed during the exponential phase. At 28°C, both media supported leptospiral growth to a density of 10⁸ leptospires/ml, 8-12 days post-inoculum, see Fig 1, Table 1 and S2-S9 Fig. The doubling time of the strain Fiocruz L1-130 ranged from 9-21 hours, and the growth at 28°C had the lowest doubling times compared to cultures at 37°C, see Table 1 and Fig 2. The doubling times for the strain RCA ranged from 10-23 hours and for 61H strain, 8-29 hours. No growth was observed for all the strains in

commercial EMJH medium under the temperature of 37°C. *L. interrogans* strains Fiocruz L1-130 and RCA cultivated in commercial EMJH medium at 28°C with extra aeration presented the lowest generation times, with significant differences when compared to IHM medium ($p=0.0054$ and $p=0.0471$ for strains Fiocruz L1-130 and RCA, respectively). The strain 61H of *L. kirschneri* cultivated in commercial EMJH medium at 28°C in static tubes presented a significant reduced generation time compared to IHM medium ($p=0.0084$). The differences between remaining conditions for *in vitro* growth were not significant. The static tubes associated to both EMJH media at 28°C provided the most reproducible condition to growth the three strains of leptospires, once increased oxygenation during growth resulted in increased variability of the growth curves, S1-S9 Fig. Although the pathogenic leptospires incubated with extra agitation did present significant differences, this condition is not stable to cultivate the bacteria once did not provide the growth in all experiments.

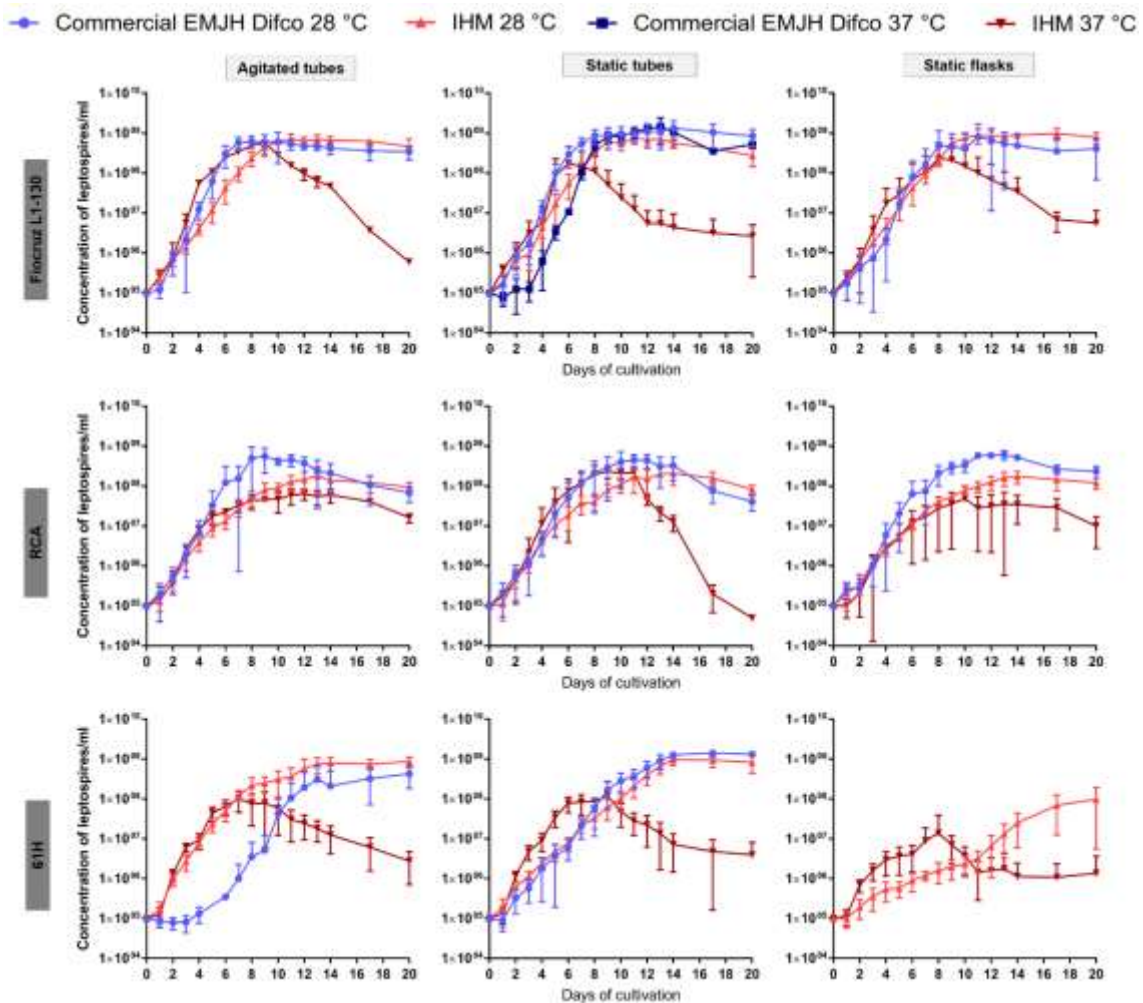


Fig 1. Bacterial growth curves of *L. interrogans* strains Fiocruz L1-130 and RCA, and *L. kirschneri* strain 61H in both media at 28°C and 37°C in agitated tubes, static tubes or static flasks. The initial inoculum was 5×10^5 leptospires in 5 ml. Each curve represents the mean of three experiments under each condition (n=9 samples) and the error bars show the standard deviation.

Table 1. Bacterial growth rates for the *L. interrogans* and *L. kirschneri* strains.

Strain	Media	Doubling time (hours)						Maximum culture density						Final culture density					
		Agitated tubes		Static tubes		Static flasks		Agitated tubes		Static tubes		Static flasks		Agitated tubes		Static tubes		Static flasks	
		28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
L1-130	EMJH	11.1 ^a	NVG ^c	9.4	10.2	18.6	NVG	6.3×10 ⁸	NVG	1.4×10 ⁹	1.4×10 ⁹	8.1×10 ⁸	NVG	3.4×10 ⁸	NVG	8.6×10 ⁸	5.3×10 ⁸	4.1×10 ⁸	NVG
	IHM	17.4 ^b	12.3	14.3	20.5	15.5	21.4	7.3×10 ⁸	5.7×10 ⁸	7.4×10 ⁸	1.7×10 ⁸	9.9×10 ⁸	2.3×10 ⁸	4.7×10 ⁸	6.0×10 ⁵	2.8×10 ⁸	2.7×10 ⁶	7.9×10 ⁸	5.7×10 ⁶
RCA	EMJH	14.1	NVG	12.6	NVG	14.5 ^d	NVG	5.6×10 ⁸	NVG	4.6×10 ⁸	NVG	6.1×10 ⁸	NVG	6.8×10 ⁷	NVG	4.1×10 ⁷	NVG	2.3×10 ⁸	NVG
	IHM	15.0	16.1	14.7	10.7	23.8 ^e	17.2	1.8×10 ⁸	6.3×10 ⁷	2.1×10 ⁸	2.4×10 ⁸	1.7×10 ⁸	4.8×10 ⁷	9.4×10 ⁷	1.6×10 ⁷	8.3×10 ⁷	NVG	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁷
61H	EMJH	13.8	NVG	15.2 ^f	NVG	NVG	NVG	4.3×10 ⁸	NVG	1.4×10 ⁹	NVG	NVG	NVG	4.3×10 ⁸	NVG	1.3×10 ⁹	NVG	NVG	NVG
	IHM	14.7	8.6	23.6 ^g	12.9	29.1	13.7	8.7×10 ⁸	1.0×10 ⁸	9.6×10 ⁸	1.2×10 ⁸	9.8×10 ⁷	1.4×10 ⁷	8.7×10 ⁸	2.8×10 ⁶	8.3×10 ⁸	3.9×10 ⁶	9.8×10 ⁷	1.4×10 ⁶

Legend. NVG – no visible growth; EMJH – Commercial EMJH; IHM – In house EMJH.

The doubling times in hours were presented as the mean of three independent experiments.

Different letters represent a significant statistical difference between the indicated groups.

In contrast, cultures in IHM medium with standard growth curves at 37°C displayed exponential growth, however, the number of viable cells in stationary phase decreased rapidly once maximum density was reached. Furthermore, when evaluated under dark-field microscopy qualitatively, the increase of cellular degradation, altered phenotype and decreased motility were commonly observed during the decline phase at 37°C. Although IHM medium supported growth at both temperatures, we observed extended lag and/or log phases in cultures incubated at 37°C, and once maximum density was achieved the cell count decreased abruptly (decline phase), Fig 1. This seem to be associated with incresead oxygenation, as it ocured more frequently in agitated tubes and static flasks, Fig 1. These bacterial growth curves had lower maximum densities compared with standard growth curves, with a peak of 10^7 leptospires per ml. At 37°C, commercial EMJH could not sustain the growth of Fiocruz L1-130, once only 2/9 cultures were viable, S2 Fig. To evaluate the impact of the starting inoculum on growth at 37°C, two further experiments were performed with the inoculums of 5×10^6 and 5×10^7 leptospires in 5 ml, S10 Fig. While the RCA strain failed to grow, at 5×10^6 leptospires/ml the Fiocruz L1-130 strain reached 10^8 leptospires/ml 6 days post-inoculum, S10 Fig. Although the bacteria in IHM medium incubated under 37°C presented satisfactory doubling time results, these groups did not show significant differences when compared to cultures at 28°C, Fig 1 and Table 1.

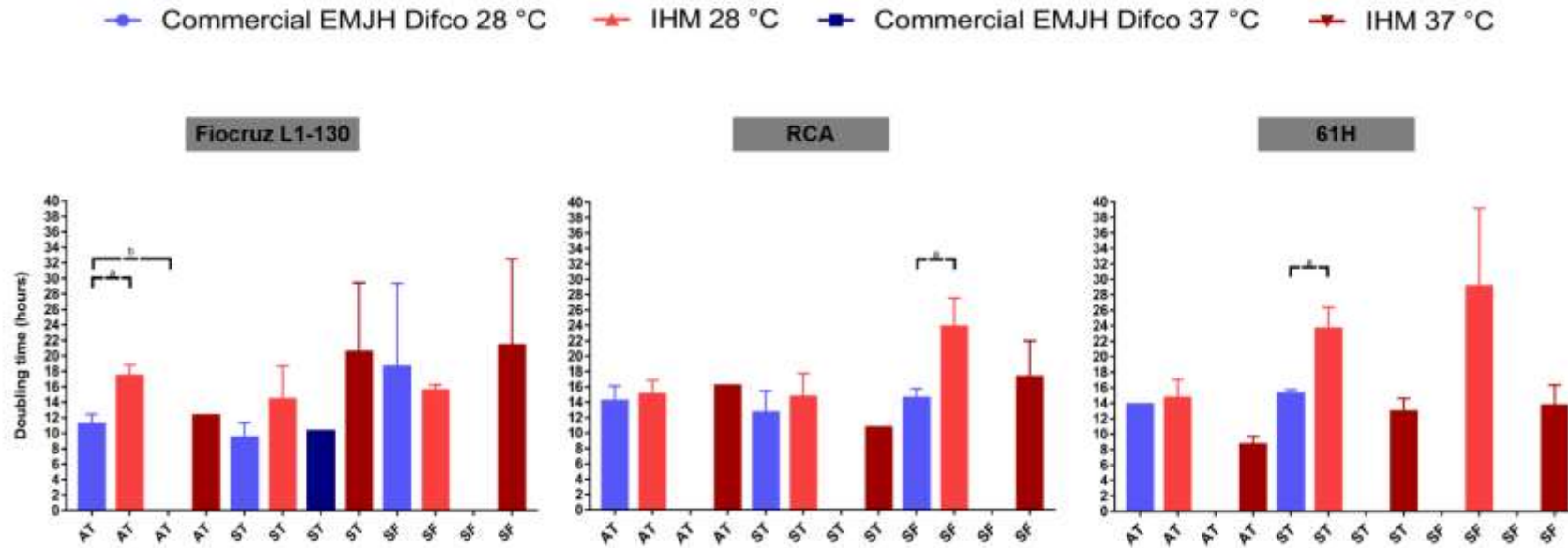


Fig 2. Doubling times of the pathogenic species *L. interrogans* strains and *L. kirschneri* strains under all *in vitro* growth conditions. The columns represent the mean of three experiments in each condition and the vertical bars the standard deviation. The horizontal bars and letters represent significant statistical differences between the experimental groups indicated.

Determination of the minimum inoculum for *in vitro* growth

In order to evaluate the lowest number of leptospires necessary for bacterial growth in each media and incubation condition, densities of 5 to 5×10^4 leptospires in 5 ml were used as the initial inocula. The cultures were observed under dark-field microscopy to determine qualitatively the time to detectable growth. Static tubes that contained cultures in both EMJH media at 28°C were found to be the most appropriated condition for growing a low inoculum. Commercial EMJH medium did not support growth at 37°C under any condition evaluated. Additionally, with increased oxygenation (agitated tubes and static flasks), inocula $<10^3$ leptospires/ml could not grow in commercial EMJH. In contrast, IHM medium supported growth under all the conditions tested, except for the 61H strain in static flasks, S2 Table. When the Fiocruz L1-130 strain was inoculated into IHM in static tubes and incubated at 28°C or 37°C, growth was evident for all inocula by 14 days post-inoculum. The RCA strain grew by 16 days, even at the lowest inoculum. The 61H strain was the slowest to recover, and growth was not observed until 18 days post-inoculum for the lowest inoculum. Interestingly, when the Fiocruz L1-130 and 61H strains were inoculated into IHM medium and incubated at 37°C, growth was detected by days 10 and 12 post-inoculum, respectively. The RCA strain failed to grow at 37°C under any of the conditions evaluated, Fig 3 and S2 Table.

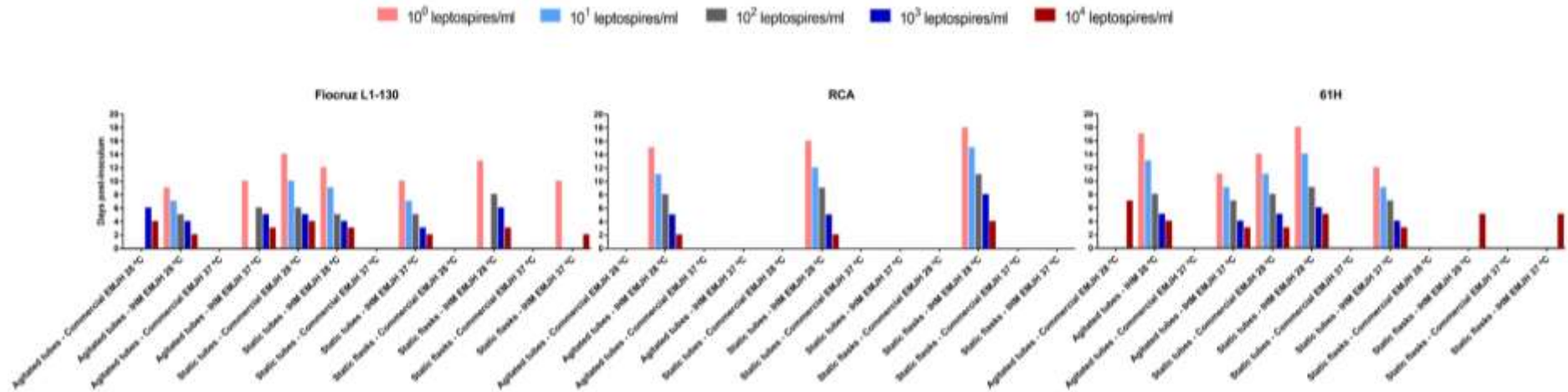


Fig 3. Impact of the initial inoculum on the growth of *L. interrogans* and *L. kirschneri* in the EMJH media at 28°C or 37°C in agitated tubes, static tubes and static flasks. The cultures were evaluated daily under dark-field microscopy, as a qualitative analysis, to evaluate the time (in days) until leptospires were detected. *AT* – Agitated tubes; *ST* – static tubes; *SF* – static flasks.

Different *in vitro* culture conditions influence leptospiral virulence

The LD₅₀ of the three strains used in this study was used to identify any association between the growth phase (exponential, stationary, etc.) and virulence in the hamster model. The LD₅₀ for each of the strains was determined as described by Zuerner (2005), using commercial EMJH at 28°C and the infection was performed with leptospires from the exponential phase (densities between 10⁷ and 10⁸ leptospires/ml). The LD₅₀ were calculated as < 5 leptospires for Fiocruz L1-130, < 2 leptospires for RCA and 1 leptospire for 61H, Fig 4.

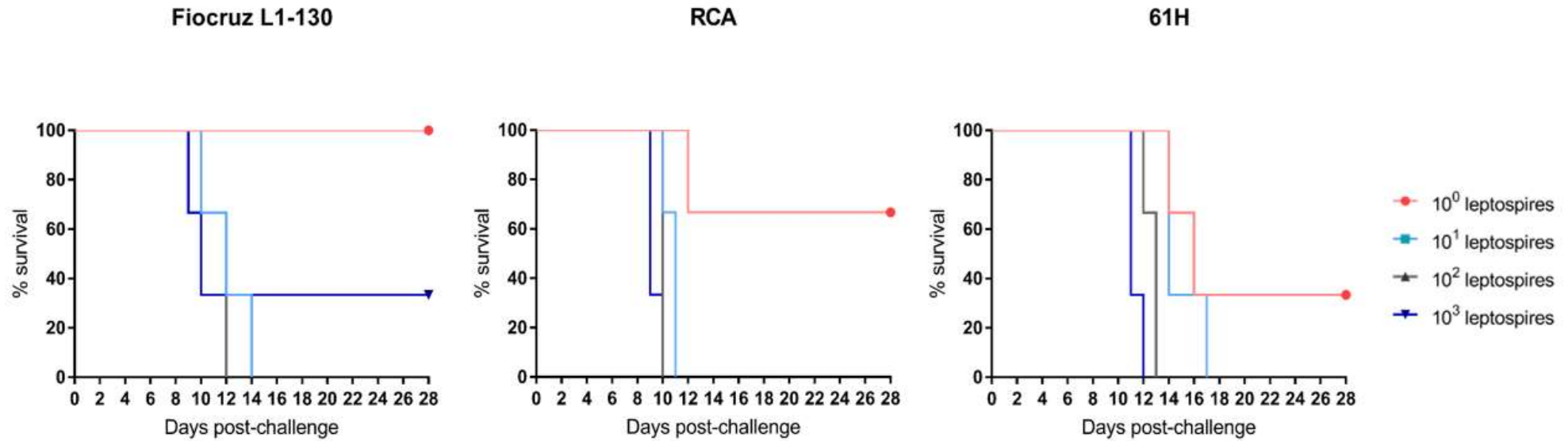


Fig 4. Determination of the LD₅₀ for the *L. interrogans* and *L. kirschneri* strains. The bacteria were cultivated in EMJH at 28°C for 3-5 days and inocula of 10^0 - 10^3 leptospores/ml were injected into hamsters (n=3 animals for group, n total of 12 animals), via the intraperitoneal route and observed for up to 28 days post-infection.

The following densities were defined based on the growth of the three strains and selected as characteristics of each point on the bacterial growth curve: Early Exponential Phase (1.8×10^5 - 2.8×10^6 leptospire/ml); Mid Exponential Phase (6.2×10^6 - 1.3×10^7 leptospire/ml); Late Exponential Phase (2.9×10^7 - 1.3×10^9 leptospire/ml) and Stationary Phase (1.1×10^7 - 7.3×10^8 leptospire/ml). The LD₅₀ of the Fiocruz L1-130 strain when grown *in vitro* to the exponential phase (samples were collected from the beginning, middle and end of the exponential phase), varied from one to 100 leptospire, equivalent to two orders of magnitude. When the culture entered the stationary phase, the LD₅₀ increased significantly to $> 10^3$ leptospire. Of note, when grown in IHM at 28°C or 37°C, the LD₅₀ of the L1-130 strain was significantly reduced, Table 2. The RCA strain had an LD₅₀ that varied between 1 and 18 leptospire in both media, regardless of the growth phase, Table 2. However, there was evidence that the stationary phase significantly increased the LD₅₀ to 1.8×10^3 when RCA was grown in IHM at 28°C. The LD₅₀ for the 61H strain was very stable compared to the *L. interrogans* strains and varied from one to 28 leptospire, regardless of the media, temperature or growth phase of the culture, Table 2. Interestingly, all the animals infected with 61H presented intense jaundice and uveitis. These two clinical signs were not observed in animals infected with leptospire of the strains Fiocruz L1-130 and RCA.

Table 2. How the choice of growth media and phase of growth affected the LD₅₀ of the *L. interrogans* and *L. kirschneri* strains.

Strain	Media	Temperature (°C)	Growth Phase	Days of euthanasia	LD ₅₀
Fiocruz L1-130	Control	28	Mid-late exponential	9 - 14	4.6
	EMJH		Early exponential	10 - 14	1.8
			Mid exponential	10 - 22	1.8
			Late exponential	12 - 17	100
			Stationary	10 - 18	18
			Early exponential	8 - 12	< 1
	IHM		Mid exponential	12	< 1
			Late exponential	10 - 16	5.6
			Stationary	NV	> 1000 ***
		IHM	37	Early exponential	10 - 14
	Mid exponential			9 - 12	3.2
	Late exponential			11 - 15	2.8
	Stationary			13	1800 **
RCA	Control	28	Mid-late exponential	9 - 13	1.8
	EMJH		Early exponential	8 - 12	3.2
			Mid exponential	8 - 14	1.8
			Late exponential	9 - 14	< 1
			Stationary	9 - 20	2.5
			Early exponential	8 - 14	2.5
	IHM		Mid exponential	9 - 20	1.8
			Late exponential	10 - 13	13
			Stationary	13 - 15	1800 ***
		IHM	37	Early exponential	9 - 15
	Mid exponential			10 - 13	3.9
	Late exponential			10 - 17	18
	Stationary			10 - 27	10
61H	Control	28	Mid-lat exponential	11 - 17	< 1
	EMJH		Early exponential	8 - 14	5.6
			Mid exponential	13 - 16	3.2
			Late exponential	13 - 18	3.2
			Stationary	11 - 14	3.2
			Early exponential	7 - 14	28
	IHM		Mid exponential	11 - 20	< 1
			Late exponential	12 - 16	6.8
			Stationary	13 - 24	28
		IHM	37	Early exponential	12 - 18
	Mid exponential			12 - 17	< 1
	Late exponential			12 - 16	3.2
	Stationary			12 - 17	10

Legend. NV – No animal developed clinical signs of leptospirosis. EMJH – Commercial EMJH; IHM – In house EMJH. The cultures were kept in static tubes during the LD₅₀ experiments. Four densities of leptospire were used to evaluate the LD₅₀. The animals were infected intraperitoneally with the densities of 1x10⁰-1x10³ leptospire in 1 ml of each media. * $p \geq 0.05$; ** $p \geq 0.01$ and *** $p \geq 0.001$.

Discussion

The best approach to cultivate leptospires is to evaluate different bacterial media, once it can be a selector to isolate only the bacteria capable of surviving in the *in vitro* condition [23]. The virulence of pathogenic species is an important factor for several studies in the field, thus here we demonstrated the differences between the growth of three pathogenic strains of *Leptospira* spp., presenting a well-defined *in vitro* protocol without affect the bacterial virulence, Fig 5. To the better of our knowledge, this is the first study to present an *in vitro* protocol towards improving the reproducibility of bacterial virulence.

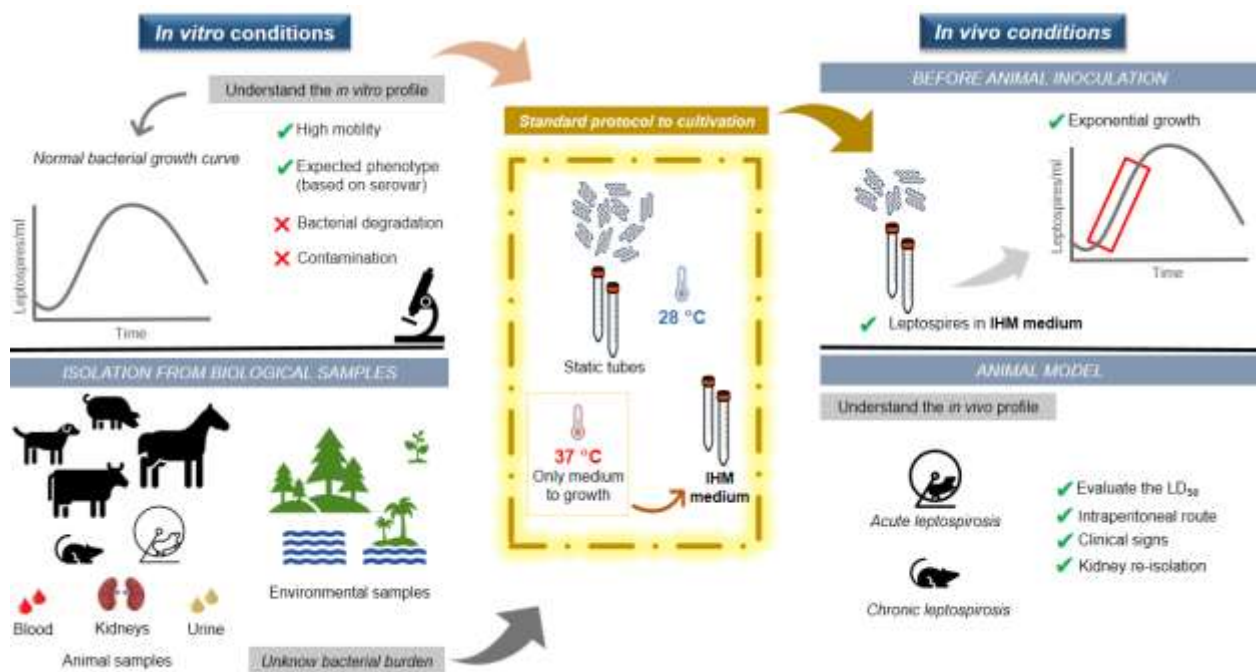


Figure 5. Standard protocol for the *in vitro* and *in vivo* cultivation of pathogenic strains from *L. interrogans* (Fiocruz L1-130 and RCA) and *L. kirschneri* (61H).

Although the leptospiral growth curve follows the general phenotype, it covers a much longer period than ordinary bacteria [17,25,56]. Pathogenic leptospires tested in

our study presented characteristic bacterial growth curves for both EMJH media under 28°C, in all conditions with bacterial growth. Our results show that the lag phases were extended especially in the cultures that were kept at 37°C, S1-S9 Fig. A long period of lag phase can be associated to bacterial adaptation to new media, environment stress or injury for several organisms [57-59]. Our data suggest that a longer bacterial lag phase could be a result of the tentative to adapt to the temperature of 37°C, once this condition may be an important stress factor to leptospires. The logarithmic/exponential phase is characterized by a period of replication, the most rapidly growth under the *in vitro* conditions [26, 57,58]. During the log phase, the cultures achieved the bacterial densities of 10⁸ leptospires/ml and remained stable during all the experiment. These results suggest that both EMJH media provided adequate nutritional components to maintain the replication of leptospires, and consequently, obtain high densities of bacteria in the cultures. A study analyzing the gene expression growth-phase-dependent in *Helicobacter pylori* demonstrated that the higher alteration in gene expression of genes related to virulence factors were in the late-log phase, suggesting that this phase can be the most virulent to *H. pylori* and may be directly related to its pathogenesis [27]. In addition, a recent study observed that leptospires acquired higher tolerance to hydrogen peroxide at the stationary phase, in comparison to a dramatic loss when exposed to the same oxidative stress in the logarithmic phase [28]. The virulent leptospires cultivated in EMJH media at 28°C presented a constant stationary phase through 20 days of bacterial growth. In contrast, bacterial cultures of *L. interrogans* in IHM medium maintained under 37°C, once achieved the highest cellular densities, persisted for 3-6 days in the stationary phase, and abruptly the cellular death process started. The strain 61H had an extended stationary phase, when the growth was obtained in IHM at 37°C, of 6-20 days post-inoculum. The reasons to the switch from log to stationary phase can be the exhaustion

of nutrients, inhibition of replication due to toxic waste products or intracellular damage. Once some bacterial cells died, their compounds provide extra nutritional sources to maintain the growth of the remaining cells during this stage. A recent study of the stationary phase of *Escherichia coli* cultures observed that the bacteria developed three distinct subpopulations in response to fresh nutrients: immediately growing cells, cells with an extended lag as known as dormant and those cells with no growth at all [26, 57,58,60]. Thus, the prolonged stationary phase provided by the EMJH media at 28°C can be an advantage to improve the chances of viable cells recovery from older cultures. Lastly, the death phase is characterized by a net loss of cultivable cells, when most viable cells are lost than are gained due to starvation and absence of detoxication [17,57,58]. The abrupt decrease of cellular densities by the bacteria cultivated in IHM medium under the temperature of 37°C, may suggest that leptospires entered the death phase as a consequence of some essential factor absence or its toxicity during this time.

Ordinary bacteria, as such as *E. coli*, are able to reproduce at impressive rates and double its population every 20 minutes [61]. Virulent leptospires are slow-growing bacteria and need up to 12-20 h to replicate, compared to 5 h for the saprophytic species *L. biflexa*, being even faster at the temperature of 34°C (3.5 h) [16,17,29,30]. It is important to establish the essential nutrients for small inoculums and first isolations cultures and its influence on the viability, motility, and leptospiral cell morphology [31]. The EMJH media is widely used for the *in vitro* growth of leptospires and is still considered the standard medium to cultivate the bacteria. However, several studies testing different media, including the EMJH, reinforced that leptospiral strains did not present a pattern of growth [32]. Both EMJH media tested in our study provided the bacterial growth of the strains Fiocruz L1-130, RCA and 61H effectively. Nevertheless, the pathogenic strains only presented effective growth under the temperature of 28°C for all conditions tested,

in contrast with cultures at 37°C that did present high variability of growth. These results reinforce that pathogenic species of *Leptospira* sp. present an optimum *in vitro* grow between the temperatures of 28-30°C [16-18, 23,30]. The studies using the EMJH media and different temperatures for incubation confirmed that cultures maintained under the temperatures between 25-30°C obtained optimal bacterial growth *in vitro* [33,34,56,62]. In contrast, the growth of leptospires under the temperature of 37 °C is highly variable, even amongst strains of the same serovar, suggesting that leptospires that effectively growth at this condition probably are *in vitro* adapted [23,35,63]. Similarly, the strains tested in our study did not present bacterial growth in the commercial EMJH medium under the temperature of 37°C in any condition applied, except for two static tubes of Fiocruz L1-130 in one experiment. However, the growth was not similar and the bacteria presented signs of suffered growth (low motility, elongated cells and the presence of degenerative forms). The bacterial growth under the temperature of 37°C is usually applied to simulate the internal organs temperatures of vertebrate hosts [64]. However, leptospires isolated from their hosts and grown in laboratory media at host body temperature do not grow and survive well even at 37°C, presenting long lag phases and doubling times before adapting and growth effectively, as well a pattern of growth that indicate more than one population occurring [17,35]. The novel leptospiral medium HAN associated to higher temperatures of incubation, in comparison with EMJH and TH40/80/LH media, demonstrated that HAN medium was the only one capable of maintain *in vitro* two pathogenic species under both temperatures of 29°C and 37°C [23]. The bacterial curves under the temperature of 37°C in our study presented a faster growth rate, however, immediately after reach the maximum densities of bacteria, it decreased abruptly. The same results were obtained in other studies, with or without agitation, where the leptospires reduced their movement and growth rates, followed by a decrease of

cellular densities, and finally resulting to degeneration and disappearing of leptospires from cultures [25,29,34,56]. *L. interrogans* has been shown to be an aerobic obligatory and requires a rich oxygen supply for successful growth [34,56]. However, the use of extra aeration *in vitro* presented high variability, and could either improve or block the growth of leptospires in several studies [17,18,28,29,56]. *Borrelia burgdorferi*, another important pathogenic spirochete, grown into the media BSKII and BSKH presented a pattern of gene expression in the BSKH medium that suggest it is superior for gene expression studies, once it did not change the pattern of gene expression typically displayed. Additionally, the bacteria maintained in BSKH medium appeared to be more motile and replicate more rapidly when compared to the bacteria grown in BSKII one [36]. Moreover, *B. burgdorferi* presented similar results using open reading frames (ORFs) to discovery novel temperature-regulated proteins to use as vaccines targets [37], and as well proteins related to the stationary growth phase and pH of the medium [38]. Leptospires regulate their genes expressions in response to several external stresses, such as temperature [39,40], oxidative stress [28], on the mammalian host environment [41,42], presence of iron MURRAY, 2008 [43], serum [44] and different media compositions [13,14,23,32,45,46]. In fact, the growth at higher temperatures may be a stressful condition to leptospires, once the universal stress protein UspA was up-regulated under 37°C, as well the differential expression of genes related to chemotaxis, motility, signal transduction systems and proteins involved in alterations in the outer membrane occur [39]. Furthermore, another study suggested that oxidative stress and the temperature could significantly influence the gene expression of five important leptospiral proteins as such as LenA, LipL32, LipL41, Loa22 and Sph2 [40]. Additionally, Caimano et al (2014) had found that *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 presented an expression gene regulation at 37 °C when compared to *in vitro* temperature of 28°C [41].

L. interrogans solicits several machineries to recovery from oxidative damage [47]. The increase of different forms of the protein LoA22, a known virulence factor, as well as LipL32 and LipL41 differentially expressed by *in vivo* adaptation in DMCs (mammalian host), suggesting that unique post-translation modifications are operative in response to mammalian host conditions [42]. Finally, exoproteins from the mammalian reservoir host and leptospiral cells are secreted during infection, including proteins involved in stress response, virulence, and signal transduction in leptospires, as well as the host cells secreted proteins related to stress, complement and inflammatory cytokines, extracellular matrix and blood coagulation factors [65]. In conclusion, several host-associated factors as such as oxidative stress and temperature are very important external stresses, which can influence the viability and virulence of pathogenic species. We found that the doubling times of the pathogenic strains evaluated in our study were variable, and the cultures without bacterial growth were not included in the analysis. Although statistical differences were only significant in the groups with increase of aeration for the strains L1-130 and RCA (agitated tubes and static flasks) and for the strain 61H using the commercial EMJH medium, these conditions were not adequate to cultivate the bacteria strains during the experiments performed. In general, the three strains of pathogenic leptospires cultivated in IHM medium at 28°C in static tubes presented the lower doubling times (9-23 h), and consequently, improved the cultures regarding the growth from small initial inoculums. Additionally, the bacterial survival rates were higher when the cultures were incubated at 28°C and 30°C in comparison to incubation at 37°C [62]. Therefore, here we presented that the commercial EMJH medium is not suitable to initiate the growth of pathogenic leptospires using inoculums smaller than 10^4 leptospires/ml. Differently, all inoculums tested in IHM medium presented visible bacterial growth until the 18th day post-inoculum. Importantly, the only possibility for obtaining the growth of the strain RCA using lower

inoculums than 10^4 leptospire/ml was the IHM medium. A conjunct of studies confirmed that the type of media influence the first isolation of leptospire from animal samples, as well the cultivation of fastidious serovars [23,46,48]. Recent studies developing new protocols and media for leptospire, had provided the improvement of isolation from biological samples and maintenance of leptospire *in vitro* [12,49-53]. The lag time of laboratory-adapted strains depends on the size of the inoculum, and the use of smaller inoculums result in longer lag phases and reduced chances of obtain viable growth [16,17]. In fact, from strains isolated recently, it can be impossible to growth *in vitro* using inoculums lower than 10^3 leptospire/ml [17,35,52,54,55]. The capacity of expanding the bacteria from biological samples to the *in vitro* condition, where the number of leptospire are undefined, is an important step to discovery of new leptospiral isolates. In addition, the understanding of the pathogenic strains circulating in a specific region is necessary for epidemiological purposes, and consequently, can help in the prevention of leptospirosis caused by circulating serovars through traditional bacterin vaccines. In conclusion, the use of an effective medium suitable to grow leptospire from smaller inoculums should be an appropriated tool for the improvement of microbiological techniques.

Interestingly, our results presented that the virulence of leptospire were stable when growth in commercial EMJH medium, once it was not reduced from the day two post-inoculum until the stationary phase. However, the bacterial growth phase is an important factor to maintain the virulence of the leptospire stable in IHM. The IHM medium is suitable for the growth of leptospire only during the exponential phases, and a significant reduction of the bacterial virulence at least 250 times during the stationary phases in the strains of *L. interrogans*. To *H. pylori*, the analyses of global pattern of growth-phase-dependent gene expression during *in vitro* growth suggested that higher

gene expression alteration occurred in the switch from mid/late exponential phase to stationary phase, with many genes up or down-regulated that are responsible for the iron homeostasis, motility and other important virulence factors [27]. The best time to transfer leptospires from a culture to a new tube is when the culture is rapidly dividing [11]. Once some protocols routinely use inoculums from the stationary phases to obtain satisfactory growth of pathogenic cultures, peaking 1-10% of culture volume to a fresh medium [17], our study confirm the that leptospires from stationary phases can be, in fact, less virulent than the bacteria from exponential phase. In our experience, even after 25-100 *in vitro* passages of leptospires from the exponential phase, it did not affect the bacterial virulence (data not show). Finally, our results suggest that the more virulent growth phase of leptospires is the exponential phase, and bacteria from these phases should be chosen for the development of studies where the virulence is an important factor.

CONCLUSION: The IHM medium is a well-defined composition medium, fully prepared in the laboratory. Our results confirmed that this medium is more effective for acquire high densities of leptospires in the cultures, with characteristic doubling times, and provided normal bacterial growth curves. Importantly, this medium is cheaper to maintain the bacterial growth routinely in a long-term perspective, in comparison with the commercial EMJH medium where only 6 liters can be prepared using a lot of commercial supplement. One important characteristic of the IHM medium is the possibility of storage at 4°C for approximately 2 months [16]. It suggests that is essential to perform quality controls frequently to analyze the viability and capacity to maintain the bacteria without influence the bacterial growth. Furthermore, our data provide the knowledge regarding the bacterial virulence, confirming that leptospires in the exponential growth phase are more virulent. These results are important for the development of studies where a stable bacterial virulence is an essential factor. In conclusion, a well-defined *in vitro* protocol to

growth leptospires effectively, without impact the virulence, can be a strong tool to optimize the maintenance of leptospires in the laboratories.

References

1. Costa, F., et al., *Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(9): p. e0003898.
2. Evangelista, K.V. and J. Coburn, *Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses*. Future Microbiol, 2010. **5**(9): p. 1413-25.
3. Thibeaux, R., et al., *Deciphering the unexplored Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence*. Microb Genom, 2018.
4. Vincent, A.T., et al., *Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics*. PLoS Negl Trop Dis, 2019. **13**(5): p. e0007270.
5. Bharti, A.R., et al., *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(12): p. 757-71.
6. Torgerson, P.R., et al., *Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(10): p. e0004122.
7. Haake, D.A. and P.N. Levett, *Leptospirosis in humans*. Curr Top Microbiol Immunol, 2015. **387**: p. 65-97.
8. Adler, B. and A. de la Pena Moctezuma, *Leptospira and leptospirosis*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 287-96.
9. Adler, B., *Leptospira and Leptospirosis*. Curr Top Microbiol Immunol, ed. B. Adler. 2015: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
10. Felix, C.R., et al., *An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives*. Expert Opin Drug Discov, 2020. **15**(2): p. 179-188.
11. Inada, R., et al., *The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica)*. J Exp Med, 1916. **23**(3): p.377-402.
12. Wuthiekanun, V., et al., *Maintenance of leptospira species in leptospira Vanaporn Wuthiekanun agar*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(12): p.4350-2.

13. Ellinghausen, H.C., Jr. and W.G. McCullough, *Nutrition of Leptospira Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80*. Am J Vet Res, 1965. **26**:p.45-51.
14. Johnson, R.C. and V.G. Harris, *Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures*. J Bacteriol, 1967. **94**(1): p. 27-31.
15. Rodriguez, A.G., et al., *[Growth, virulence and antigenicity of Leptospira interrogans serovar mozdok in modified EMJH medium]*. Rev Cubana Med Trop, 2002. **54**(1): p. 32-6.
16. Cameron, C.E., *Leptospiral structure, physiology, and metabolism*. Curr Top Microbiol Immunol, 2015. **387**: p. 21-41.
17. Faine, S.B., et al., *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. 1999, Melbourne: MediSci.
18. Zuerner, R.L., *Laboratory maintenance of pathogenic Leptospira*. Curr Protoc Microbiol, 2005. **Chapter 12**: p. Unit 12E.1.
19. Kremer, F.S., et al., *Draft genome of the Leptospira interrogans strains, Acegua, RCA, Prea, and Capivara, obtained from wildlife maintenance hosts and infected domestic animals*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2016. **111**(4): p. 280-3.
20. da Cunha, C.E., et al., *Infection with Leptospira kirschneri Serovar Mozdok: First Report from the Southern Hemisphere*. Am J Trop Med Hyg, 2016. **94**(3):p.519-21.
21. Ko, A.I., et al., *Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group*. Lancet, 1999. **354**(9181): p. 820-5.
22. Grassmann, A.A., et al., *Generation of Mammalian Host-adapted Leptospira interrogans by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats*. Bio Protoc, 2015. **5**(14): p. e1536.
23. Hornsby, R.L., D.P. Alt, and J.E. Nally, *Isolation and propagation of leptospires at 37 degrees C directly from the mammalian host*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 9620.
24. Reed, L.J. and H. Muench, *A simple method of estimating fifty percent endpoints*. Am J Hyg, 1938. **27**: p. 493-497.
25. Fulton, J.D. and D.F. Spooner, *The metabolism of Leptospira icterohaemorrhagiae in vitro*. Exp Parasitol, 1956. **5**(2): p. 154-77.

26. Joers, A., E. Liske, and T. Tenson, *Dividing subpopulation of Escherichia coli in stationary phase*. Res Microbiol, 2020. **171**(3-4): p. 153-157.
27. Thompson, L.J., et al., *Gene expression profiling of Helicobacter pylori reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2643-55.
28. Zavala-Alvarado, C., et al., *The transcriptional response of pathogenic Leptospira to peroxide reveals new defenses against infection-related oxidative stress*. PLoS Pathog, 2020. **16**(10): p. e1008904.
29. Henneberry, R.C. and C.D. Cox, *Beta-oxidation of fatty acids by Leptospira*. Can J Microbiol, 1970. **16**(1): p. 41-5.
30. Picardeau, M., *Toolbox of Molecular Techniques for Studying Leptospira Spp*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017.
31. Chideroli, R.T., et al., *Culture Strategies for Isolation of Fastidious Leptospira Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajtino*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2155.
32. Arias, R.S., *Evaluación del medio EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes de patogenicidad en cepas de Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae*. 2012, Universidade de La Sabana.
33. Ido, Y., et al., *The Prophylaxis of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica)*. J Exp Med, 1916. **24**(5): p. 471-83.
34. Noguchi, H., *Further Study on the Cultural Conditions of Leptospira (Spirochaeta) Icterohaemorrhagiae*. J Exp Med, 1918. **27**(5): p. 593-608.
35. Ellinghausen, H.C., Jr., *Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospires*. J Med Microbiol, 1973. **6**(4): p. 487-97.
36. Yang, X., et al., *Influence of cultivation media on genetic regulatory patterns in Borrelia burgdorferi*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 4159-63.
37. Ojaimi, C., et al., *Profiling of temperature-induced changes in Borrelia burgdorferi gene expression by using whole genome arrays*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1689-705.
38. Ramamoorthy, R. and D. Scholl-Meeker, *Borrelia burgdorferi proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2739-42.

39. Lo, M., et al., *Effects of temperature on gene expression patterns in Leptospira interrogans serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5848-59.
40. Fraser, T. and P.D. Brown, *Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic Leptospira spp.* Front Microbiol, 2017. **8**: p. 783.
41. Caimano, M.J., et al., *A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by Leptospira interrogans serovar Copenhageni*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1004004.
42. Nally, J.E., et al., *Pathogenic Leptospire Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 362.
43. Murray, G.L., et al., *Leptospira interrogans requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin*. Microbes Infect, 2008. **10**(7): p. 791-7.
44. Patarakul, K., M. Lo, and B. Adler, *Global transcriptomic response of Leptospira interrogans serovar Copenhageni upon exposure to serum*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 31.
45. Chakraborty, A., et al., *A novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species*. Microbiol Immunol, 2011. **55**(7): p. 494-501.
46. Ellis, W.A., J. Montgomery, and J.A. Cassells, *Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of Leptospira interrogans serovar hardjo*. Res Vet Sci, 1985. **39**(3): p. 292-5.
47. Zhang, K., et al., *Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian apolipoprotein AI*. Infect Immun, 2013. **81**(10): p. 3872-9.
48. Ellis, W.A., et al., *Restriction endonuclease analysis of Leptospira interrogans serovar hardjo isolates from cattle*. Res Vet Sci, 1988. **44**(3): p. 375-9.
49. Bierque, E., et al., *Leptospira interrogans Retains Direct Virulence After Long Starvation in Water*. Curr Microbiol, 2020. **77**(10): p. 3035-3043.
50. Dhayabaran, V., D. Chidambaram, and P.R. Krishnaswamy, *Identification of compounds for improved growth of Leptospira in culture and isolation*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2020. **96**(1): p. 114923.

51. Guedes, I.B., et al., *Leptospira transport medium (LTM): A practical tool for leptospires isolation*. J Microbiol Methods, 2020. **175**: p. 105995.
52. Narkkul, U., et al., *Optimization of Culture Protocols to Isolate Leptospira spp. from Environmental Water, Field Investigation, and Identification of Factors Associated with the Presence of Leptospira spp. in the Environment*. Trop Med Infect Dis, 2020. **5**(2).
53. Mohamad Safiee, A.W., et al., *Leptospiral Culture without 5'-Fluorouracil Revealed Improved Leptospira Isolation from Febrile Patients in North-Eastern Malaysia*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(4).
54. Faine, S., *Iron as a growth requirement for pathogenic Leptospira*. J. Gen. Microb., Lond., 1959. **20**(2): p. 246-51.
55. Ellinghausen, H.C., Jr., *Death and lysis of leptospirae when cultured in asbestos-filtered growth media*. Appl Microbiol, 1973. **26**(6): p. 959-68.
56. Chang S L. (1947). Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae* III. THE GROWTH RATE OF, AND SOME BIOCHEMICAL OBSERVATIONS ON *LEPTOSPIRA ICTEROHAEMORRHAGIAE* IN CULTURE. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 81, Issue 1, July 1947, Pages 35–47.
doi.org/10.1093/infdis/81.1.35
57. Raina M. Maier, Ian L. Pepper, Charles P. Gerba. (2009). Chapter 1 - Introduction to Environmental Microbiology. *Environmental Microbiology* 2nd edition, P 3-7, ISBN 9780123705198. doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00001-8.
58. Bertrand RL. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *J Bacteriol* 201:e00697-18.
doi.org/10.1128/JB.00697-18.
59. Hamill, P.G., Stevenson, A., McMullan, P.E. et al. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Sci Rep* **10**, 5948 (2020).
doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4
60. Spencer Cesar, Lisa Willis, Kerwyn Casey Huang. (2020). Bacterial respiration during stationary phase induces intracellular damage that leads to dormancy. *bioRxiv*. 2020.11.27.401331.doi.org/10.1101/2020.11.27.401331
61. Rosalind J Allen and Bartłomiej Waclaw. (2019). Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Rep. Prog. Phys.***82** 016601. 10.1088/1361-6633/aae54662

- Stoddard, R. A.; Bui, D.; Haberling, D. L.; Wuthiekanun, V.; Thaipadungpanit, J.; Hoffmaster, A. R. (2014). Viability of *Leptospira* Isolates from a Human Outbreak in Thailand in Various Water Types, pH, and Temperature Conditions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(5), 1020–1022. doi:10.4269/ajtmh.13-0748
- 63 Ole H. V. Stalheim. (1973). Chemical Aspects of Leptospirosis, *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 2:4, 423-456. 10.3109/10408417309108391
- 64 Heroldová M, Nemec M, Hubalék Z. (1998). Growth Parameters of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at Various Temperatures. *Zent.bl. Bakteriologie*.288, 451-455. doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80058-3
- 65 Weilin Hu, Muhammad Imran, Kai-Xuan Li et al. (2021). Exoproteome from *Leptospira interrogans* and Host Cells during Infection: Leptospiral Virulence Factors and Cellular Proteins Involved in Stress and Inflammation. doi.org/10.21203/rs.3.rs-37165/v1.
- 66 Roth V. 2006 Doubling Time Computing. Available from <<http://www.doubling-time.com/compute.php>>.

Supplementary materials

Table S1. Summary of the *in vitro* experiments to determinate the bacterial growth curves of the pathogenic species of *Leptospira* spp. maintained in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using agitated tubes, static tubes and static flasks

Strain	Culture media	Number of experiments with bacterial growth					
		Agitated tubes		Static tubes		Static flasks	
		28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
Fiocruz L1-130	EMJH	3/3	0/3	3/3	1/3 ^b	2/3 ^c	0/3
	IHM	3/3	1/3	3/3	3/3 ^a	3/3	3/3 ^a
RCA	EMJH	3/3	0/3	3/3	0/3	2/3	0/3
	IHM	3/3	1/3 ^d	3/3	1/3	3/3	1/3 ^e
61H	EMJH	1/3 ^h	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	IHM	3/3	3/3 ^f	3/3	3/3	3/3 ^g	3/3 ^g

Legend. EMJH – Commercial EMJH; IHM – In house EMJH; °C – Temperature. a – One experiment achieved densities of 10^8 leptospores/ml, and the other 2 experiments presented at maximum 10^7 leptospores/ml; b – Only two samples presented bacterial growth, and the densities were of 10^9 leptospores/ml; c – Two experiments obtained the bacterial growth. The first one presented the densities of 10^7 leptospores/ml and the second experiment 10^9 leptospores/ml; d – Only one experiment showed leptospiral growth, reaching the density of 10^7 leptospores/ml; e – One experiment obtained the bacterial density of 10^9 leptospores/ml and two more samples presented 10^5 leptospores/ml during the cultivation; f – All the experiments presented bacterial growth, two of them with densities of 10^7 leptospores/ml and one experiment reached the bacterial density of 10^8 leptospores/ml; g – The bacteria showed a growth of at maximum 10^7 leptospores/ml during the experiments; h – Only two samples presented leptospiral growth, with densities of 10^6 leptospores/ml and 10^8 leptospores/ml.

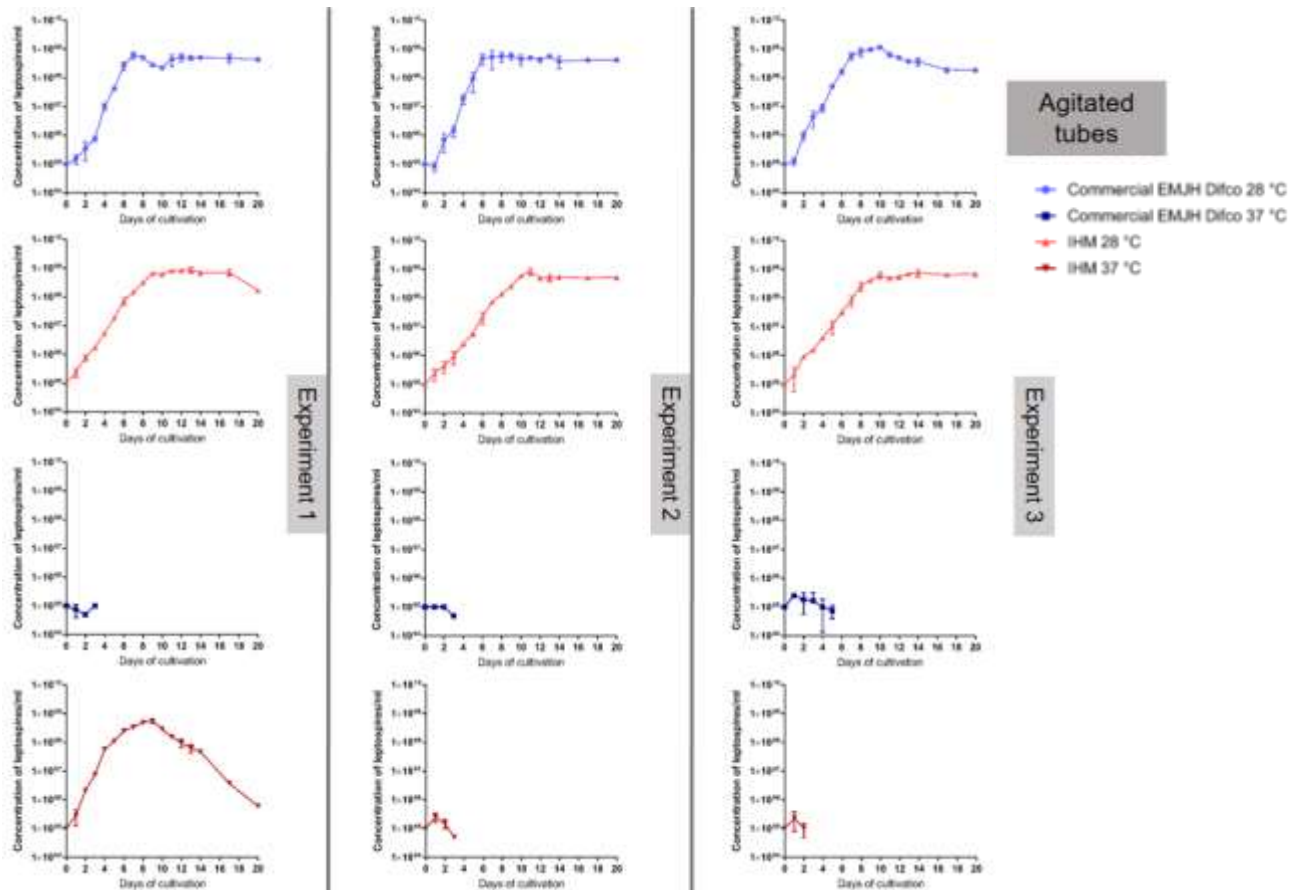


Figure S1. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using agitated tubes. The initial inoculum was 1×10^5 leptospores/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

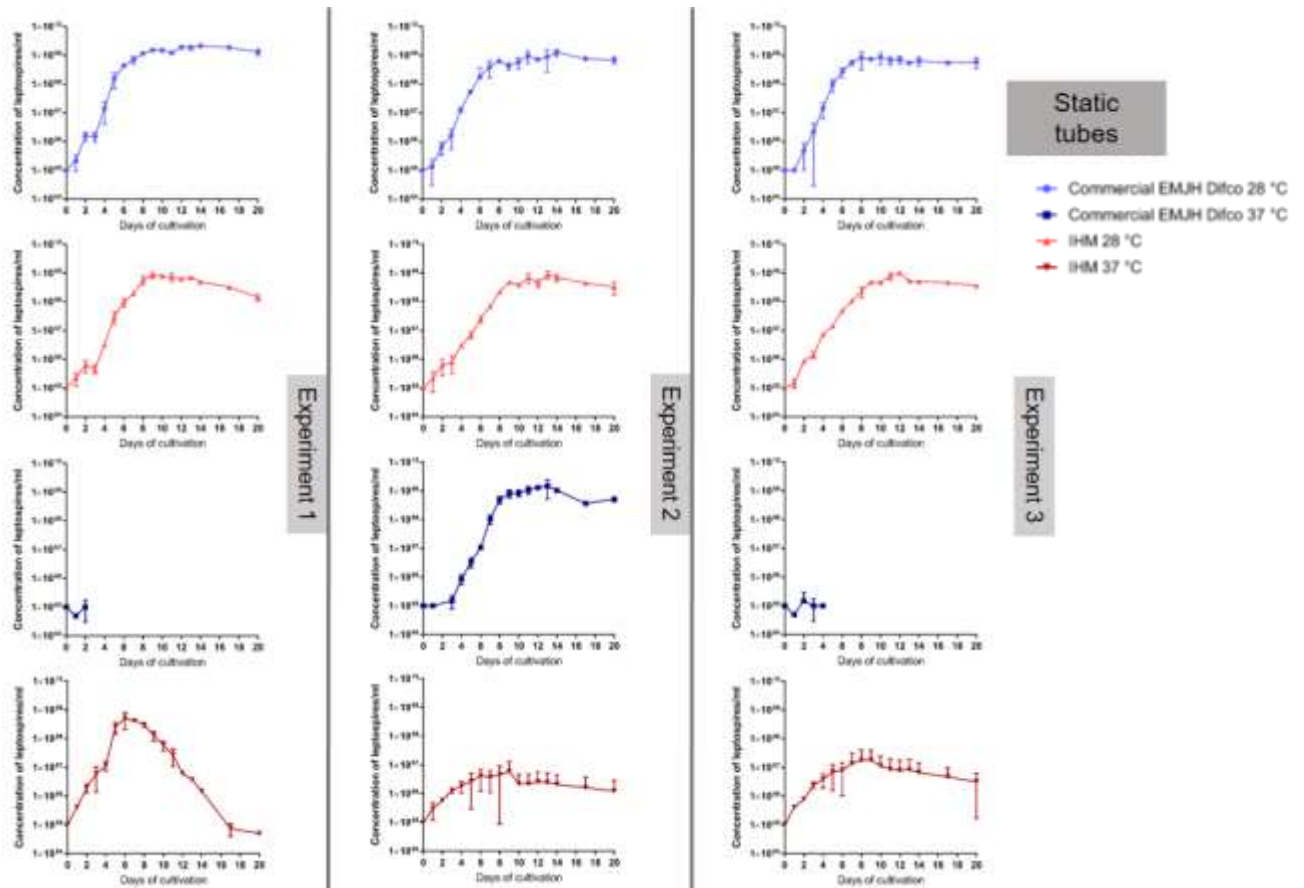


Figure S2. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using static tubes. The initial inoculum was 1×10^5 leptospires/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

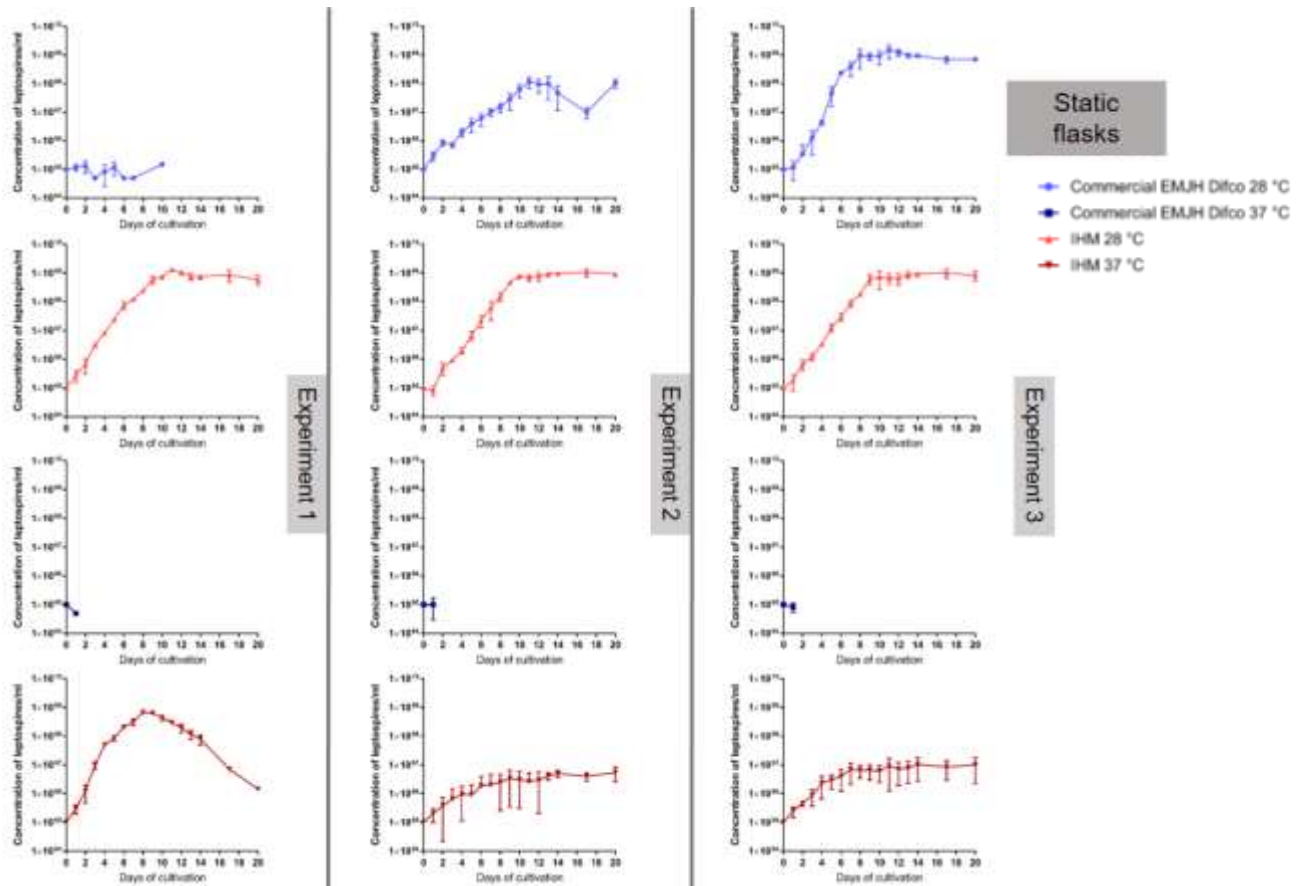


Figure S3. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using static flasks. The initial inoculum was 1×10^5 leptospires/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

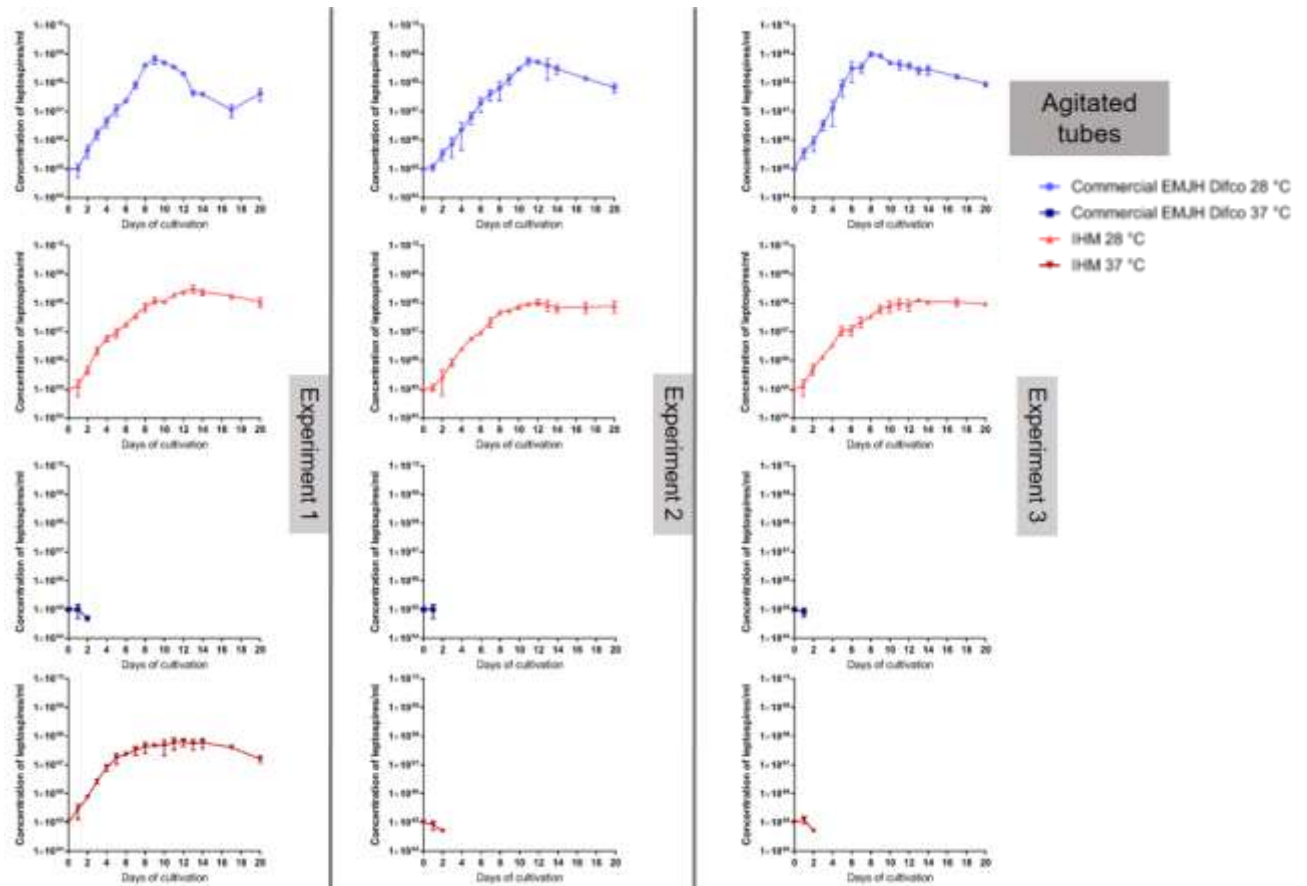


Figure S4. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strain RCA in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using agitated tubes. The initial inoculum was 1×10^5 leptospirae/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

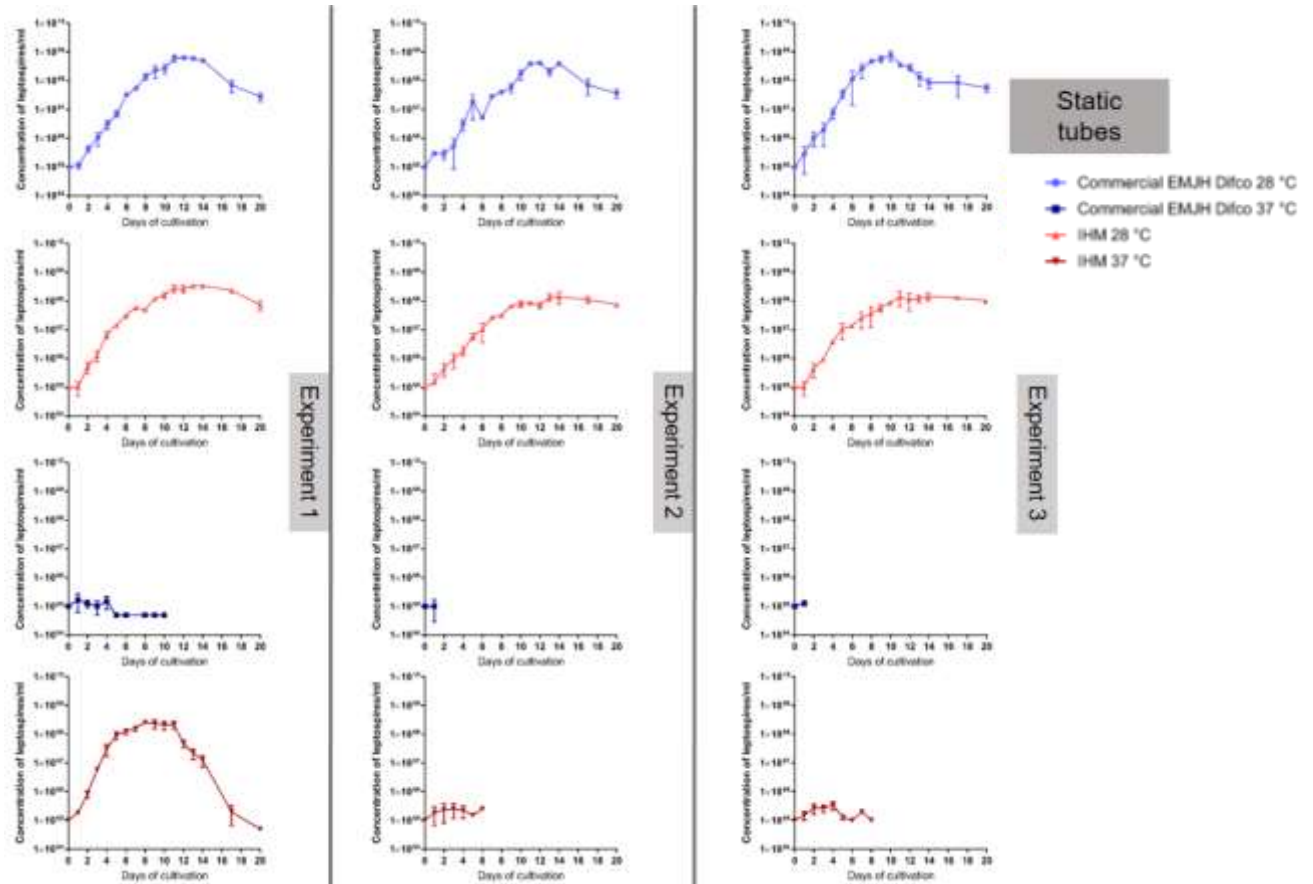


Figure S5. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strain RCA in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using static tubes. The initial inoculum was 1×10^5 leptospores/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

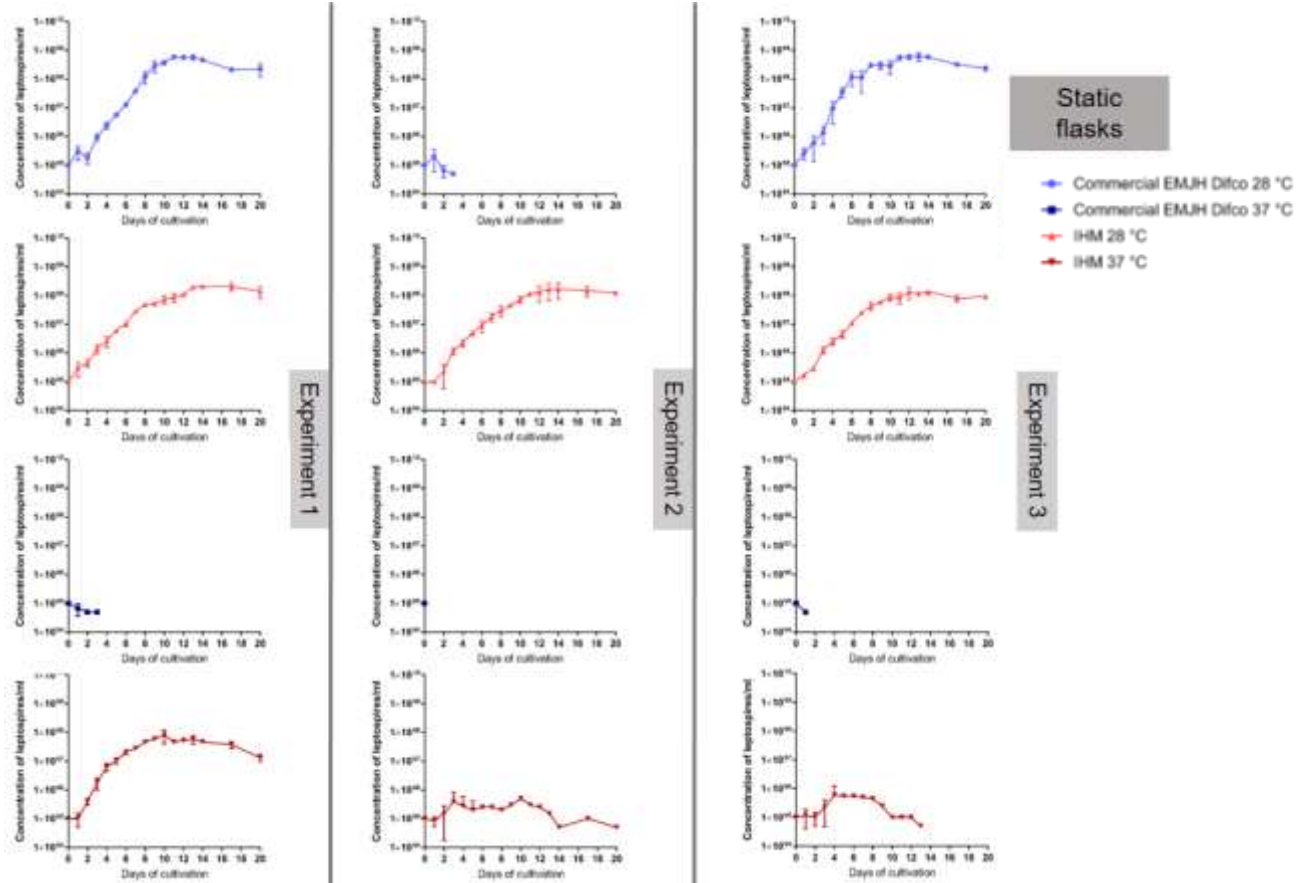


Figure S6. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strain RCA in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using static flasks. The initial inoculum was 1×10^5 leptospores/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, n=3 samples) and the bars the standard deviation.

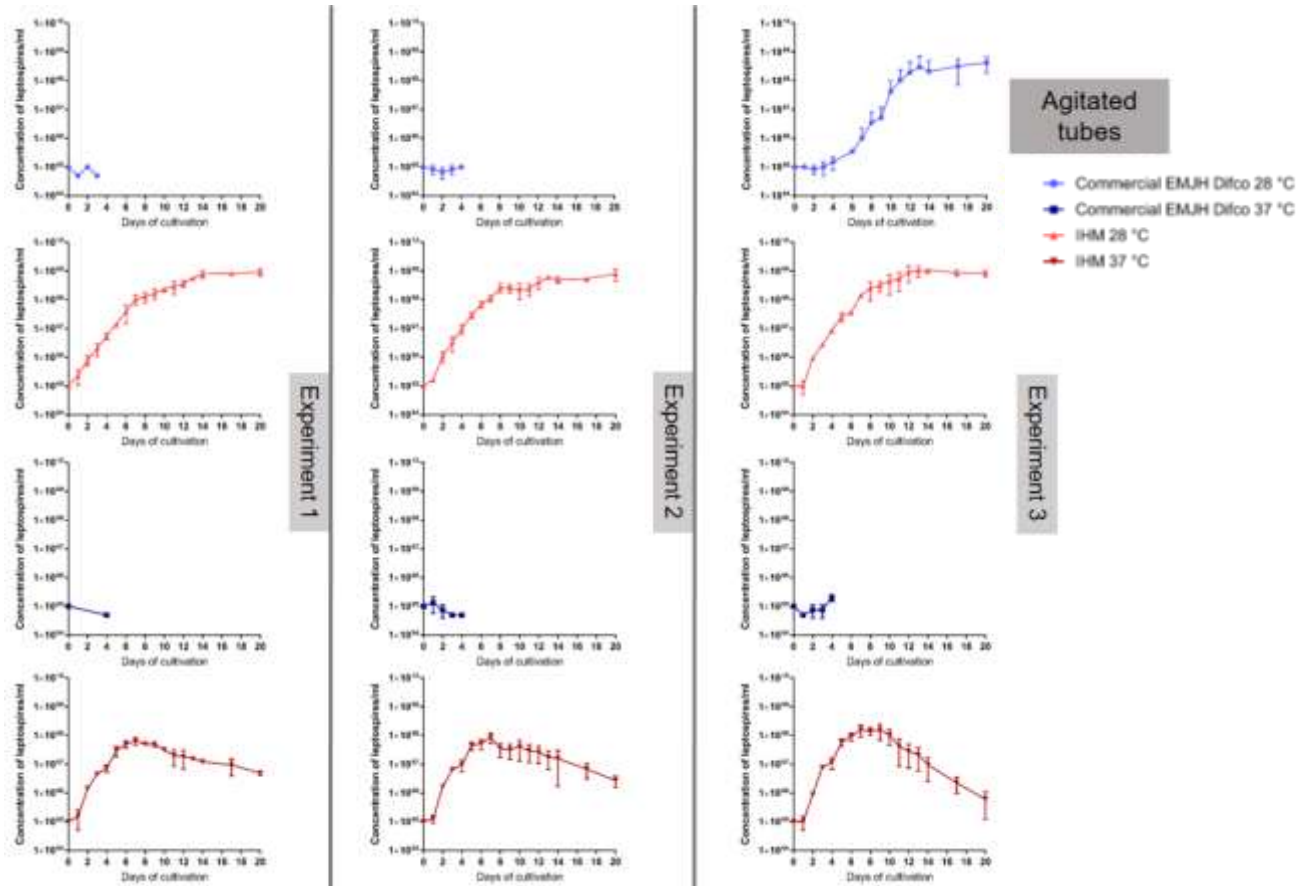


Figure S7. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. kirschneri* strain 61H in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using agitated tubes. The initial inoculum was 1×10^5 leptospira/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

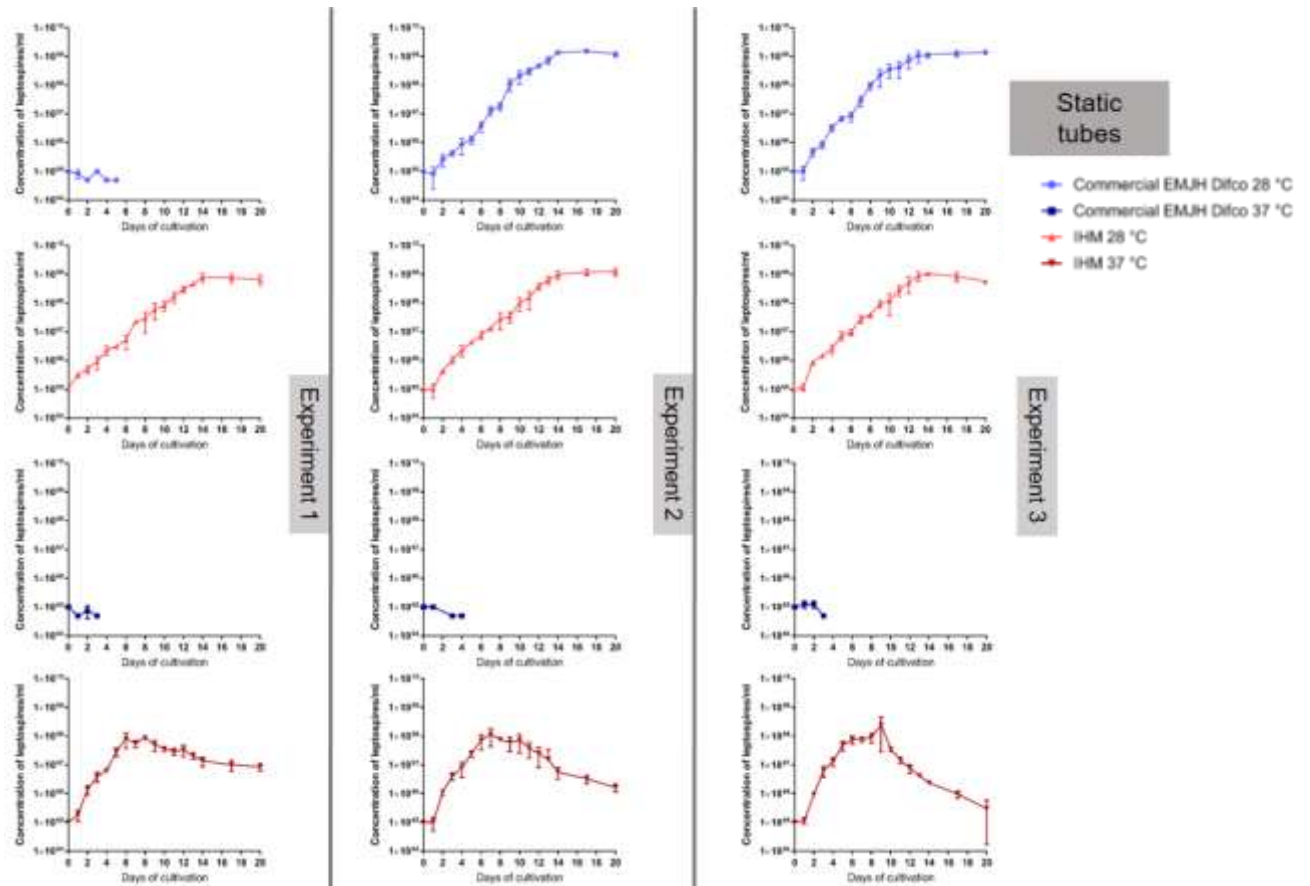


Figure S8. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. kirschneri* strain 61H in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using static tubes. The initial inoculum was 1×10^5 leptospirae/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

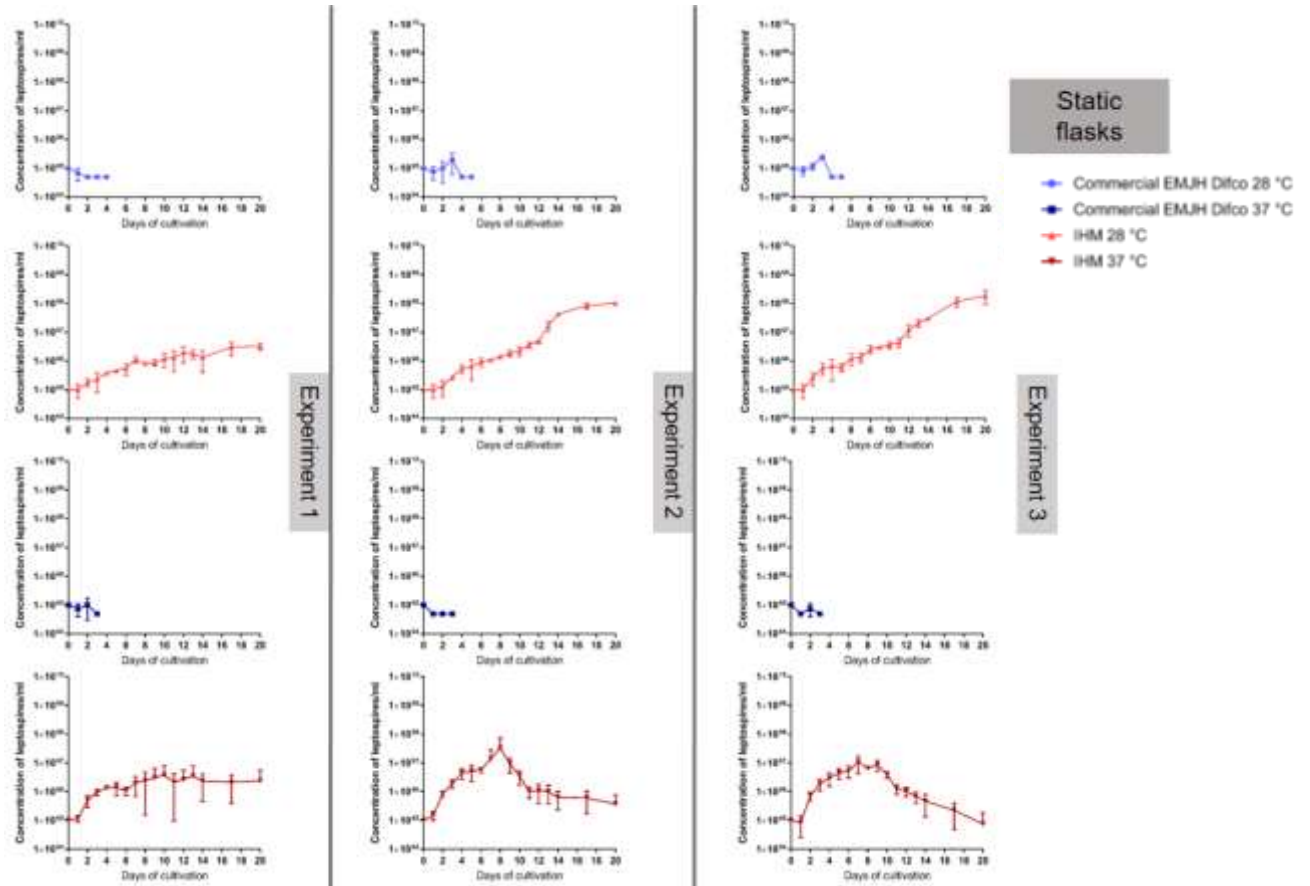


Figure S9. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. kirschneri* strain 61H in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37 °C using static flasks. The initial inoculum was 1×10^5 leptospirae/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

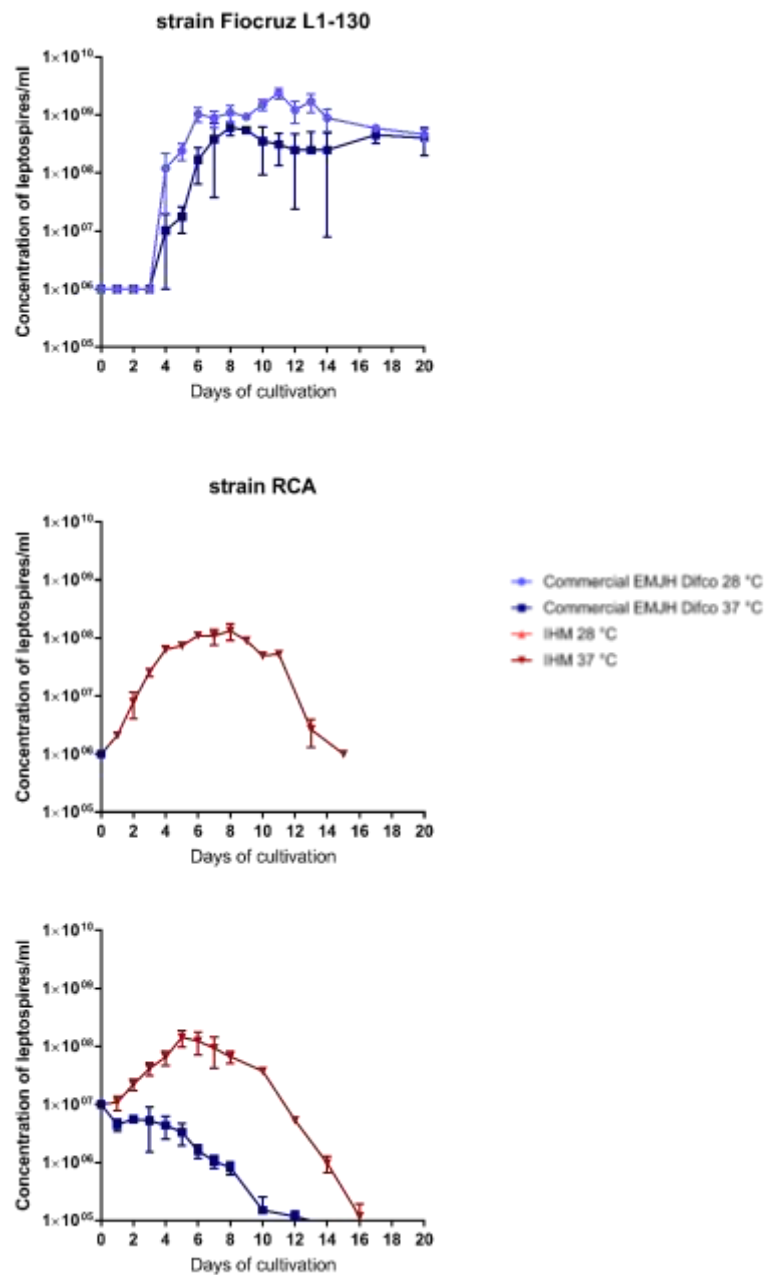


Figure S10. Bacterial growth curves of the pathogenic species *L. interrogans* strains Fiocruz L1-130 and RCA in the EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using static tubes. The initial inoculum were 1×10^6 and 1×10^7 leptospires/ml. The lines represent the mean of one experiment in each condition (triplicates, $n=3$ samples) and the bars the standard deviation.

Table S2. Evaluation of the initial inoculums of the pathogenic strains of *L. interrogans* (L1-130 and RCA) and *L. kirschneri* (61H) during the *in vitro* growth in EMJH media under the temperatures of 28°C and 37°C using agitated tubes, static tubes and static flasks

		Agitated tubes									
		Days post-inoculum									
		10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴	
		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml	
Strain	Media	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
Fiocruz	EMJH	-	-	-	-	-	-	6	-	4	-
L1-130	IHM	9	10	7	-	5	6	4	5	2	3
RCA	EMJH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IHM	15	-	11	-	8	-	5	-	2	-
61H	EMJH	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-
	IHM	17	11	13	9	8	7	5	4	4	3

		Static tubes									
		Days post-inoculum									
		10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴	
		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml	
Strain	Media	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
Fiocruz	EMJH	14	-	10	-	6	-	5	-	4	-
L1-130	IHM	12	10	9	7	5	5	4	3	3	2
RCA	EMJH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IHM	16	-	12	-	9	-	5	-	2	-
61H	EMJH	14	-	11	-	8	-	5	-	3	-
	IHM	18	12	14	9	9	7	6	4	5	3

		Static flasks									
		Days post-inoculum									
		10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴	
		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml		leptospire/ml	
Strain	Media	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
Fiocruz	EMJH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1-130	IHM	13	10	-	-	8	-	6	-	3	2
RCA	EMJH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IHM	18	-	15	-	11	-	8	-	4	-
61H	EMJH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IHM	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5

Legend. °C – Temperature; EMJH – Commercial EMJH; IHM – In house EMJH.

**4.3 Manuscrito 2 - Host-adapted *Leptospira interrogans* immunoreactive proteins
as immunodiagnostic and vaccine candidates identified by cell surface
immunoprecipitation**

Manuscrito a ser submetido à Revista Infection and Immunity

Host-adapted *Leptospira interrogans* immunoreactive proteins as immunodiagnostic
and vaccine candidates identified by cell surface immunoprecipitation

Carlos E. P. da Cunha^{1,2*}; Liana N. Barbosa^{1*}; André A. Grassmann^{1,*†}; Carolina R. Félix¹; Bianca S. Siedler^{1,2}; Anelize O. C. Félix¹; Everton B. Bettin¹; Amanda S. Hecktheuer¹; Odir A. Dellagostin¹; Johnjoe McFadden^{2,*}; Alan J. A. McBride^{1,*,#}

¹Biotechnology Unit, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

²School of Biomedical and Molecular Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, UK

* These authors contributed equally to the manuscript.

†Present address: Department of Medicine, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA.

#Correspondence: Alan McBride, Unidade de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Capão de Leão, RS, 96160-000, Brazil. Email: alan.mcbride@ufpel.edu.br

KEYWORDS: leptospirosis, zoonosis, target discovery, surface-exposed proteins, host-pathogen interactions

Abstract

Leptospirosis is a zoonosis caused by pathogenic *Leptospira* spp. that is difficult to diagnose and lacks an effective universal vaccine. Several approaches have been used to identify leptospiral vaccine candidates and targets for diagnostics, yet most of these studies were based on *in vitro*-grown bacteria. It is well-established that *Leptospira* spp. adapt to the host environment, expressing proteins that are absent *in vitro*. These host specific proteins represent an unexplored pool of antigens for the development of novel vaccines and diagnostics for leptospirosis. Using host-adapted *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 and sera collected from leptospirosis patients we immunoprecipitated and identified seroreactive proteins by mass spectrometry. A total of 157 immunoreactive proteins were initially identified. *In silico* analysis suggested that 24 of these proteins were surface exposed and represented potential vaccine candidates. This is the first report of immunoprecipitation with host-adapted leptospires, providing novel insights for host-pathogen interaction and new targets for vaccine and diagnostic development.

1. INTRODUCTION

Leptospirosis is a life-threatening, zoonotic disease caused by pathogenic *Leptospira* spp. [1]. Approximately 1 million human cases are estimated to occur annually with almost 60 thousand deaths worldwide [2], representing an increase of 74.6% over 15 years [3]. Preventive measures such as sanitation, infrastructure, vaccination, and rapid diagnostic tests are crucial for controlling the spread of leptospirosis [4].

The recommended standard laboratory diagnostic test, the microscopic agglutination test (MAT), is a subjective, serovar-specific, and a laborious test which often fails to provide conclusive results in a timely manner for patient management [5]. The vaccines available are based on inactivated leptospires, bacterins, and they are not widely available for human use. Bacterin-induced immunity tends to be short-term, serovar-specific, and has several known side-effects [6,7]. The development of rapid diagnostic tests using recombinant leptospiral antigens and novel recombinant subunit vaccines has expanded over the last two decades; however, only limited success has been achieved [8].

Various studies have attempted to identify the surfaceome or the immunoproteome of pathogenic *Leptospira* spp. using different approaches [9-18]. Several seroreactive proteins were identified and evaluated as targets for immunodiagnostic tests or as vaccine candidates [19]. These studies employed bacteria cultured *in vitro*, which express a distinct set of proteins compared to bacteria grown using *in vivo*-like conditions [20,21], including different surface exposed proteins.

Here, we take advantage of the dialysis membrane chambers (DMC) model, where leptospires are grown within dialysis tubing implanted in peritoneal cavity of rats

(20,24). Host adapted leptospires were used in immunoprecipitation studies to identify seroreactive proteins with diagnostic and/or vaccine potential [20,22,23]. We identified 157 proteins, 24 of which were predicted to be surface-exposed proteins that may play an important role in immunity and are potential vaccine candidates and targets for immunodiagnosics. In addition, this study provides novel insights into leptospirosis pathogenesis and interaction with the host.

2. RESULTS AND DISCUSSION

Previous screens to identify immunoreactive antigens have targeted *in vitro*-grown leptospires [9-18]. However, host-adapted *Leptospira* display a distinct repertoire of surface proteins, very different from that of bacteria grown *in vitro* [21]. Here, we used the DMC model for preparing host-adapted *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 in which the bacteria were grown in dialysis tubing implanted in peritoneal cavity of rats [21,24]. Host-adapted *Leptospira* were subjected to cell-surface immunoprecipitation (CSIP) with human convalescent-pooled sera; immunoprecipitated proteins were identified by mass spectrometry and compared against *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 entries in Uniprot. *L. interrogans* grown *in vitro* (*in vitro* cultures – IVC) and sera of healthy humans were used as controls.

We identified a total of 157 immunoprecipitated proteins that were present in either DMC or IVC samples, but absent in samples immunoprecipitated with healthy sera (data not shown); many of these proteins have known intracellular functions or are known to be below the surface of *Leptospira* (e.g. flagellin) and are thereby unlikely to be vaccine candidates [8]. Consequently, we used a previously described bioinformatics approach, with minor modifications, allowing the identification of 24 predicted surface-exposed proteins, present in all pathogenic *Leptospira* spp.

evaluated, and therefore, prospective vaccine candidates [8]. Among these 24 proteins, many play a vital role in pathogenicity and/or are related to immunity against the disease, and we may be strong vaccine candidate antigens based on their annotation and bioinformatic analysis (Table 1). All 157 proteins are also promising targets for immunodiagnostic tests considering they have been precipitated by the sera of seropositive individuals.

In order to validate the immunoprecipitation studies, two proteins identified by CSIP-MS, LIC10881 and LIC11086, were obtained from expression in *E. coli* and confirmed by a western blot analysis with the same serum pool used in CSIP (Figure S1). These proteins had previously been identified as potential vaccine candidates [8]. Among the 24 proteins identified here, LipL21, LigB, LIC10881, OmpL1, LipL32, LIC11570/GspD, LipL46 and LipL41 were previously characterized as surface-exposed, and five have been tested as vaccine candidates [25-32].

Eight of the 24 proteins have no annotated domain on Interpro, no predicted function, or predicted GO function or location (LIC10011, LIC10231, LIC10461, LIC11299, LIC11885, LIC11888, LIC12399, LIC13410 – Table 1). 157 proteins were present in both *in vitro* cultured spirochetes (IVC) and those from DMCs (Table 1). Only 2 were not detected in DMC samples (LIC10539 and LIC13381). The remaining 8 proteins are exclusive to host-adapted *Leptospira* (LIC10231, LIC10462, LIC10881, LIC11086, LIC11935, LIC12631, LIC20250). LIC10462 has a Bor domain, which increases survival of the Gram-negative pathogen *E. coli* in the presence of host serum and is considered a virulence determinant [33,34]. Furthermore, the expression of LIC10462 is upregulated in host-adapted *L. interrogans* [20]. LIC10496 is a TolC outer membrane efflux pump, part of a type I secretion system, and has been previously identified as a strong vaccine candidate antigen [8]; furthermore, several TolC proteins

from different species of Gram-negative bacteria are protective antigens [8]. LIC11086 is a transmembrane beta barrel porin, part of the phenol degradation pathway according to InterProScan (MetA) [8]. LIC11570 (general secretory pathway protein D – GspD) is the outer membrane component of the type 2 secretion system; LIC11570 has been confirmed as a transmembrane OMP in *L. interrogans* [29,35]. LIC11935 has been previously described as a putative lipoprotein [36], however our bioinformatic analysis suggest LIC11935 is a transmembrane beta barrel; this information is in agreement with data obtained from InterproScan (putative beta barrel porin, omp-like protein – Table 1) and with previous finding identifying this protein as a OMP [37,38]. LIC13381 was suggested as a vaccine candidate by *in silico* analysis [37,39]. LIC20250 is member of the OmpA family with a high expression rate [39]; members of this protein family have been related to pathogenicity and described as surface exposed [40]. LIC13417 and LIC13418 are likely misannotated due to a stop codon mutation in strain Fiocruz L1-130, that is absent in sv. Lai strain 55601 (LA4272) where it encodes an alginate export domain-containing protein ortholog; the alginate export domain is an 18-strand beta barrel structure located on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* and is responsible for the secretion of alginate polymer [41]. LIC11834 is a lipoprotein iron sensor (FecR), an essential nutrient for *Leptospira*, whose surface exposure is still undetermined in *Leptospira*, although it appears to be a periplasmic protein in *E. coli* [42]; nevertheless, identifying other proteins that interact with LIC11834 may serve as a start point to identify and characterize other essential, surface-exposed iron-sensing proteins (e.g. FecA) or pathways. LIC12631 is a cytotoxic, haemolytic sphingomyelinase that has been previously detected by human sera [43-45]. Different studies suggest that this gene is only expressed during infection or when in *in vivo*-like conditions during *in vitro* culture [20,44,46,57].

The use of CSIP-MS using host-adapted *L. interrogans* allowed the identification of novel vaccine candidate antigens. Indeed, several of the proteins identified here were previously evaluated as vaccines, while others were shown to be surface exposed. In addition to surface exposed proteins, we identified several proteins predicted to localize in other cell compartments that not the outer membrane. Those antigens are prospective candidates for the development of rapid diagnostic tests, once they are recognized by the sera of leptospirosis patients. In addition, predicted functions for several of the proteins identified here are related to pathogenicity, virulence, and other roles for bacterial metabolism (e.g. iron sensing, efflux pump). Blocking those function would likely impair the survival of *Leptospira* during infection, rendering them promising vaccine targets [19].

This is the first study assessing the *L. interrogans* immunoproteome using host-adapted cells. Our results have identified novel antigens that may be further investigated as components of new diagnostic tests or vaccines. These antigens may also shed light on leptospirosis pathogenesis and its interaction with the host.

3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

3.1. *In vitro* bacterial culture

Escherichia coli was cultured in LB broth or solid media at 37 °C (250 rpm and no agitation, respectively); ampicillin was used at a final concentration of 100 µg/mL when required for selection. *L. interrogans* was cultivated in EMJH [24] at 30 °C.

3.2. *Leptospira* cultivation within dialysis membrane chambers

L. interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 was cultivated withing DMCs as previously described [20,24]. Briefly,

the culture was grown to mid-late log phase *in vitro* (EMJH, 30 °C) and then diluted to 10^4 cells/mL and transferred to sterile dialysis tubing. Adult female Sprague-Dawley rats weighting 175-200 g were anesthetized with ketamine and xylazine. One DMC per rat was implanted into the peritoneal cavity through an incision in the abdominal wall. The incision was sutured and closed with wound clips. Analgesia was administered for at least two days post-surgery. After 9 to 12 days, animals were euthanized with CO₂ and DMCs recovered for the subsequent analysis.

3.3. Serum samples

Laboratory-confirmed convalescent serum samples were obtained from human patients during a hospital surveillance in Salvador, BA, kindly provided by Fiocruz. Pooled sera of healthy (MAT-negative) subjects obtained during a sera-surveillance in Pelotas, RS, and were used as the negative control.

3.4. Antigen immunoprecipitation

Immunoprecipitation was carried out as previously described for Gram-negative bacteria with minor adaptations to *Leptospira* spp. [22,23]. Briefly, once cultures reached density of approximately 10^8 CFU/mL, cells were harvested ($8,000 \times g$, 15 min, 4 °C), washed three times with PBS containing 1% BSA (w/v). Pooled sera were diluted according to their MAT titres in a final volume of 1 mL, which was used to resuspend pelleted cells and incubate for 90 min at 4 °C. Cells were washed twice as described above and incubated with lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) for 1 h at 37 °C. Lysed cells were centrifuged ($14,100 \times g$, 1 h, 4 °C) and incubated with protein A/G UltraLink beads (Thermo Fisher Scientific) (16 h, 4 °C). Beads were washed 5 times with lysis

buffer ($2,500 \times g$, 2 min, 4 °C). Elution was performed with SDS (1% - w/v) and boiling for 10 min followed by centrifugation ($2,500 \times g$, 3 min). Supernatant was collected and reduced by adding 10 mM DTT and boiling (2 min). Samples were then alkylated by incubation 50 mM iodoacetamide for 30 min in the dark. Samples were then lyophilized and stored at -20 °C until further use.

3.5. Identification of immunoprecipitated antigens by mass spectrometry

Samples were run into an SDS-PAGE gel and each gel lane cut as a single gel slice. Each slice was subjected to in-gel tryptic digestion using a DigestPro automated digestion unit (Intavis Ltd.) to minimise manual handling. The resulting peptides were fractionated using an Ultimate 3000 nanoHPLC system in line with an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific). In brief, peptides in 1% (v/v) formic acid were injected onto an Acclaim PepMap C18 nano-trap column (Thermo Scientific). After washing with 0.5% (v/v) acetonitrile 0.1% (v/v) formic acid peptides were resolved on a 250 mm $\times$ 75 μ m Acclaim PepMap C18 reverse phase analytical column (Thermo Scientific) over a 150 min, 7-segment organic gradient (1-6% solvent B over 1 min, 6-15% B over 58 min, 15-32% B over 58 min, 32-40% B over 5 min, 40-90% B over 1 min, 90% B for 6 min, and then reduced to 1% B over 1 min) with a flow rate of 300 nL/min. Solvent A was 0.1% formic acid and Solvent B was aqueous 80% acetonitrile in 0.1% formic acid. Peptides were ionized by nano-electrospray ionization at 2.2 kV using a stainless-steel emitter with an internal diameter of 30 μ m (Thermo Fisher Scientific) and a capillary temperature of 250 °C.

All spectra were acquired using an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer controlled by Xcalibur 2.0 software (Thermo Scientific) and operated in data-dependent acquisition mode. FTMS1 spectra were collected at a resolution of 120,000 over a

scan range (m/z) of 350-1550, with an automatic gain control (AGC) target of 400,000 and a max injection time of 100 ms. The Data Dependent mode was set to TopSpeed and the most intense ions were selected for MS/MS. Precursors were filtered according to charge state (to include charge states 2-7) and with monoisotopic precursor selection. Previously interrogated precursors were excluded using a dynamic window (40 s $\pm$ 10 ppm). The MS2 precursors were isolated with a quadrupole mass filter set to a width of 1.6 m/z . ITMS2 spectra were collected with an AGC target of 5,000, max injection time of 50 ms and HCD collision energy of 35%.

3.6. Data Analysis

The raw proteomic mass spectrometry data files were processed using Proteome Discoverer software v1.4 (Thermo Scientific) and searched against the UniProt database for the 3655 entries under *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 using the SEQUEST algorithm. Peptide precursor mass tolerance was set at 10 ppm, and MS/MS tolerance was set at 0.6 Da. Search criteria included carbamidomethylation of cysteine (+57.0214) as a fixed modification and oxidation of methionine (+15.9949) as a variable modification. Searches were performed with full tryptic digestion and a maximum of 1 missed cleavage was allowed. The reverse database search option was enabled, and all peptide data was filtered to satisfy false discovery rate (FDR) of 1%.

3.7. Identification of likely surface-exposed proteins

Proteins identified by CSIP-MS were further analysed by bioinformatics analysis to select proteins that were likely to be surface exposed. SignalP was used to predict the presence of signal peptide [47]. LipoP, SpLip predicted the presence of lipobox

[48,49]. PSORTb, Gneg-Ploc predicted subcellular location (outer membrane or secreted) [50,51]. Bomp, HHomp were used to predict outer membrane beta barrel structures [50,52]. Proteins containing more than one transmembrane alpha helix were considered as inner membrane proteins, as determined by Phobius, TMHMM, HMMTOP, and MEMSAT [53-56]. Orthologs in other *Leptospira* spp. were identified as previously described [8]. Proteins without orthologs on all pathogenic *Leptospira* spp. were discarded (up to one exception was allowed).

3.8. Recombinant protein expression and Western blotting

LIC10881 and LIC11086 coding sequences were cloned in pAE and expressed in *E. coli* to validate the CSIP-MS results performing a Western blot using the same pooled sera as used in the immunoprecipitation. Briefly, both LICs were amplified by PCR (10881F: TAGGTACCATAAGGCTTCTCTTCGTC; 10881R: ACTAAGCTTTCATTCTCTTGATTATCG; 11086F: CTAGATCTCACATCACACAGGTATGGG; 11086R: CGCAAGCTTTTACTTTGTCTCTTGAG). PCR products were purified using illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) and cloned into the pAE expression vector. Cloning was confirmed by restriction analysis. Recombinant plasmids were used to transform *E. coli* BL21(DE3) Star and protein expression was induced with 1 mM IPTG for 3 h when absorbance at OD₆₀₀ reached a value of 0.6-0.8. Recombinant protein expression was confirmed by Western blot with anti-6His tag monoclonal antibody (Sigma Aldrich). Purification was performed by nickel-affinity chromatography. *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 grown either in DMC or *in vitro*, and purified proteins were loaded onto a 12% acrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and blocked overnight with 5% non-fat dry milk. The same

pooled sera used in CSIP was diluted 1:100 and incubated with the membrane for 2 h at room temperature with gentle agitation. Horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG was used as a secondary antibody following manufacturer's instructions. Bands were revealed using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), The Royal Society Grant number IC170171 (United Kingdom). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

FUNDING STATEMENT

The authors are thankful for CNPq, CAPES, and FAPERGS for financial support and scholarships.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15(5), 297-307. doi:10.1038/nrmicro.2017.5
- [2] Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., . . . Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A

Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis, 9(9), e0003898.
doi:10.1371/journal.pntd.0003898

[3] WHO. (1999). Leptospirosis worldwide, 1999. Wkly Epidemiol Rec, 74(29), 237-242.

[4] McBride, A. J., Athanazio, D. A., Reis, M. G., & Ko, A. I. (2005). Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis, 18(5), 376-386.

[5] WHO, & ILS. (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World Health Organization.

[6] Adler, B. (2015). Vaccines against leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol, 387, 251-272. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_10

[7] Dellagostin, O. A., Grassmann, A. A., Rizzi, C., Schuch, R. A., Jorge, S., Oliveira, T. L., . . . Hartwig, D. D. (2017). Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. Int J Mol Sci, 18(1). doi:10.3390/ijms18010158

[8] Grassmann, A. A., Kremer, F. S., Dos Santos, J. C., Souza, J. D., Pinto, L. D. S., & McBride, A. J. A. (2017). Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. Front Immunol, 8, 463. doi:10.3389/fimmu.2017.00463

[9] Cullen, P. A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A. I., Haake, D. A., & Adler, B. (2005). Surfaceome of Leptospira spp. Infect Immun, 73(8), 4853-4863. doi:10.1128/IAI.73.8.4853-4863.2005

[10] Eribo, B., Mingmongkolchai, S., Yan, T., Dubbs, P., & Nelson, K. E. (2012). Leptospire genomic diversity revealed by microarray-based comparative genomic hybridization. Appl Environ Microbiol, 78(9), 3045-3050. doi:10.1128/AEM.07465-11

- [11] Eshghi, A., Cullen, P. A., Cowen, L., Zuerner, R. L., & Cameron, C. E. (2009). Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. *J Proteome Res*, 8(10), 4564-4578. doi:10.1021/pr9004597
- [12] Humphryes, P. C., Weeks, M. E., Gielbert, A., Thomson, G., & Coldham, N. G. (2012). Analysis of multiple *Leptospira interrogans* serovar Canicola vaccine proteomes and identification of LipL32 as a biomarker for potency. *Clin Vaccine Immunol*, 19(4), 587-593. doi:10.1128/CVI.05622-11
- [13] Lessa-Aquino, C., Borges Rodrigues, C., Pablo, J., Sasaki, R., Jasinskas, A., Liang, L., . . . Felgner, P. L. (2013). Identification of seroreactive proteins of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni using a high-density protein microarray approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(10), e2499. doi:10.1371/journal.pntd.0002499
- [14] Lessa-Aquino, C., Lindow, J. C., Randall, A., Wunder, E., Pablo, J., Nakajima, R., . . . Felgner, P. L. (2017). Distinct antibody responses of patients with mild and severe leptospirosis determined by whole proteome microarray analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(1), e0005349. doi:10.1371/journal.pntd.0005349
- [15] Lessa-Aquino, C., Wunder, E. A., Jr., Lindow, J. C., Rodrigues, C. B., Pablo, J., Nakajima, R., . . . Felgner, P. L. (2015). Proteomic features predict seroreactivity against leptospiral antigens in leptospirosis patients. *J Proteome Res*, 14(1), 549-556. doi:10.1021/pr500718t
- [16] Pinne, M., Matsunaga, J., & Haake, D. A. (2012). Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. *J Bacteriol*, 194(22), 6074-6087. doi:10.1128/JB.01119-12
- [17] Vieira, M. L., Pimenta, D. C., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., & Nascimento, A. L. (2009). Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* Virulent Strain. *Open Microbiol J*, 3, 69-74. doi:10.2174/1874285800903010069

- [18] Zeng, L., Zhang, Y., Zhu, Y., Yin, H., Zhuang, X., Zhu, W., . . . Qin, J. (2013). Extracellular proteome analysis of *Leptospira interrogans* serovar Lai. *OMICS*, 17(10), 527-535. doi:10.1089/omi.2013.0043
- [19] Grassmann, A. A., Souza, J. D., & McBride, A. J. (2017). A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol*, 8, 256. doi:10.3389/fimmu.2017.00256
- [20] Caimano, M. J., Sivasankaran, S. K., Allard, A., Hurley, D., Hokamp, K., Grassmann, A. A., . . . Nally, J. E. (2014). A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *PLoS Pathog*, 10(3), e1004004. doi:10.1371/journal.ppat.1004004
- [21] Nally, J. E., Grassmann, A. A., Planchon, S., Sergeant, K., Renaut, J., Seshu, J., . . . Caimano, M. J. (2017). Pathogenic Leptospire Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 362. doi:10.3389/fcimb.2017.00362
- [22] Cunha, C. E., Newcombe, J., Dellagostin, O. A., & McFadden, J. (2017). Immunoprecipitation of cell surface proteins from Gram-negative bacteria. *Bio-protocol*, 7(9). doi:10.21769/BioProtoc.2250
- [23] Newcombe, J., Mendum, T. A., Ren, C. P., & McFadden, J. (2014). Identification of the immunoproteome of the meningococcus by cell surface immunoprecipitation and MS. *Microbiology*, 160(Pt 2), 429-438. doi:10.1099/mic.0.071829-0
- [24] Grassmann, A. A., McBride, A. J., Nally, J. E., & Caimano, M. J. (2015). Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira interrogans* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. *Bio Protoc*, 5(14), e1536.

- [25] Conrad, N. L., Cruz McBride, F. W., Souza, J. D., Silveira, M. M., Felix, S., Mendonca, K. S., . . . McBride, A. J. (2017). LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(3), e0005441. doi:10.1371/journal.pntd.0005441
- [26] Cullen, P. A., Haake, D. A., Bulach, D. M., Zuerner, R. L., & Adler, B. (2003). LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*, 71(5), 2414-2421.
- [27] Fernandes, L. G., Vieira, M. L., Kirchgatter, K., Alves, I. J., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., . . . Nascimento, A. L. (2012). OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun*, 80(10), 3679-3692. doi:10.1128/IAI.00474-12
- [28] Grassmann, A. A., Felix, S. R., dos Santos, C. X., Amaral, M. G., Seixas Neto, A. C., Fagundes, M. Q., . . . Dellagostin, O. A. (2012). Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol*, 19(5), 740-745. doi:10.1128/CVI.05720-11
- [29] Haake, D. A., & Matsunaga, J. (2010). *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol Microbiol*, 77(4), 805-814. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x
- [30] Haake, D. A., Mazel, M. K., McCoy, A. M., Milward, F., Chao, G., Matsunaga, J., & Wagar, E. A. (1999). Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*, 67(12), 6572-6582.
- [31] Matsunaga, J., Werneid, K., Zuerner, R. L., Frank, A., & Haake, D. A. (2006). LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. *Microbiology*, 152(Pt 12), 3777-3786.

- [32] Oliveira, R., Domingos, R. F., Siqueira, G. H., Fernandes, L. G., Souza, N. M., Vieira, M. L., . . . Nascimento, A. L. (2013). Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), e2396. doi:10.1371/journal.pntd.0002396
- [33] Barondess, J. J., & Beckwith, J. (1990). A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature*, 346(6287), 871-874. doi:10.1038/346871a0
- [34] Lynne, A. M., Skyberg, J. A., Logue, C. M., & Nolan, L. K. (2007). Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 102(3), 660-666. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03133.x
- [35] d'Enfert, C., Reyss, I., Wandersman, C., & Pugsley, A. P. (1989). Protein secretion by gram-negative bacteria. Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem*, 264(29), 17462-17468.
- [36] Zhukova, A., Fernandes, L. G., Hugon, P., Pappas, C. J., Sismeiro, O., Coppee, J. Y., . . . Picardeau, M. (2017). Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 10. doi:10.3389/fcimb.2017.00010
- [37] Viratyosin, W., Ingsriswang, S., Pacharawongsakda, E., & Palittapongarnpim, P. (2008). Genome-wide subcellular localization of putative outer membrane and extracellular proteins in *Leptospira interrogans* serovar Lai genome using bioinformatics approaches. *BMC Genomics*, 9, 181.
- [38] Zeng, L., Wang, D., Hu, N., Zhu, Q., Chen, K., Dong, K., . . . Zhu, Y. (2017). A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis. *Front Microbiol*, 8, 396. doi:10.3389/fmicb.2017.00396

- [39] Yang, H. L., Zhu, Y. Z., Qin, J. H., He, P., Jiang, X. C., Zhao, G. P., & Guo, X. K. (2006). In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. *BMC Genomics*, 7, 293.
- [40] Selvaraj, S. K., Periandythevar, P., & Prasadaraao, N. V. (2007). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells. *Microbes Infect*, 9(5), 547-557. doi:10.1016/j.micinf.2007.01.020
- [41] Whitney, J. C., Hay, I. D., Li, C., Eckford, P. D., Robinson, H., Amaya, M. F., . . . Howell, P. L. (2011). Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), 13083-13088. doi:10.1073/pnas.1104984108
- [42] Welz, D., & Braun, V. (1998). Ferric citrate transport of *Escherichia coli*: functional regions of the FecR transmembrane regulatory protein. *J Bacteriol*, 180(9), 2387-2394.
- [43] Carvalho, E., Barbosa, A. S., Gomez, R. M., Oliveira, M. L., Romero, E. C., Goncales, A. P., . . . Ho, P. L. (2010). Evaluation of the expression and protective potential of *Leptospiral* sphingomyelinases. *Curr Microbiol*, 60(2), 134-142. doi:10.1007/s00284-009-9519-3
- [44] Narayanavari, S. A., Lourdault, K., Sritharan, M., Haake, D. A., & Matsunaga, J. (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
- [45] Zhang, Y. X., Geng, Y., Yang, J. W., Guo, X. K., & Zhao, G. P. (2008). Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphigomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMB Rep*, 41(2), 119-125.

- [46] Lo, M., Cordwell, S. J., Bulach, D. M., & Adler, B. (2009). Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(12), e560. doi:10.1371/journal.pntd.0000560
- [47] Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8(10), 785-786. doi:10.1038/nmeth.1701
- [48] Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*, 12(8), 1652-1662. doi:10.1110/ps.0303703
- [49] Setubal, J. C., Reis, M., Matsunaga, J., & Haake, D. A. (2006). Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiology*, 152(Pt 1), 113-121.
- [50] Berven, F. S., Flikka, K., Jensen, H. B., & Eidhammer, I. (2004). BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue), W394-399. doi:10.1093/nar/gkh351
- [51] Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., . . . Brinkman, F. S. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13), 1608-1615. doi:10.1093/bioinformatics/btq249
- [52] Remmert, M., Linke, D., Lupas, A. N., & Soding, J. (2009). HHomp--prediction and classification of outer membrane proteins. *Nucleic Acids Res*, 37(Web Server issue), W446-451. doi:10.1093/nar/gkp325
- [53] Jones, D. T. (2007). Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, 23(5), 538-544. doi:10.1093/bioinformatics/btl677

[54] Kall, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 338(5), 1027-1036. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.016

[55] Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3), 567-580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315

[56] Tusnady, G. E., & Simon, I. (2001). The H²MMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 17(9), 849-850.

[57] Xue, F., Dong, H., Wu, J., Wu, Z., Hu, W., Sun, A., . . . Yan, J. (2010). Transcriptional responses of *Leptospira interrogans* to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(10), e857. doi:10.1371/journal.pntd.0000857

CAPTIONS AND LEGENDS

Table 1: Description of proteins identified by CSIP-MS and selected for further investigation. Both LIC and LA tags as well as Uniprot identification are shown. Proteins were classified as lipoproteins, beta-barrel outer membrane proteins, or as secreted according to literature data and analysis performed in this study. Proteins have been classified regarding their presence or absence in host-adapted cells: Exc, proteins exclusive to host-adapted cells; Y, proteins present in host-adapted and *in vitro* grown cells; N, proteins not present in host-adapted cells, identified in cells cultivated *in vitro* only. Proteins functions and domains are also described according to InterPro and GO annotation.

Supplementary Figure 1: Validation of CSIP-MS results by Western blot. LICs 11086, 10881 were cloned, expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) Star, and purified. *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 grown *in vitro* (37 °C) and host-adapted leptospiaras, as well as recombinant proteins and adequate controls, were run on SDS-PAGE (12%), transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with the same human convalescent pooled sera against pathogenic *Leptospira* spp. used to immunoprecipitated proteins. Bands were developed using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). LIC 11086 and 10881 were recognized by the sera on both Western blot and CSIP, corroborating and serving as proof of concept for the CSIP results. Lane 1: rLIC11086 (36.7 kDa); lane 2: rLIC10881 (61.9 kDa); lane 3: Host-adapted *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130; lane 4: *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130 grown *in vitro* (37 °C). There were no reactions with *E. coli* negative control (not shown). Molecular masses are shown based on Prestained Protein Ladder V (Geneaid).

SUPPLEMENTAR INFORMATION

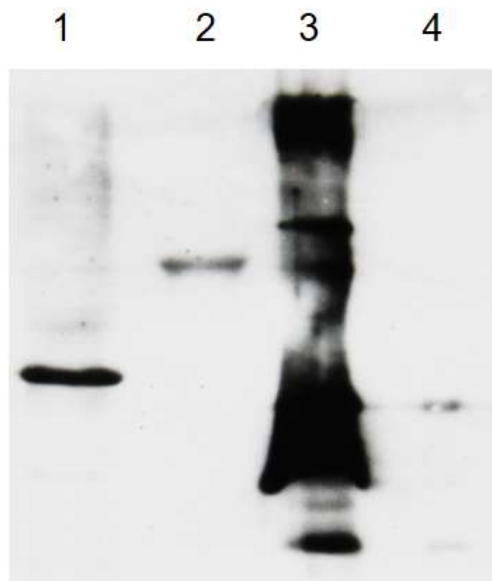
Table 1. Description of proteins identified by CSIP-MS and selected for further investigation.

<i>Locus (L1-130)</i>	<i>Locus (56601)</i>	<i>Uniprot</i>	<i>Classification (this study)</i>	<i>DMC</i>	<i>Gene product (UniProt)</i>	<i>Gene function (InterProScan)</i>	<i>Gene Ontology (biological process and/or molecular function)</i>	<i>Gene Ontology location</i>	<i>Domains and/or signature matches</i>
LIC10011	LA_0011	Q72WC6	Lipo	Y	LipL21	None predicted	None predicted		
LIC10231	LA_0272	Q72VR5	OMP	Exc	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted		
LIC10461	LA_3781	Q72V42	Lipo	Y	Putative lipoprotein	None predicted	None predicted		
LIC10462	LA_3780	Q72V41	Lipo	Exc	Uncharacterized protein	Bor	None predicted	OM	
LIC10464	LA_3778	Q72V39	Lipo	Y	Ig-like repeat domain protein (LigB)	None predicted	None predicted		Bacterial immunoglobulin like
LIC10496	LA_3733	Q72V07	BBOMP	Exc	Uncharacterized protein	Outer membrane efflux protein	Transport, transport activity		OM efflux protein
LIC10539	LA_3681	Q72UW8	Secr	N	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted	Integral component of membrane	Outer membrane protein/outer membrane enzyme PagP, beta-barrel
LIC10881	LA_3258	Q72TY3	BBOMP	Exc	Outer membrane protein, TonB dependent	None predicted	Transport, receptor activity	Membrane	TBDR, plug domain, beta-barrel
LIC10973	LA_3138	Q72TP4	BBOMP	Y	Outer membrane protein (ompL1)	Porin OmpL1, OMP, beta-barrel, OM enzyme PagP	Transport, porin activity	Plasma membrane, integral	Outer membrane protein/outer membrane enzyme PagP, beta-barrel

									component of membrane
LIC11086	LA_2976	Q72TD5	BBOMP	Exc	Uncharacterized protein	MetA-pathway of phenol degradation	None predicted		MetA-pathway of phenol degradation, putative
LIC11299	LA_2705	Q72SS6	Lipo	Y	Putative lipoprotein	None predicted	None predicted		
LIC11352	LA_2637	Q72SM7	Lipo	Y	LipL32	None predicted	None predicted		Surface lipoprotein of Spirochaetales order
LIC11570	LA_2375	Q72S17	OMP	Y	General secretory pathway protein D (gspD)	Type II, III secretion system, GspD/PilQ family, type II secretion system GspD	Protein secretion, protein secretion by type II system, protein transporter activity	OM/type II secretion system complex	Type II secretion system GspD, GspD/PilQ family, type II/III secretion system, NolW-like
LIC11834	LA_2083	Q72RB4	Lipo	Y	Putative lipoprotein	Fe(2+)-dicitrate sensor, transmembrane component	None predicted		Fe(2+)-dicitrate sensor, transmembrane component, FecR protein
LIC11885	LA_2024	Q72R63	Lipo	Y	Putative lipoprotein (LipL46)	None predicted	None predicted		
LIC11888	LA_2020	Q72R60	OMP	Y	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted		
LIC11935	LA_1968	Q72R17	Secr	Exc	Uncharacterized protein	Putative beta-barrel porin-2, OmpL-like. bbp2	None predicted		Putative beta-barrel porin-2, OmpL-like. bbp2
LIC12399	LA_1326	Q72PR8	Lipo	Y	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted		
LIC12631	LA_1029	Q72P45	Lipo/Secr	Exc	Hemolysin	Sphingomyelinase C/Phospholipase C	Phosphoric diester hydrolase activity	Extracellular region	Phosphatase, sphingomyelinase C/phosphatase C, endonuclease/exonuclease/phosphatase
LIC12966	LA_0616	Q72N71	Lipo	Y	LipL41	None predicted	Protein binding		Tetratricopeptide-like helical domain

LIC13381	LA_4227	Q72M12	BBOMP	N	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted		AttH-like domain, AttH domain
LIC13410	LA_4262	Q72LY3	Lipo	Y	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted		
LIC13418	LA_4272	Q72LX5/Q8EYE4	BBOMP/Secr	Y	Uncharacterized protein	None predicted	None predicted		Alginate export domain
LIC20250	LB_328	Q75FE4	OMP	Exc	Peptidoglycan-associated cytoplasmic membrane protein	None predicted	None predicted	OM, integral component of membrane	OmpA-like domain

Both LIC and LA tags as well as Uniprot identification are shown. Proteins were classified as lipoproteins, beta-barrel outer membrane proteins, or as secreted according to literature data and analysis performed in this study. Proteins have been classified regarding their presence or absence in host-adapted cells: Exc, proteins exclusive to host-adapted cells; Y, proteins present in host-adapted and *in vitro* grown cells; N, proteins not present in host-adapted cells, identified in cells cultivated *in vitro* only. Proteins functions and domains are also described according to InterPro and GO annotation.



Supplementary Figure 1. Validation of CSIP-MS results by Western blot. LICs 11086, 10881 were cloned, expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, and purified. *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 grown *in vitro* (37 °C) and host-adapted leptospires, as well as recombinant proteins and adequate controls, were run on SDS-PAGE (12%), transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with the same human convalescent pooled sera against pathogenic *Leptospira* spp. used to immunoprecipitated proteins. Bands were developed using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). LIC 11086 and 10881 were recognized by the sera on both Western blot and CSIP, corroborating and serving as proof of concept for the CSIP results. Lane 1: rLIC11086 (36.7 kDa); lane 2: rLIC10881 (61.9 kDa); lane 3: Host-adapted *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130; lane 4: *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130 grown *in vitro* (37 °C). There were no reactions with *E. coli* negative control (not shown). Molecular masses are shown based on Prestained Protein Ladder V (Geneaid).

4.4 Manuscrito 3 – Potencial imunoprotetor de novos antígenos vacinais de membrana externa identificados por vacinologia reversa e estrutural e imunoproteômica em leptospiros adaptadas ao hospedeiro

Manuscrito a ser submetido à Revista Vaccine

Potencial imunoprotetor de novos antígenos vacinais de membrana externa
identificados por vacinologia reversa e estrutural e imunoproteômica em leptospiros
adaptadas ao hospedeiro

Autores: Liana Nunes Barbosa^a; Carolina Rodrigues Félix^a; André Alex Grassmann^b;
Gabriana Nathália da Rosa Timm^a; Elias Eduardo Barbosa da Rosa^a; Guilherme Augusto
Rosa^a; Alice Lemos de Ávila^a; Jonhjo McFadden^c e Alan John Alexander McBride^a.

^a Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

^b Department of Medicine, Pediatrics and Molecular Biology and Biophysics, University of
Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut, United States of America

^c School of Biosciences and Medicine, Faculty of Health & Medical Sciences, University
of Surrey, Guildford, Surrey, United Kingdom

*Autor correspondente: alan.mcbride@ufpel.edu.br

Resumo

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial e um problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Vacinas recombinantes têm sido desenvolvidas como uma alternativa promissora para controlar a infecção, entretanto poucos antígenos recombinantes apresentaram proteção suficiente para compor uma vacina universal contra a doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial imunoprotetor de novos antígenos de membrana externa de leptospiros, que foram identificados pela vacinologia reversal e estrutural e imunoprecipitação de superfície celular. As sequências proteicas foram selecionadas no *Genbank* a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar copenhageni cepa Fiocruz L1-130 para a modelagem estrutural das proteínas. As modelagens de estruturas tridimensionais das proteínas selecionadas foram realizadas pelo software I-TASSER, e as predições de epítomos de linfócitos B e linfócitos T foram realizadas nos softwares NetMHCII-2.3 e BepiPred 2.0, respectivamente. As proteínas recombinantes LIC10496, LIC10881, LIC11086 e a químera (LIC10496+LIC10881) foram expressas em *E. coli* e caracterizadas quanto o seu potencial antigênico por *Western blot* e ELISA indireto. Hamsters foram imunizados com duas doses contendo 50 µg de antígeno recombinante adsorvidos em Alhydrogel®, e desafiados com uma dose letal de leptospiros 10 x DL₅₀. Os antígenos recombinantes foram reconhecidos eficientemente por anticorpos presentes nos soros humanos, bovinos e dos hamsters vacinados. Entretanto, nenhum dos antígenos testados foi capaz de induzir proteção significativa dos animais contra a infecção, ou imunidade esterilizante. Em conclusão, os antígenos LIC10496, LIC10881, LIC10496+LIC10881 são imunogênicos e expressos durante a infecção, porém não protegem contra a leptospirose letal aguda no modelo hamster.

Palavras-chave: vacinologia reversa; imunoprecipitação de superfície celular; *Leptospira*; Leptospirose; proteínas de membrana externa; imunogenicidade

Introdução

Considerada a zoonose de maior distribuição mundial, a leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* [1-3]. As estimativas atuais apontam a ocorrência anual de 1 milhão de novos casos que resultam em 59 mil mortes em humanos, principalmente em países tropicais e em desenvolvimento [4]. As leptospirosas patogênicas infectam uma ampla gama de hospedeiros e algumas espécies sobrevivem no ambiente por longos períodos, potencializando a exposição de animais suscetíveis [3]. A transmissão da doença ocorre através do contato desses animais, direta ou indiretamente, com a urina ou tecidos de animais infectados, bem como água, solo, lama e alimentos contaminados com a urina desses animais [3,6,7].

O controle da leptospirose pode ser alcançado pela vacinação de animais suscetíveis, incluindo humanos [12]. As vacinas recombinantes contra a leptospirose têm sido o foco das pesquisas nos últimos 20 anos, uma vez que as vacinas tradicionais de bacterinas possuem diversas limitações que as tornam inadequadas para o uso em humanos [2,3,8-10]. Proteínas localizadas na membrana externa da bactéria (OMPs), em contato direto com o hospedeiro, são os principais alvos estudados quanto a capacidade de gerar proteção contra a doença. As OMPs recombinantes LemA [24,33], LigA [14,16,18,21,25-27,29,32,34,35], LigB [14,20,23,28,31,32,34], LipL21 [30], LipL32 [15,22,30,35], LipL41 [13], Lsa14, LIC13259 e LIC11711 [77] foram administradas sozinhas ou como quimeras em diferentes estratégias vacinais, e induziram de 40 a 100% de resposta imune protetora contra a doença letal aguda em modelos animais para

a leptospirose, conforme revisado em [11,12] [13-35]. No entanto, poucas OMPs recombinantes testadas conferiram proteção cruzada entre diferentes espécies e foram eficientes na indução de imunidade esterilizante [15,23,28,30,31,33,35]. Dessa forma, novos antígenos vacinais de membrana externa necessitam ser identificados.

Diferentes abordagens foram aplicadas para a identificação de OMPs em leptospirosas patogênicas com potencial para utilização em vacinas experimentais contra leptospirose, incluindo RNAseq [38], imunoinformática [45,46,48-50], imunoprecipitação de superfície celular (CSIP) [39,40], vacinologia reversa e estrutural (RV e SV) [42,43,46], análises de bioinformática [36,47], imunologia [37,45,51,52,53] e cultivo de leptospirosas em câmaras de membrana de diálise (DMCs) [38,41,44]. Essas técnicas auxiliam no reconhecimento de novas OMPs com base na estrutura, localização, imunogenicidade e interações com os componentes do hospedeiro [36-53]. Em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa e colaboradores, um conjunto de 166 novos genes diferencialmente expressos foram identificados por RNAseq [38] em leptospirosas adaptadas ao hospedeiro mamífero. Esses alvos são interessantes uma vez que foram identificados a partir da resposta de leptospirosas ao ambiente do hospedeiro, sugerindo que sejam importantes durante a infecção de animais. Por RV e SV, 26 novas OMPs foram identificadas a partir de suas estruturas e localização predita na membrana externa da bactéria [43].

Posteriormente, 164 novos antígenos foram identificados por CSIP com soros humanos positivos para a leptospirose (resultados não publicados, manuscrito 2), sugerindo que esses alvos podem ser expressos durante a infecção em humanos. Em conjunto, esses dados sugerem que os novos antígenos diferencialmente expressos *in vivo*, com potencial imunogênico durante a infecção em humanos e que foram identificados a partir da sua estrutura e localização na superfície celular, possuem o

potencial como candidatos vacinais contra a leptospirose. Com base nesses dados, o objetivo deste artigo foi testar 3 antígenos que foram identificados nos trabalhos anteriores do nosso grupo pelas técnicas de RV, SV e CSIP em leptospiras adaptadas ao hospedeiro. As proteínas LIC10496, LIC10881 e LIC11086, além de uma quimera composta pelas regiões das proteínas LIC10496+LIC10881 que foram preditas como expostas na superfície bacteriana, foram avaliadas quanto ao seu potencial protetor e indução de imunidade esterilizante no modelo hamster de leptospirose letal aguda.

2. Materiais e Métodos

2.1 Aspectos éticos

Os procedimentos envolvendo modelos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sob o número de registro CEEA 59050-2018. O CEEA da UFPel é credenciado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram mantidos no Biotério Central da UFPel de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, em caixas microisoladoras com controle de temperatura e aeração, ciclo escuro-claro de 12 h e abastecimento de água e ração *ad libitum*.

2.2 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Escherichia coli cepas BL21 (DE3) Star ou pLysS foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) sob agitação (180 rpm) ou meio sólido à 37 °C. A seleção das bactérias recombinantes foi realizada em meio LB acrescido 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich A9393, Missouri, USA) e 34 µg/ml de cloranfenicol (Sigma-Aldrich C0378, Missouri, USA). *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar

Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 [54] foi cultivada em meio de cultura líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), suplementado com 10% de suplemento EMJH (BD Difco, Maryland, USA) [55,86], e 1% de 5-Fluoruracil (concentração final de 10 ug/ml, Sigma-Aldrich F6627, Missouri, USA) à 28 °C. Leptospiras foram enumeradas em Câmara de Petroff-Hausser (Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) sob microscopia de campo escuro. Culturas de leptospiras em fase exponencial de crescimento foram utilizadas nos experimentos de infecção letal aguda.

2.3 Modelagem estrutural, identificação de regiões extracelulares e predições de epítomos

As sequências para as proteínas selecionadas foram obtidas a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (Genbank AE016823.1) [56]. As análises de peptídeo sinal foram realizadas nos *software* Signal-CF [57], SignalP-5.0 [58] e PrediSi [59]. As sequências de aminoácidos de cada proteína, sem o peptídeo sinal, foram submetidas ao *software* I-TASSER para as modelagens das estruturas tridimensionais (3D) [60]. A partir das predições estruturais obtidas no I-TASSER, as regiões expostas na superfície bacteriana foram deduzidas pela comparação com as estruturas de proteínas de outros organismos, depositadas no *PROTEIN DATA BANK* (PDB) [61], e a orientação destas proteínas na membrana externa. As imagens foram geradas a partir do *software* UCSF CHIMERA V.1.14. As predições de epítomos de linfócitos T foram realizadas no *software* NetMHCII-2.3 [62], e as análises de epítomos de linfócitos B foram realizadas no *software* BepiPred 2.0 [63].

2.4 Construção dos genes sintéticos, clonagem e expressão dos antígenos recombinantes

Os genes sintéticos contendo as sequências proteicas foram sintetizados (GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, Brasil) e ligados ao vetor de expressão pAE. A sequência completa das proteínas LIC10496, LIC10881 e LIC11086 foram selecionadas para estudo. Além disso, também foi desenhada uma quimera composta apenas por regiões preditas como expostas na superfície bacteriana das proteínas LIC10496 e LIC10881 (LIC10496+LIC10881). Plasmídeos foram inseridos por choque térmico em células competentes de *E. coli* cepas BL21 (DE3) Star ou pLysS. As bactérias transformadas foram cultivadas por 16 h em meio LB acrescido dos antibióticos seletivos, à 37 °C sob agitação (180 rpm). A expressão dos antígenos foi induzida com isopropil- β -D-thiogalactopiranoside (IPTG) (concentração final 1 mM, Sigma-Aldrich I6758, Missouri, USA) por 3-4 h. As purificações foram realizadas por cromatografia de afinidade ao níquel em sistema ÄKTA Start (GE, Texas, USA). As proteínas recombinantes foram solubilizadas em Ureia 8 M (Sigma-Aldrich U5378, Missouri, USA) e posteriormente dialisadas em tampão fosfato-salino (PBS) à 4 °C. As quantificações proteicas foram realizadas por kit de BCA (Pierce™, Thermo Scientific 23227, Illinois, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente estocadas a -20 °C.

2.5 Imunogenicidade das proteínas nativas e recombinantes

Western blots foram realizados para a caracterização das proteínas recombinantes. Extratos bacterianos de *E. coli* e *L. interrogans*, bem como LigBrep recombinante foram utilizados como controles. Membranas de nitrocelulose 0.45 μ m (Bio-Rad 1620115, California, USA) foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente, ou por 16 h à 4 °C, com solução bloqueadora (Superblock™, Thermo Scientific 37515, Illinois, USA) ou PBS acrescido de 0.05% de Tween® 20 (Sigma-Aldrich P1379, Missouri, USA) e 0.5% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Suíça) (PBS-T + 0.5%

de leite em pó). Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h com soro positivos para leptospirose, de bovinos diluídos 1:400 (Embrapa Clima Temperado, Rio grande do sul, Brasil), humanos diluídos 1:400 (LACEN, Rio de Janeiro e Rio grande do sul, Brasil) e dos animais vacinados diluídos 1:400. Por fim, as membranas foram incubadas por 1 h com anti-histidina diluído 1:5000 (Sigma-Aldrich A7058, Missouri, USA), anti-bovinos diluído 1:2000 (Sigma-Aldrich A5205, Missouri, USA), anti-humanos diluído 1:4000 (Invitrogen 31410, Illinois, USA) e anti-hamsters diluídos 1:5000 (Rockland Immunochemicals 6071302, Pennsylvania, USA), todos conjugados a peroxidase. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS-T + 0.5% de leite em pó. As reações foram reveladas com uso de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich D12384, Missouri, USA) ou pelo substrato ECL Western blotting substrate (Pierce®, Thermo Scientific 32109, Illinois, USA) no C-DiGit® *Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA).

2.6 Dose letal para 50% dos animais infectados

A dose letal em 50% dos animais (DL₅₀) para leptospiros patogênicas da espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi calculada conforme previamente descrito [64]. Hamsters Sírios da espécie *Mesocricetus auratus* (3 animais por grupo, machos e fêmeas, 8 semanas de idade) foram infectados via intraperitoneal com as densidades de 10⁰ a 10³ leptospiros em 1 ml de meio EMJH. Os animais foram avaliados diariamente por 28 dias e posteriormente eutanasiados por asfixia com CO₂ no final do experimento ou mediante a apresentação de sinais de leptospirose, que foram baseados na avaliação de *score* clínico (≥10% de perda de peso, prostração, comportamento alterado, aparência e falta de resposta a estímulos).

2.7 Imunização dos animais e desafio

As formulações vacinais contendo as proteínas recombinantes ou PBS (controle negativo) foram adsorvidas em adjuvante de hidróxido de alumínio 2% (Alhydrogel®, Invivogen vac-alu-250, França) por 16 h a 4 °C sob leve agitação. Hamsters (machos ou fêmeas) de 4-9 semanas de idade (9/10 animais por grupo, peso máximo de 150 g na primeira dose) foram imunizados via intramuscular nos dias 0 e 14 com 50 µg de antígeno em 150 µl por dose. O sangue dos animais foi coletado nos dias 0, 14 e 28 para determinação dos títulos de anticorpos. Os animais foram desafiados com uma dose letal de 10 x a DL₅₀ no dia 28. Os animais foram avaliados por 28 dias pós-desafio e eutanasiados no fim do experimento ou mediante a apresentação de sinais clínicos de leptospirose. Foram coletados sangue, baço, fígado, pulmões e rins de todos os animais para reisolamento bacteriano em meio EMJH (Fig. 1). A eficácia vacinal foi calculada comparando o número de animais sobreviventes nos grupos vacinados, com o número de animais sobreviventes nos grupos controles.

2.8 Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral dos animais imunizados com as proteínas recombinantes e o controle negativo foi determinada por ELISA indireto. Placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (NUNC™, Thermo Scientific 278605, Illinois, USA) foram sensibilizadas com 50-200 ng de antígeno por poço diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6, e incubadas 16 h à 4 °C. Para a etapa de bloqueio, 200 µl de PBS-T + 0.5% de leite em pó foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por 1 h à 37 °C. Em seguida, 100 µl de cada soro nas diluições de 1:50 a 1:400 em PBS-T + 0.5% de leite em pó foram adicionados aos poços em triplicatas, e as placas incubadas por 1 h à 37 °C. Posteriormente, 50 µl de anticorpo secundário anti-IgG de

hamsters conjugado a peroxidase, diluído 1:5000 em PBS-T + 0.5% de leite em pó foi adicionado aos poços, e as placas incubadas por mais 1 h à 37 °C. As placas foram lavadas com PBS-T 3 x entre todas as incubações. As reações anticorpo-antígeno foram reveladas pela adição de 100 µl por poço de solução de revelação, contendo o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich P9029, Missouri, USA), peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich H3410, Missouri, USA) e tampão citrato-fosfato pH 4.0. As reações foram paradas com a adição de 25 µl de Ácido sulfúrico 2 M por poço (Sigma-Aldrich 258105, Missouri, USA) e as leituras das placas foram realizadas no comprimento de onda de 492 nm.

2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 7.0. A proteção contra a leptospirose letal foi avaliada pelo teste exato de Fisher (*two-tailed*). Os níveis de anticorpos foram analisados por análise de variância (*one-way ANOVA - Turkey's multiple comparisons*). Um valor de $p \leq 0.05$ foi considerado significativo em todas as análises.

3. Resultados

3.1 Modelagem estrutural, expressão heteróloga em *E. coli* e potencial imunogênico dos antígenos recombinantes

As estruturas 3D das proteínas LIC10496, LIC10881 e LIC11086 foram modeladas pelo método de *threading* no software I-TASSER, com base em padrões estruturais similares à proteínas presentes em outros organismos (Fig. 2). O C-score é uma medida que estima a qualidade dos modelos preditos no I-TASSER, com scores

tipicamente encontrados na faixa de -5 a 2, e os valores mais altos representam maior confiabilidade dos modelos preditos [60]. As predições estruturais no I-TASSER das estruturas 3D foram -0.42, -1.96 e -1.56 para as proteínas LIC10496, LIC10881 e LIC11086, respectivamente. Esses resultados indicam que os modelos 3D preditos apresentam qualidade adequada. A estrutura 3D depositada no PDB com a maior similaridade à proteína LIC10496 foi a proteína TolC de *E. coli* K-12, conforme a entrada depositada no PDB 1ek9, que a caracteriza como uma proteína integral de membrana externa e componente de bomba de efluxo. A entrada 1ek9 foi utilizada como modelo para a seleção das regiões da proteína LIC10496 expostas na superfície bacteriana. Apesar de originalmente anotada como proteína hipotética sem função caracterizada, a proteína LIC10496 possui funções sugeridas como possível relação com íons de cobre, sideróforos ou proteínas de transporte, e seus ortólogos foram anotados como proteína do tipo TolC em outras espécies de *Leptospira* [43]. Dessa forma, os resultados da modelagem 3D de LIC10496 encontrados confirmam a sua relação com proteínas do tipo TolC. A modelagem 3D da proteína LIC10881 apresentou similaridades com a proteína A de ligação a transferrina (TbpA) de *N. meningitidis*, depositada no PDB através da entrada 3v89. TbpA é um receptor TonB dependente (TBDR) responsável pelo transporte e captação de nutrientes [43], apresentando uma porção significativa de sua estrutura exposta à superfície bacteriana. O modelo gerado para LIC11086 apresenta similaridades estruturais com a entrada a proteína barril- β transportadora de ácidos graxos (FadL) de *E. coli* (PDB: 3PGS). A proteína LIC11086 é uma proteína hipotética conservada não caracterizada, entretanto o Interproscan a sugere como uma proteína putativa envolvida na via Met-A de degradação do fenol. A estrutura da proteína LIC11086 contém um barril com 12 fitas com um segmento N-terminal precedendo a primeira fita β que bloqueia o barril. Proteínas com estas características normalmente

transportam moléculas hidrofóbicas através da membrana [73]. Com exceção da proteína LIC11086, as proteínas LIC10496 e LIC10881 apresentaram estruturas 3D em concordância com os resultados obtidos anteriormente [43] (Fig 2, Material suplementar Fig. S1).

As sequências de aminoácidos selecionadas para cada proteína e os epítomos de linfócitos B e T preditos estão apresentados na tabela 1. As proteínas recombinantes LIC10496, LIC10881, LIC10496+LIC10881 e LIC11086 foram expressas em *E. coli* na sua forma insolúvel, apresentando as massas moleculares esperadas de aproximadamente 56 kDa, 62 kDa, 30 KDa e 37 kDa, respectivamente (Tabela 1, e Fig. S2). As quantificações das proteínas por kit de BCA demonstraram um rendimento satisfatório, com as concentrações obtidas de 0,53 mg/ml (LIC10496), 1,18 mg/ml (LIC10881), 0,38 mg/ml (LIC10496+LIC10881) e 0,45 mg/ml (LIC11086).

3.2 Resposta imune humoral e imunidade protetora induzida nos animais imunizados

As proteínas recombinantes foram imunogênicas e estimularam a produção significativa de anticorpos IgG específicos ($P < 0.0001$) após a vacinação dos animais. Os animais que receberam a segunda dose das vacinas recombinantes apresentaram títulos de anticorpos superiores quando comparados às amostras coletadas previamente a imunização (Dia 0), e nos grupos controle negativo imunizados com PBS nos dias 0 e 28 (Fig. 5). Além disso, os *western blots* com soros humanos convalescentes, soros bovinos positivos para a doença, e de animais imunizados com as vacinas recombinantes confirmaram o potencial imunogênico dos alvos selecionados. Entretanto, a proteína LIC10496 não foi reconhecida pelos anticorpos presentes nos soros bovinos, e as proteínas LIC10881 e LIC10496+LIC10881 foram reconhecidas fracamente pelos

anticorpos presentes nos soros humanos. Os anticorpos dos animais vacinados reconheceram todas as proteínas recombinantes, porém somente soros gerados contra a proteína LIC10881 e a químera LIC10496+LIC10881 reconheceram proteínas nativas nos extratos de leptospiros, com tamanho esperado para LIC10496 e LIC10881 (Fig. 3). Em conjunto, esses resultados demonstram o potencial imunogênico das proteínas recombinantes avaliadas nesse estudo.

A DL_{50} da cepa de desafio Fiocruz L1-130 foi avaliada previamente aos experimentos vacinais a fim de confirmar a virulência bacteriana. Grupos de 3 animais foram desafiados com doses de 10^0 a 10^3 leptospiros. Após a infecção, um animal sobreviveu nos grupos infectados com 1 e 1000 leptospiros (Fig. 4). A DL_{50} para o desfecho letal no modelo hamster de leptospirose letal aguda foi de 5 leptospiros, indicando que a cepa Fiocruz L1-130 era altamente virulenta. Nenhum animal vacinado com a proteína LIC10496 sobreviveu ao desafio letal [0/10, 0% de proteção, ($p = 0.2105$)], enquanto que 1 animal sobreviveu no grupo da proteína LIC10881 [1/10, 10% de proteção, ($p = 0.5820$)] e 2 animais sobreviveram do grupo vacinado com a proteína LIC11086 [2/10, 20% de proteção, ($p = 1.000$)]. No grupo controle negativo injetado com PBS, 2 animais (2/9) sobreviveram ao desafio letal. O experimento 2 foi realizado com a químera contendo as porções das proteínas LIC10496 e LIC10881 (LIC10496+LIC10881) preditas como expostas na superfície da bactéria. Nenhum animal no grupo vacinado sobreviveu ao desafio letal [0/9, 0% de proteção, ($p = 1.000$)], enquanto que no grupo controle negativo injetado com PBS, 1 animal (1/9) sobreviveu (Fig. 6 e tabela 2). Quando comparadas aos controles negativos (PBS), as proteínas recombinantes não foram capazes de gerar uma proteção significativa contra a infecção letal aguda no modelo hamster. Todos os animais que desenvolveram leptospirose tiveram perda de peso superior a 10% do peso corporal, sinais característicos da

infecção, e a colonização renal por leptospiros foi observada nas amostras de rins que foram coletadas, demonstrando a ausência de imunidade esterilizante.

4. Discussão

A membrana externa das leptospiros é uma importante estrutura celular em *L. interrogans*, e apresenta LPS, diferentes lipoproteínas e proteínas transmembrana barril- β que desempenham funções essenciais e que podem estar relacionadas a virulência bacteriana [43, 65]. Proteínas transmembrana e algumas lipoproteínas estão presentes na membrana externa, permitindo a exposição dessas proteínas ao ambiente externo, com provável interação com a resposta imune do hospedeiro. Ferramentas como a RV, SV, CSIP e análises de imunoinformática têm auxiliado na seleção de antígenos bacterianos de forma rápida e racional [36, 43, 46]. Diversos estudos apresentam que os anticorpos produzidos após as imunizações com vacinas de bacterinas vivas atenuadas são capazes de reconhecer antígenos presentes em diferentes cepas de leptospiros [37, 51-53]. A técnica de CSIP foi aplicada na identificação de novos antígenos expostos na superfície de *N. meningitidis*, a partir da imunoprecipitação de células meningocócicas intactas incubadas com anticorpos presentes em soros imunes. Este método foi bem sucedido na seleção de antígenos protetores, incluindo os atuais componentes da vacina para meningite [39,40]. A técnica de CSIP foi aplicada para *L. interrogans* pelo nosso grupo e identificou 164 novos antígenos alvo de *Leptospira* [resultados não publicados, manuscrito 2]. As OMPs LIC10496, LIC10881 e LIC11086 foram identificadas previamente pelas técnicas de RV, SV e CSIP como proteínas expostas a superfície celular e expressas durante a infecção no hospedeiro [43, dados não publicados, manuscrito 2].

As análises de modelagem estrutural 3D realizadas sugeriram que em *L. interrogans* LIC10496, LIC10881 e LIC11086 sejam ortologas de bomba efluxo do tipo TolC, transportadores dependentes de TonB e proteína FadL transportadora de ácidos graxos, respectivamente. Proteínas do tipo TolC e seus homólogos são importantes para o fluxo de componentes entre a célula e o ambiente extracelular, transportando diversas proteínas de secreção do tipo I, incluindo enzimas, toxinas, detergentes, solventes, metais pesados e antibióticos [66]. Isso sugere que proteínas da família TolC são fatores importantes para a patogenicidade e virulência bacteriana. A proteína LIC10881 foi caracterizada como um receptor dependente de TonB (TBDR), importantes para a captação e transporte de nutrientes necessários para o metabolismo bacteriano. Proteínas TBDRs, como a LIC10881, são proteínas barril- β que compreendem 22 fitas que se estende na membrana externa, com grandes alças extracelulares e um domínio de *plug* globular na região N-terminal, dobrado para dentro do barril. Uma porção significativa de sua estrutura foi predita como exposta à superfície bacteriana, o que pode fornecer uma via de sinalização entre o reconhecimento dos componentes ligados e o transporte mediado por TonB [43, 67, 68, 69]. Receptores TonB dependentes, como a LIC10881, são essenciais no transporte ativo de sideróforos, vitamina B12, além de ferro no ambiente do hospedeiro. O ferro é um componente essencial para a viabilidade bacteriana, e a capacidade de adquirir ferro no ambiente do hospedeiro é indispensável para a virulência [69,70]. Além disso, LIC10881 foi identificada pela CSIP em leptospiros adaptadas *in vivo* em estudos desenvolvidos pelo nosso grupo [dados não publicados, manuscrito 2]. Esse resultado sugere que a LIC10881 é expressa *in vivo* e possui potencial antigênico, uma vez que é constantemente reconhecida pelos anticorpos presentes em soros humanos convalescentes. A proteína LIC11086 é anotada como proteína conservada hipotética não caracterizada, entretanto resultados prévios da

predição dessa proteína sugerem que é uma provável proteína envolvida na via Met-A de degradação do fenol, além do possível envolvimento no transporte de moléculas hidrofóbicas através da membrana [43]. Em concordância com esses achados, a modelagem da estrutura 3D de LIC11086 predita no I-TASSER obteve similaridades estruturais com a entrada 3PGS do PDB, classificada como uma proteína barril- β transportadora de ácidos graxos (FadL) de *E. coli*. Essa proteína desempenha um papel central na captação de ácidos graxos exógenos, e permite a entrada desses compostos através da membrana externa, por meio de um canal específico para a captação de ácidos graxos, que contém uma abundância de aminoácidos hidrofóbicos [71]. Proteínas com estruturas similares a LIC11086 foram caracterizadas e tradicionalmente apresentam um barril com 12 fitas com um segmento N-terminal precedendo a primeira fita β que bloqueia o barril. Epítomos de linfócitos B e T foram preditos a partir das sequências proteicas de cada proteína. Como observado na tabela 1, as sequências proteicas utilizadas no *design* dos plasmídeos recombinantes possuem epítomos para linfócitos B e T, o que sugere suas capacidades de estimular as respostas imunes humoral e celular. Em conjunto, esses resultados corroboram com as estruturas preditas para essas proteínas identificadas pela RV e SV previamente [43], e confirmam o potencial que esses antígenos possuem para compor uma vacina recombinante.

Diferentes antígenos e estratégias vacinais já foram testados e induziram uma resposta protetora contra a leptospirose de 40-100% dos animais imunizados [12, 42]. Os principais antígenos testados em ensaios pré-clínicos são as proteínas Ligs (LigA e LigB) que apresentam diferentes níveis de proteção. A proteína LigA, em especial a região LigANI, foi avaliada repetidamente e confere proteção significativa contra a infecção, demonstrando o seu potencial como antígeno vacinal [27, 29, 32-35, 72, 73]. Entretanto, a proteína LigA não é conservada entre todas as espécies patogênicas de

leptospiras, diferentemente da proteína LigB. O seu fragmento LigBrep foi estudado como um alvo vacinal e apresentou resultados promissores, com indução de proteção e imunidade esterilizante, entretanto, esses resultados não são consistentes e falham em sua reprodutibilidade por diferentes grupos de pesquisa [30, 35, 38, 39]. Diversos outros antígenos de recombinantes como Erp Y-like, LcpA, LcpA+LenA, LemA, LenA, LipL21+LipL32+OmpL1, LipL32+LemA+LigANI, Lsa46, Lsa46+Lsa77, Lsa77, Lsa14, LIC13259 e LIC11711 foram testados e apresentaram resultados interessantes para a proteção dos animais desafiados [29,30,33,35,73,75,77]. Entretanto, o uso de novas estratégias na seleção e construção de antígenos é necessária, uma vez que os alvos testados até o momento apresentam resultados inconsistentes entre diferentes grupos de pesquisas na área.

A construção de genes quiméricos, compostos por porções específicas de uma ou mais proteínas, têm recebido bastante atenção nos últimos anos e pode ser uma abordagem interessante para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leptospirose. Oliveira (2018) [33] e Dornelles (2020) [78] desenvolveram vacinas contra a leptospirose utilizando como vetor vivo a cepa BCG recombinante expressando quimeras contendo as proteínas LipL32, LigANI e LemA. Esses estudos demonstraram uma proteção de 80-100% e redução da colonização renal. Apesar de estimularem a indução de anticorpos, estes níveis não foram significativos e não se correlacionaram a proteção. Uma quimera composta por fragmentos de LigA e LigB conferiu 100% de proteção contra a infecção letal nos animais imunizados e significantes níveis de anticorpos [34]. De forma semelhante, um antígeno quimérico de LigA, Mce, Lsa45, OmpL1 e LipL41 foi reconhecido eficientemente por amostras de soro positivas de humanos e os soros de hamsters experimentalmente infectados, entretanto, somente 50% dos hamsters sobreviveram ao desafio letal [73]. Outro estudo avaliando os

epítomos imunodominantes de linfócitos B e T das OMPs OmpL1, LipL32 e LipL21 demonstrou ser uma estratégia interessante na proteção de cobaias da infecção letal, indução de títulos de anticorpos significativos, redução do dano tecidual, e a colonização e excreção de leptospiros através da urina [30]. Cinco proteínas barril β conservadas entre espécies patogênicas foram identificadas por VR, SV e CSIP, e arquitetadas em quimeras contendo as regiões expostas a superfície celular e imunodominantes de linfócitos B e T foram testados recentemente [43, 79]. As OMPs barril β LIC11570, LIC12524, LIC13229, LIC13417 e LIC20214 protegeram 100% dos animais imunizados em 2 experimentos independentes, induziram a produção de anticorpos IgG, e a imunidade esterilizante em 85-100% dos animais infectados [79]. Em conjuntos, esses resultados sugerem que construções recombinantes quiméricas são uma abordagem interessante para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose.

Os antígenos recombinantes avaliados neste trabalho foram expressos em *E. coli* e reconhecidos de forma geral pelos soros positivos de bovinos, humanos e hamsters imunizados com os antígenos recombinantes. Esses resultados sugerem que as OMPs recombinantes são imunogênicas, e que são expressas durante a infecção em animais suscetíveis. Nos experimentos *in vivo* foram avaliadas as proteínas inteiras, ou arrançadas em uma quimera contendo as regiões expostas a superfície e imunodominantes de LIC10496 e LIC10881. Nenhum dos antígenos testados conferiu proteção significativa aos animais imunizados, sugerindo que os anticorpos induzidos pelos antígenos recombinantes não foram capazes de proteger os animais contra a infecção letal, levando a ausência de correlato de imunidade. A relação entre a resposta imune humoral e a capacidade de sobrevivência prediz que a resposta humoral, por si só, não é suficiente para eliminar as leptospiros dos hospedeiros [76]. Esses resultados sugerem que mesmo com uma seleção racional de alvos vacinais, baseada na função e

estrutura das proteínas, e nas interações com anticorpos presentes em soros de pacientes infectados, os antígenos recombinantes testados não foram protetores a partir das composições vacinais testadas neste estudo. Alvos selecionados com base em funções essenciais a patogênese bacteriana mas que não conferem proteção homóloga, heteróloga e imunidade esterilizante, somados as ausências de repetitividade e reprodutibilidade entre diferentes grupos de pesquisa, evidencia a razão das pesquisas com vacinas recombinantes não evoluem aos ensaios clínicos.

Apesar dos avanços para seleção e *design de* alvos, ainda enfrentamos alguns problemas no campo da vacinologia para a leptospirose [12]. Um importante aspecto no desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose é o modelo hamster. Apesar do modelo hamster ser classicamente utilizado para avaliar vacinas contra a leptospirose, devido a sua suscetibilidade à infecção e a reprodutibilidade dos resultados, ele não é um modelo animal completo para a leptospirose aguda. Limitações relacionadas aos aspectos da resposta imune, bem como reagentes e ferramentas genéticas bem definidas, são ainda barreiras importantes no avanço das pesquisas com esse modelo [9, 80-84]. Além disso, hamsters são extremamente suscetíveis à leptospirose e dessa forma, não são bons modelos para colonização crônica e infecção subletal. Além disso, a maioria dos hospedeiros naturais de leptospiros desenvolvem a infecção crônica com colonização renal, eliminação das bactérias na urina e nenhum sinal importante da doença [81, 85]. Para prevenir a transmissão entre animais hospedeiros, a vacina deve induzir imunidade esterilizante. No entanto, este objetivo no desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose ainda é um grande desafio. O meio de cultura utilizado para cultivar leptospiros não é sensível para o crescimento de pequenos inóculos, impossibilitando a expansão *in vitro* das leptospiros a partir dos tecidos dos hospedeiros, levando a resultados errôneos relacionados à imunidade esterilizante. Por fim, inúmeros obstáculos

ainda necessitam de atenção no campo da leptospirose e poderiam melhorar as pesquisas com desenvolvimento de vacinas contra a doença. Em conclusão, os antígenos testados nesse trabalho, identificados por abordagens de RV, SV e CSIP, foram preditos como proteínas de membrana externa envolvidas no transporte e captação de diversos componentes extracelulares importantes para a patogênese bacteriana. Em adição, as OMPs recombinantes foram reconhecidas efetivamente por anticorpos presentes nos soros de bovinos e humanos positivos para a infecção, e induzir uma resposta imune humoral nos hamsters imunizados, sugerindo que são expressas durante a infecção *in vivo* e imunogênicas. Entretanto, nenhum dos antígenos testados foi capaz de proteger os animais imunizados da leptospirose letal. Outros estudos são necessários para entender os mecanismos de proteção a infecção nos hospedeiros.

Contribuições de autores

L.N.B.; C.R.F. e A.J.A.M. delinearam os experimentos. L.N.B.; C.R.F.; G.N.R.T.; E.E.B.R.; G.A.R. e A.L.A. executaram os experimentos. L.N.B.; E.E.B.R. e A.J.A.M. analisaram os dados. L.N.B. e A.J.A.M. escreveram o manuscrito. J.M. e A.J.A.M. supervisionaram o estudo. Todos os autores irão revisar o manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Biotério Central da UFPel pela disponibilidade dos animais para esse estudo, e todo o suporte técnico para a execução dos experimentos *in vivo*.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil – (CAPES) - Código de Financiamento 001; Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil) e Royal Society (Reino Unido) – Número de *Grant* IC170171.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- [1] Picardeau, M., Bertherat, E., Jacloes, M., Skouloudis, A. N., Durski, K. & Hartskeerl, R. A. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 78 (1). p. 1-8
- [2] Adler, B., & de la Pena Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 287-296. doi:S0378-1135(09)00116-3 [pii]10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- [3] Adler, B. (2015). *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 387p
- [4] Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., . . . Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(9), e0003898. doi:10.1371/journal.pntd.0003898
- [5] Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., . . . Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3(12), 757-771.
- [6] Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14(2), 296-326.
- [7] Organization, W. H. (2011). Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. p.37
- [8] Haake, D. A. and P. N. Levett (2015). "Leptospirosis in humans." *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 65-97.
- [9] Zuerner, R. L. (2015). Host response to leptospira infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 387. p. 223-250
- [10] McBride, A. J., Athanazio, D. A., Reis, M. G. & Ko, A. I. (2005). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 18 (5). p. 376-386
- [11] DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANN, A. A., HARTWIG, D. D., FELIX, S. R., DA SILVA, E. F. & MCBRIDE, A. J. (2011). Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin*. 7. p. 1215-1224.

- [12] Felix, C. R., Siedler, B. S., Barbosa, L. N., Timm, G. R., McFadden, J., & McBride, A. J. A. (2020). An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. *Expert Opin Drug Discov*, 15(2), 179-188. doi:10.1080/17460441.2020.1694508
- [13] Haake, D. A., Mazel, M. K., McCoy, A. M., Milward, F., Chao, G., Matsunaga, J., & Wagar, E. A. (1999). Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*, 67(12), 6572-6582.
- [14] Koizumi, N., & Watanabe, H. (2004). Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*, 22(11-12), 1545-1552.
- [15] Seixas, F. K., da Silva, E. F., Hartwig, D. D., Cerqueira, G. M., Amaral, M., Fagundes, M. Q., . . . Dellagostin, O. A. (2007). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of Leptospira interrogans protects hamsters from challenge. *Vaccine*, 26(1), 88-95. doi:S0264-410X(07)01221-2 [pii]10.1016/j.vaccine.2007.10.052
- [16] Silva, E. F., Medeiros, M. A., McBride, A. J., Matsunaga, J., Esteves, G. S., Ramos, J. G., . . . Ko, A. I. (2007). The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, 25(33), 6277-6286. doi:10.1016/j.vaccine.2007.05.053
- [17] Faisal, S. M., Yan, W., McDonough, S. P., Chang, C. F., Pan, M. J., & Chang, Y. F. (2009). Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model. *Vaccine*, 27(47), 6537-6545. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.051
- [18] Faisal, S. M., Yan, W., McDonough, S. P., & Chang, Y. F. (2009). Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine*, 27(3), 378-387. doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.089
- [19] Faisal, S. M., Yan, W., McDonough, S. P., Mohammed, H. O., Divers, T. J., & Chang, Y. F. (2009). Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, 27(44), 6129-6136. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.029
- [20] Yan, W., Faisal, S. M., McDonough, S. P., Divers, T. J., Barr, S. C., Chang, C. F., . . . Chang, Y. F. (2009). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant Leptospira immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect*, 11(2), 230-237. doi:S1286-4579(08)00335-3 [pii]10.1016/j.micinf.2008.11.008
- [21] Coutinho, M. L., Choy, H. A., Kelley, M. M., Matsunaga, J., Babbitt, J. T., Lewis, M. S., . . . Haake, D. A. (2011). A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by Leptospira interrogans. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(12), e1422. doi:10.1371/journal.pntd.0001422PNTD-D-11-00830 [pii]
- [22] Grassmann, A. A., Felix, S. R., dos Santos, C. X., Amaral, M. G., Seixas Neto, A. C., Fagundes, M. Q.,... Dellagostin, O. A. (2012). Protection against lethal leptospirosis

after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol*, 19(5), 740-745. doi:10.1128/CVI.05720-11

[23] Forster, K. M., Hartwig, D. D., Seixas, F. K., Bacelo, K. L., Amaral, M., Hartleben, C. P., & Dellagostin, O. A. (2013). A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*, 20(5), 725-731. doi:10.1128/CVI.00601-12

[24] Hartwig, D. D., Forster, K. M., Oliveira, T. L., Amaral, M., McBride, A. J., & Dellagostin, O. A. (2013). A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*, 20(5), 747-752. doi:10.1128/CVI.00034-13

[25] Bacelo, K. L., Hartwig, D. D., Seixas, F. K., Schuch, R., Moreira Ada, S., Amaral, M., . . . Dellagostin, O. A. (2014). Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. *Biomed Res Int*, 2014, 636491. doi:10.1155/2014/636491

[26] Hartwig, D. D., Bacelo, K. L., Oliveira, P. D., Oliveira, T. L., Seixas, F. K., Amaral, M. G., . . . Dellagostin, O. A. (2014). Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. *Curr Microbiol*, 68(4), 524-530. doi:10.1007/s00284-013-0505-4

[27] Lourdault, K., Wang, L. C., Vieira, A., Matsunaga, J., Melo, R., Lewis, M. S., . . . Gomes-Solecki, M. (2014). Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun*, 82(2), 893-902. doi:10.1128/IAI.01533-13

[28] Forster, K. M., Hartwig, D. D., Oliveira, T. L., Bacelo, K. L., Schuch, R., Amaral, M. G., & Dellagostin, O. A. (2015). DNA prime-protein boost based vaccination with a conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins enhances protection against leptospirosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(8), 989-995. doi:10.1590/0074-02760150222

[29] Monaris, D., Sbrogio-Almeida, M. E., Dib, C. C., Canhamero, T. A., Souza, G. O., Vasconcellos, S. A., . . . Abreu, P. A. (2015). Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant *Leptospira interrogans* Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*, 22(8), 965-973. doi:10.1128/CVI.00285-15

[30] Lin, X., Xiao, G., Luo, D., Kong, L., Chen, X., Sun, D., & Yan, J. (2016). Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiol*, 16(1), 241. doi:10.1186/s12866-016-0852-y

[31] Conrad, N. L., Cruz McBride, F. W., Souza, J. D., Silveira, M. M., Felix, S., Mendonca, K. S., . . . McBride, A. J. (2017). LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(3), e0005441. doi:10.1371/journal.pntd.0005441

- [32] Evangelista, K. V., Lourdault, K., Matsunaga, J., & Haake, D. A. (2017). Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLoS One*, 12(7), e0180004. doi:10.1371/journal.pone.0180004
- [33] Oliveira, T. L., Schuch, R. A., Inda, G. R., Roloff, B. C., Neto, A., Amaral, M., . . . Hartwig, D. D. (2018). LemA and Erp Y-like recombinant proteins from *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge using AddaVax as adjuvant. *Vaccine*, 36(19), 2574-2580. doi:10.1016/j.vaccine.2018.03.078
- [34] da Cunha, C. E. P., Bettin, E. B., Bakry, A., Seixas Neto, A. C. P., Amaral, M. G., & Dellagostin, O. A. (2019). Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera. *Vaccine*, 37(13), 1844-1852. doi:10.1016/j.vaccine.2019.02.010
- [35] Oliveira, T. L., Rizzi, C., da Cunha, C. E. P., Dorneles, J., Seixas Neto, A. C. P., Amaral, M. G., . . . Dellagostin, O. A. (2019). Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. *Vaccine*, 37(6), 776-782. doi:10.1016/j.vaccine.2018.12.050
- [36] Pinne, M. and D. A. Haake (2009). "A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*." *PLoS One* 4(6): e6071.
- [37] Srikram, A., Zhang, K., Bartpho, T., Lo, M., Hoke, D.E., Sermswan, R.W., Adler, B. & Murray, G.L. (2011). Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. *Journal of Infectious Diseases*. 203(6). p. 870–879.
- [38] Caimano, M. J., Sivasankaran, S. K., Allard, A., Hurley, D., Hokamp, K., Grassmann, A. A., . . . Nally, J. E. (2014). A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *PLoS Pathog*, 10(3), e1004004. doi:10.1371/journal.ppat.1004004
- [39] Newcombe, J., Mendum, T. A., Ren, C. P., & McFadden, J. (2014). Identification of the immunoproteome of the meningococcus by cell surface immunoprecipitation and MS. *Microbiology*, 160(Pt 2), 429-438. doi:10.1099/mic.0.071829-0
- [40] Cunha, C. E., J. Newcombe, O. A. Dellagostin and J. McFadden (2017). "Immunoprecipitation of cell surface proteins from Gram-negative bacteria." *Bio-Protocol* 7(9).
- [41] Grassmann, A. A., McBride, A. J., Nally, J. E., & Caimano, M. J. (2015). Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira interrogans* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. *Bio Protoc*, 5(14), e1536.
- [42] 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).

- [43] Grassmann, A. A., Kremer, F. S., Dos Santos, J. C., Souza, J. D., Pinto, L. D. S., & McBride, A. J. A. (2017). Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front Immunol*, 8, 463. doi:10.3389/fimmu.2017.00463
- [44] Nally, J. E., A. A. Grassmann, S. Planchon, K. Sergeant, J. Renaut, J. Seshu, A. J. McBride and M. J. Caimano (2017). "Pathogenic Leptospire Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 362.
- [45] Lessa-Aquino, C., J. C. Lindow, A. Randall, E. Wunder, J. Pablo, R. Nakajima, A. Jasinskas, J. S. Cruz, A. O. Damiao, N. Nery, G. S. Ribeiro, F. Costa, J. E. Hagan, M. G. Reis, A. I. Ko, M. A. Medeiros and P. L. Felgner (2017). "Distinct antibody responses of patients with mild and severe leptospirosis determined by whole proteome microarray analysis." *PLoS Negl Trop Dis* 11(1): e0005349.
- [46] Zeng, L., D. Wang, N. Hu, Q. Zhu, K. Chen, K. Dong, Y. Zhang, Y. Yao, X. Guo, Y. F. Chang and Y. Zhu (2017). "A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis." *Front Microbiol* 8: 396.
- [47] Dhandapani, G., T. Sikha, A. Rana, R. Brahma, Y. Akhter and M. Gopalakrishnan Madanan (2018). "Comparative proteome analysis reveals pathogen specific outer membrane proteins of *Leptospira*." *Proteins*.
- [48] Lata, K. S., S. Kumar, V. Vaghasia, P. Sharma, S. B. Bhairappanvar, S. Soni and J. Das (2018). "Exploring Leptospiral proteomes to identify potential candidates for vaccine design against Leptospirosis using an immunoinformatics approach." *Sci Rep* 8(1): 6935.
- [49] Validi, M., A. Karkhah, V. K. Prajapati and H. R. Nouri (2018). "Immuno-informatics based approaches to design a novel multi epitope-based vaccine for immune response reinforcement against Leptospirosis." *Mol Immunol* 104: 128-138.
- [50] Nazifi N, Mousavi S M, Moradi S, Jaydari A, Jahandar M H, et al. (2018). In Silico B Cell and T Cell Epitopes Evaluation of lipL32 and OmpL1 Proteins for Designing a Recombinant Multi-Epitope Vaccine Against Leptospirosis. *Int J Infect.* 5(2):e63255. doi: 10.5812/iji.63255.
- [51] Lauretti-Ferreira, F., P. L. D. Silva, N. M. Alcantara, B. F. Silva, I. Grabher, G. O. Souza, E. Nakajima, M. A. Akamatsu, S. A. Vasconcellos, P. A. E. Abreu, E. Carvalho, E. A. L. Martins, P. L. Ho and J. B. da Silva (2020). "New strategies for *Leptospira* vaccine development based on LPS removal." *PLoS One* 15(3): e0230460.
- [52] Theerapat Phoka, Teerasit Techawiwattanaboon, Noppadon Sangjun, Pat Komane, Gerald L. Murray, Rasana Wongratanacheewin Sermswan, Ben Adler, Kanitha Patarakul. (2021). Identification of *in vivo* expressed proteins in live attenuated lipopolysaccharide mutant that mediates heterologous protection against *Leptospira* spp. *Veterinary Microbiology*, Volume 262,109220.ISSN 0378-1135. doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109220.

- [53] Wunder, E. A., H. Adhikarla, C. Hamond, K. A. Owers Bonner, L. Liang, C. B. Rodrigues, V. Bisht, J. E. Nally, D. P. Alt, M. G. Reis, P. J. Diggle, P. L. Felgner and A. Ko (2021). "A live attenuated-vaccine model confers cross-protective immunity against different species of the *Leptospira* genus." *Elife* 10.
- [54] Ko, A I; Reis, M G; Dourado C M R; Johnson Jr, W D; Riley, L W; Salvador Leptospirosis Study Group. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet*, 354, 820-825.
- [55] Ellinghausen, H. C., Jr. and W. G. McCullough (1965). "Nutrition of *Leptospira* Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80." *Am J Vet Res* 26: 45-51.
- [56] Genbank. (2018). Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 10 Mar. 2018.
- [57] Signal-CF. (2018). Signal-CF: Predicting signal peptide & cleavage site. Disponível em <<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-CF/>>. Acesso em: 25 Mar. 2018.
- [58] SignalP-5.0. (2018). SignalP-5.0 Signal peptide and cleavage sites in gram+, gram- and eukaryotic amino acid sequences. Disponível em <<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>>. Acesso em 25 Mar. 2018.
- [59] PrediSi. (2018). PrediSi PREDIction of Signal peptides. Disponível em <<http://www.predisi.de/>>. Acesso em 25 Mar. 2018.
- [60] I-TASSER. (2018). I-TASSER Protein Structure & Function Predictions. Disponível em <<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>>. Acesso em 10 Abr. 2018.
- [61] PDB. (2018). PROTEIN DATA BANK. Disponível em <<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em 25 Abr. 2018.
- [62] NetMHCII-2.3. (2018). NetMHCII - 2.3 Binding of peptides to MHC class II molecules. Disponível em <<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3>>. Acesso em 26 Abr. 2018.
- [63] BepiPred - 2.0. (2018). BepiPred – 2.0 Prediction of potential linear B-cell epitopes. Disponível em <<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>>. Acesso em 26 Abr. 2018.
- [64] Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 27. p. 493-497.
- [65] Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*. 15. p. 297-307
- [66] Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E. et al. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919. doi.org/10.1038/35016007
- [67] Buchanan, S., Smith, B., Venkatramani, L. et al. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Mol Biol* 6, 56–63. doi.org/10.1038/4931

- [68] Wang, R., Xu, H., Du, L. et al. (2016). A TonB-dependent receptor regulates antifungal HSAF biosynthesis in *Lysobacter*. *Sci Rep* 6, 26881. doi.org/10.1038/srep26881
- [69] Postle, K. and Kadner, R.J. (2003), Touch and go: tying TonB to transport. *Molecular Microbiology*, 49: 869-882. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03629.x
- [70] Lin, M. H., Chang, Y. C., Hsiao, C. D., Huang, S. H., Wang, M. S., Ko, Y. C., Yang, C. W. & Sun, Y. J. (2013). LipL41, a Hemin Binding Protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *PLoS ONE*. 8 (12). p. 1-10.
- [71] Black, P N. (1991). Primary sequence of the *Escherichia coli* fadL Gene Encoding an Outer Membrane Protein Required for Long-Chain Fatty Acid Transport. *Journal of Bacteriology*, v.173, n.2, p 435-442.
- [72] Oliveira, Thaís L et al. (2016). Immune response in hamsters immunised with a recombinant fragment of LigA from *Leptospira interrogans*, associated with carrier molecules. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 11, p 712-716. doi.org/10.1590/0074-02760160214.
- [73] Fernandes, L.G. V, Teixeira, A.F., Filho, A.F.S., Souza, G.O., Vasconcellos, S.A., Heinemann, M.B., Romero, E.C. & Nascimento, A.L.T.O. (2017). Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. *International Journal of Infectious Diseases*. 681 57. p. 61–69.
- [74] Ghazali-Bina M, Pourmand MR, Mirshafiey A, Bakhtiari R, Khaledi A, Kazemian H, Afshar D, Getso MI, Eshraghi S. (2019). Vaccine potential of LenA and LcpA proteins of *Leptospira interrogans* in combination with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, B subunit (LTB). *Iran J Microbiol*. 2019 Feb;11(1):39-47. PMID: 30996830; PMCID: PMC6462271.
- [75] A.F. Teixeira, L.G.V. Fernandes, A. Souza Filho, G.O. Souza, S.A. Vasconcellos, M.B. Heinemann, et al. (2018). Evaluation of Lsa46 and Lsa77 leptospiral proteins for their immunoprotective activities in hamster model of leptospirosis. *Biomed Res Int*, v.2018, p 1813745. doi.org/10.1155/2018/1813745
- [76] Raja V, Sobana S, Mercy CSA, et al. (2018). Heterologous DNA prime-protein boost immunization with RecA and FliD offers cross-clade protection against leptospiral infection. *Sci Rep*. Apr 24;8(1):6447.
- [77] Teixeira Aline F., Cavenague Maria F., Kochi Leandro T., Fernandes Luis G., Souza Gisele O., de Souza Filho Antonio Francisco, Vasconcellos Silvio A., Heinemann Marcos Bryan, Nascimento Ana L. T. O. (2020). Immunoprotective Activity Induced by Leptospiral Outer Membrane Proteins in Hamster Model of Acute Leptospirosis. *Frontiers in Immunology*, v.11, p 2841. doi=10.3389/fimmu.2020.568694
- [78] J. Dorneles, Andriele Bonemann Madruga, Amilton Clair Pinto Seixas Neto et al.. (2020). Protection against leptospirosis conferred by *Mycobacterium bovis* BCG expressing antigens from *Leptospira interrogans*, Vaccine. doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.086

- [79] Oliveira, N. R. de. (2020). Vacinologia estrutural aplicada ao desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose. Orientador: Odir Antônio Dellagostin. 2020. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020
- [80] Haake, D.A., Hamster model of leptospirosis. Curr Protoc Microbiol, 2006. Chapter 12: p. Unit 12E 2.
- [81] Gomes-Solecki, M., I. Santecchia, and C. WERTS, Animal models of leptospirosis: of Mice and Hamsters. Frontiers in Immunology, 2017. 8(58)
- [82] Cagliero J, Villanueva SYAM, Matsui M. Leptospirosis pathophysiology: Into the storm of cytokines. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:1–8.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00204>.
- [83] Xia, B., et al., A new model of self-resolving leptospirosis in mice infected with a strain of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis harboring LPS signaling only through TLR4. Emerg Microbes Infect, 2017. 6(5): p. e36
- [84] Richer, L., et al., Mouse model for sublethal *Leptospira interrogans* infection. Infect Immun, 2015. 83(12): p. 4693-700
- [85] Athanazio, D.A., et al., *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. Acta Trop, 2008. 105(2): p. 176-80
- [86] Johnson, R. C. and V. G. Harris (1967). "Differentiation of pathogenic and saprophytic letospires. I. Growth at low temperatures." J Bacteriol 94(1): 27-31.

Tabelas

Tabela 1. Caracterização das proteínas recombinantes LIC10496, LIC10881, LIC10496+LIC10881 quanto as sequências de aminoácidos selecionadas, predição de epítomos de linfócitos B, predição de epítomos de linfócitos T e massa molecular

Proteína	Sequência de aminoácidos	Aminoácidos expostos à ME	Nativa (kDa)	Recombinante (kDa)
LIC10496	TTKQPPIKITLDQAVLIGSSNSVVLKVLEAKKEVSKMLITEKWREF LPKFGIQYYGLRNQNVNSADNIYNDIRLTVQQLIFDGGEANLNLE IAKSELLNEQDFKINLSRLRLDIQKAYFRALALKGKVYIQKKAQE KAQEALRKGVVELRQGFITKVQLMDLESKLKQTEFNVQKSKND SDQALLDLKQVMNLDYYAEIELNESIFFDFIINAPPNTHNLDELIS KAKNGREDLKKMQIIVKKLKNEKEVLNQYMPKVYVGAYAGRN GNNNQFTHDSYGVNFNLVMPLGSSVVQSNGNTGVQKDGNGIQ TYPGFGNQTVGPGTNSYNSTSVRLFDNLSQSRKAMEGEIQLAE ALLNYRNMENQVGFEIKKSVDKLNQSWELINIANSRINLQVESG RAMAAKVAYGHAKKEDQINSELEMIKSQEDLTDALTSYAINCYE YAQITTDEGGLRKLIIQYSKSGSNSILSNLIKNQETGSKPKK	RNQN VNSADNIYN 58-70 aa RNGNNNQFTHDSYGVNFNLVMPLGSSVVQS NGNTGVQKDGNGIQTYPGFGNQTVGPGT 268-325 aa	57,9	55,9
LIC10881	GTLWAKASLRKIFANSKSDPPTQIWVRGNGYSKVFLSDQSSE LTIDLKEQGVYDVILTFKSGEMEHKFVTVDSDEKNLEFVQKTKKV TNGINVVGKRPEAPPNYVLSQEDAIRMPGGFGDALKAVQSMGP ISPMYQMYTGASFQSAIQTFAQATNPDKPDKPNGEKGFLVMRG AGARANQFYFNGLPMSYPFHADGLTSVINNNAIRSLELYSGSYS ARYGFATGGIINIEGFQKRDSNLSVAHLNAFLTDVYTYRNITKDL NVSVSGKKYYPNIVFGRVPLNIPAETFLADYNDYQARIGWDISEN HLSLFQTFGAKDKRYPFKELSQYNPKETAQSFANPPSDADAAR LDRIFRTDGIQHIWKPKSSITNTFNVSRNYFNEVTENGLDMLVLD ITKIGYPPSLYKRVQTIQNEYFNDLRQIENVSEVELLKRWNKIVFG	GFGDALK 119-125 aa ISPMYQMY TGASFQSAIQTFAQATNPDKPDK PNGEKGFLVMRGAGARANQF 133-183 aa GFATG 223-227 aa L 251 aa KKYYPNIVFGRVPLNIPAETFLADYNDYQAR 271-301 aa FGAKDKRYPFKELSQYNPKETAQSFANPPSD	63,2	61,9

GQYREVD TGYKGKVSQIDLDPTYNFIHQQLLNSSDVKSVLEGDS
VRTROIGTFFENRFKFYDFNLNLGVRREYYDKSRE

ADAARLDRI~~FRT~~ **317-359 aa**
VSRNYFNEVTENGLDMLVLDITKI~~GYP~~PSLYK
RVQTIQNEYFND **378-421 aa**
RETGYK~~GK~~VSQIDLDPTYNFIHQQLLNSSDVK
SVLEGDSVRTRQI **447-493 aa**
EYYDKSRE **515-522 aa**

LIC10496+

1

RNQNVNSADNIYNRRNGNNNQFTHDSYGVNF
 NLVMPLGSSVVQSNGNNTGVQKDGNGIQTYF
 GFGNQTVGPGTGFGDALKISPMYQMYTGAS
 FQSAIQTFQAATNPDPKBDKPNGEKGFLVMRG
 AGARANQFGFATGLKKYYPNIVFGRVNPNLIPA
 ETFLADYNDYQARFGAKDKRYPFKELSQYNP
 KETAQSFANPPSDADAARLDRIFRVSRNYF
 NEVTENGLDMLVLDITKIGYPPSLYKRVQTIQ
 NEYFNDREVDTGYKGKVSQIDLDPTYNFIHQ
 OLLNSSDVKSULEGDSVRTROIYYDKSRE

29,6

LIC10881

HHTGMGGSDQSSTRFVDPFTGKREKPANYVVLTDQFFKQTNE
NSNIHTSTFFGEINLKNMGFALNLSVPYTYEYEQDRSDAARIGKT
YIGIKYLLPLVDFQKNYFIVFSANVGFPSPGPDTKFTGGNYYS
GLTFGYLLGKFSFVGKLSGIFPLSKSQPSNLQDNDGIVYWL
RNPSSSPPEETYLLKKTSLFSGYVTYLWKPGLSFFTGLYRTPYEGV
DLKRSNQGVPSIFREISLGFSANISEKLNFNLSYRYPLYRGEDY
RLYDYAITAAVSIEISELENSKPAKVEEVKOEPEETTOETK

HHTGMGSDQSSTRFVDPFTGKREKPANYV
VLTQDFFKQTNENSNIHTSTFFGEINLKNGMF
ALNLSVPYTYEYQKDRSDAARIGKTYIGIKYLP
LVDFQKNYFIVFSANVGFPSGPDTDKFTGGN
YYSGIPGLTFGYLLGKFSFVGKLSGIFPLSKS
QPSNLQDNDGIVYWLRLNPSSPPEETYLLKK
TSLFSGYVTYLWKPGLSFFTGLYRTPYEGV
DLKRSNQGKVPSIFREISLGFSANI~~SEKLN~~FN
SYRYPLYRGE~~DYRLYDYAITAAVSIEI~~SELENS
KPAKVEEVKOEPEETTQETK*****

37,3

36.7

LIC11086

ME) Membrana externa; **aa)** Aminoácidos; **kDa)** Quilodalton. Os aminoácidos destacados em **vermelho** foram preditos como epítomos de linfócitos T no *software* NetMHCII–2.3. Os aminoácidos destacados em **azul** foram preditos como epítomos de linfócitos B no *software* BepiPred-2.0. Os aminoácidos sublinhados são os epítomos em comum de linfócitos B e T. -) Não se aplica a LIC10496+LIC10881 uma vez que ela é uma construção quimérica a partir das regiões expostas a superfície celular. ***** Toda a proteína foi considerada para predição de epítomos.

Tabela 2. Proteção conferida pelas vacinas recombinantes contra o desafio letal no modelo hamster para a leptospirose

<i>Proteína</i>	<i>Experimento</i>	<i>% proteção</i>	<i>Cultura positiva</i>	<i>Valor de P</i>
LIC10496	1	0 (0/10)	6/10	0.2105
LIC10881		10 (1/10)	7/10	0.5820
LIC11086		20 (2/10)	6/10	1.0000
Controle negativo PBS		22.2 (2/9)	2/9	-
LIC10496+LIC10881	2	0 (0/9)	9/9	1.0000
Controle negativo PBS		11.1 (1/9)	8/9	-

Legendas das Figuras

Figura 1. Delineamento experimental para os experimentos vacinais *in vivo* contendo as OMPs recombinantes.

Figura 2. Modelagem estrutural das OMPs recombinantes com base nos modelos preditos no I-TASSER. As regiões salientadas em verde representam as porções proteicas expostas à superfície leptospiral, e que foram selecionadas para compor a proteína quimérica LIC10496+LIC10881.

Figura 3. Caracterização antigênica das OMPS recombinantes expressas em sistema de expressão heterólogo em *E. coli*. (A) *Western blot* incubado com um *pool* de soros humanos convalescentes; (B) *Western blot* incubado com um *pool* de soros bovinos positivos para a leptospirose; (C) *Western blots* incubados com *pools* de soros provenientes dos hamsters imunizados com as proteínas recombinantes; (M) Marcador PageRuler™ *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific 26616, Illinois, USA); (L1-130) Extrato de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 (10^8 bactérias); (Star) Extrato de *E. coli* cepa BL21 (DE3) Star; (pLysS) Extrato de *E. coli* cepa BL21 (DE3) PlysS; (LigBrep (+)) Controle positivo de reação. ● Indica a banda das proteínas recombinantes no tamanho esperado. *** OMPs recombinantes LIC10496 e LIC10881 que foram incubadas com *pool* de soros provenientes dos hamsters imunizados com a proteína quimérica.

Figura 4. Dose letal para 50% dos animais infectados (DL₅₀) com leptospiras patogênicas. Os animais foram desafiados com leptospiras patogênicas da espécie *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Os grupos experimentais tiveram N = 3 animais por grupo, e as doses de 10^0 a 10^3 leptospiras foram testadas. A DL₅₀ foi calculada conforme descrito previamente (Reed e Muench, 1938).

Figura 5. Proteção contra o desafio letal. A sobrevivência dos animais imunizados com as OMPs recombinantes e o controle negativo PBS foi avaliada após o desafio com uma dose letal de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Os grupos testados tiveram N = 9 ou 10 animais por grupo. A porcentagem de sobrevivência é a relação entre o número de animais sobreviventes, frente ao número de animais desafiados em cada grupo.

Figura 6. Resposta imune humoral induzida pela vacinação de hamsters com as OMPs recombinantes. LIC10496, LIC10881, LIC10496+LIC10881, LIC11086 e controle negativo PBS avaliada pela técnica de ELISA indireto. Os valores representam as médias das absorbâncias dos anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados de cada grupo, em triplicatas. As barras representam o desvio padrão entre todos os valores de cada grupo. **** Indicam as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, com um valor de $P < 0,0001$.

Figura 1.

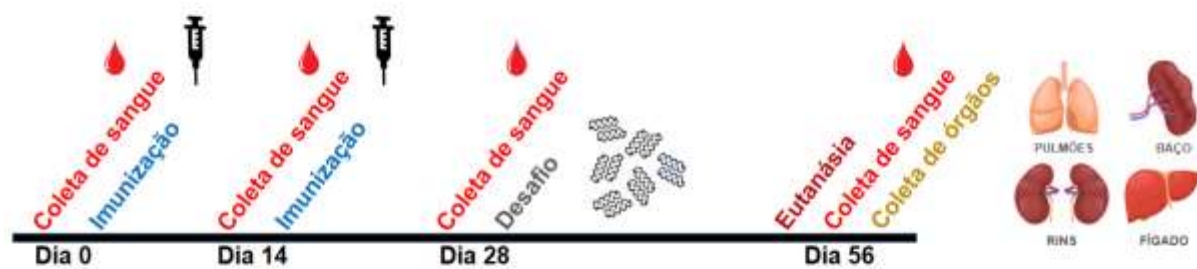


Figura 2.

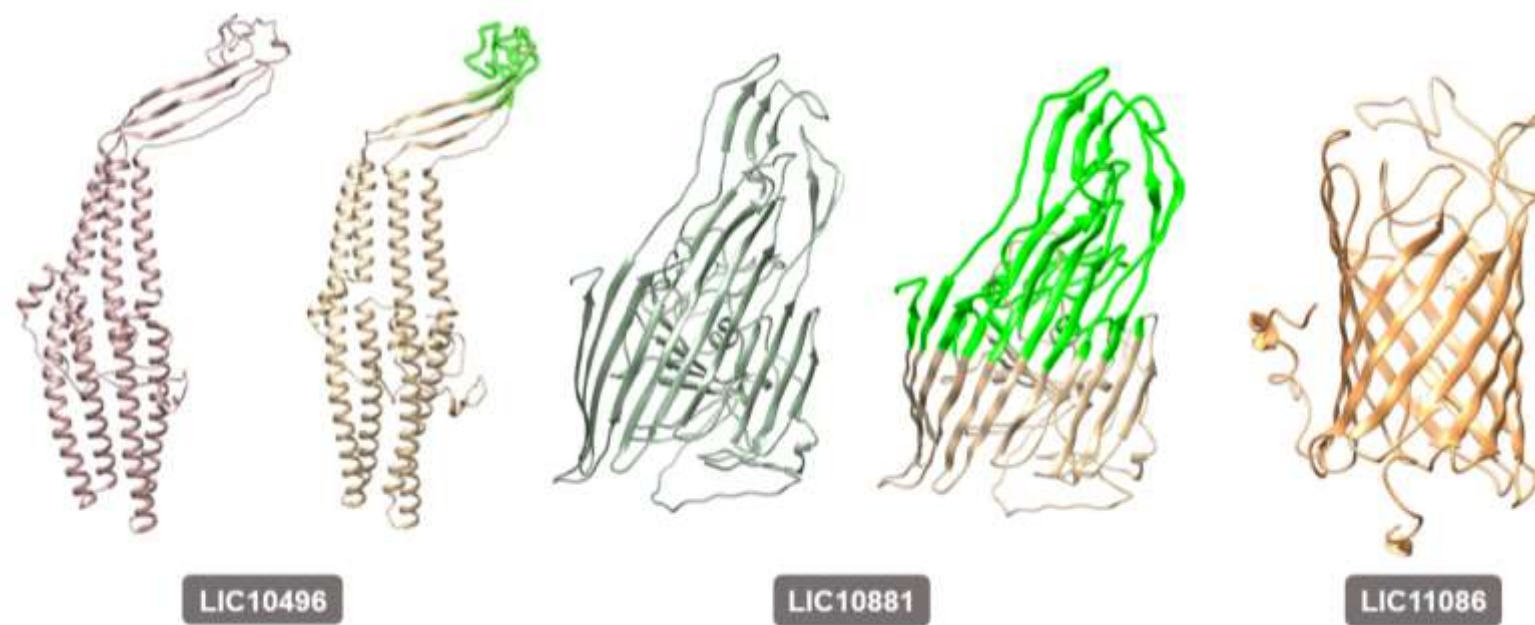


Figura 3.

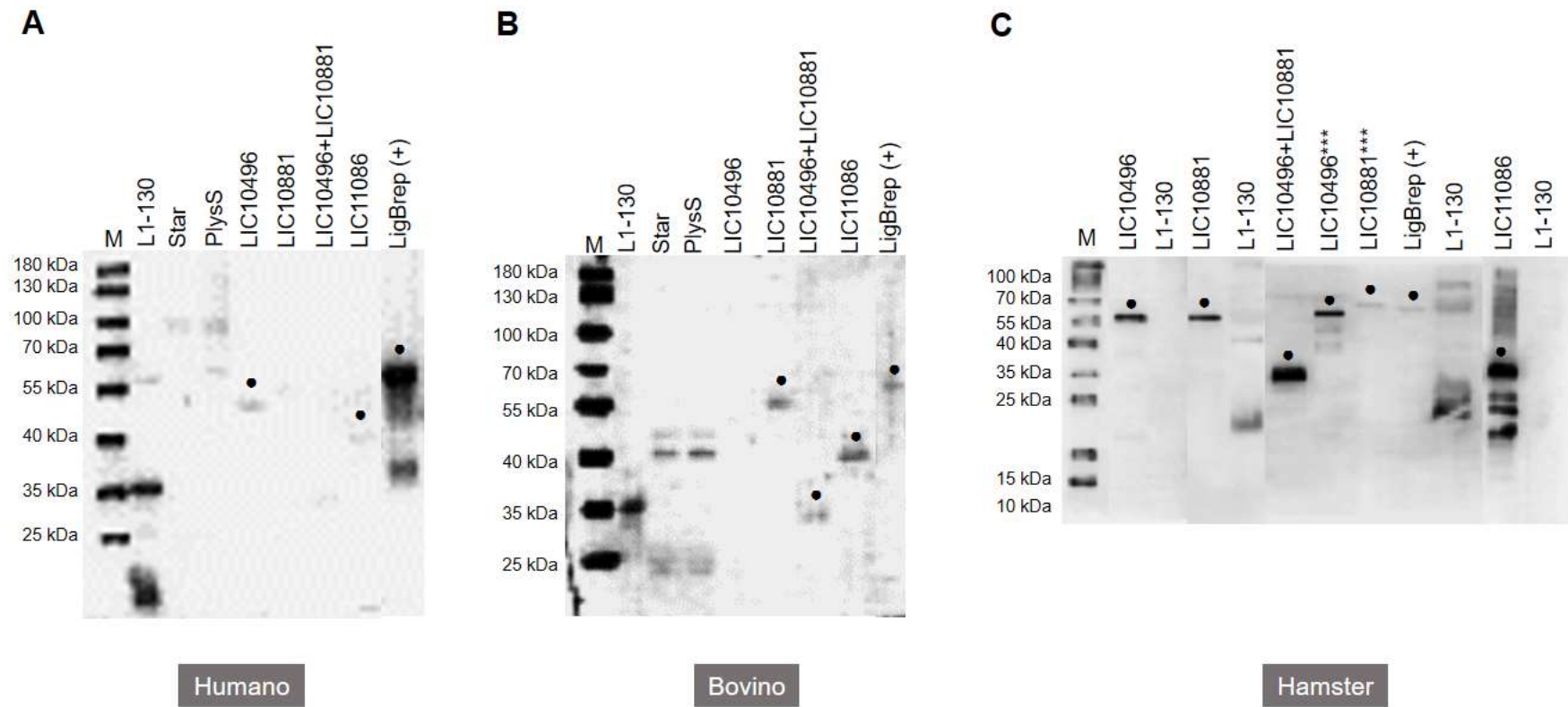


Figura 4.

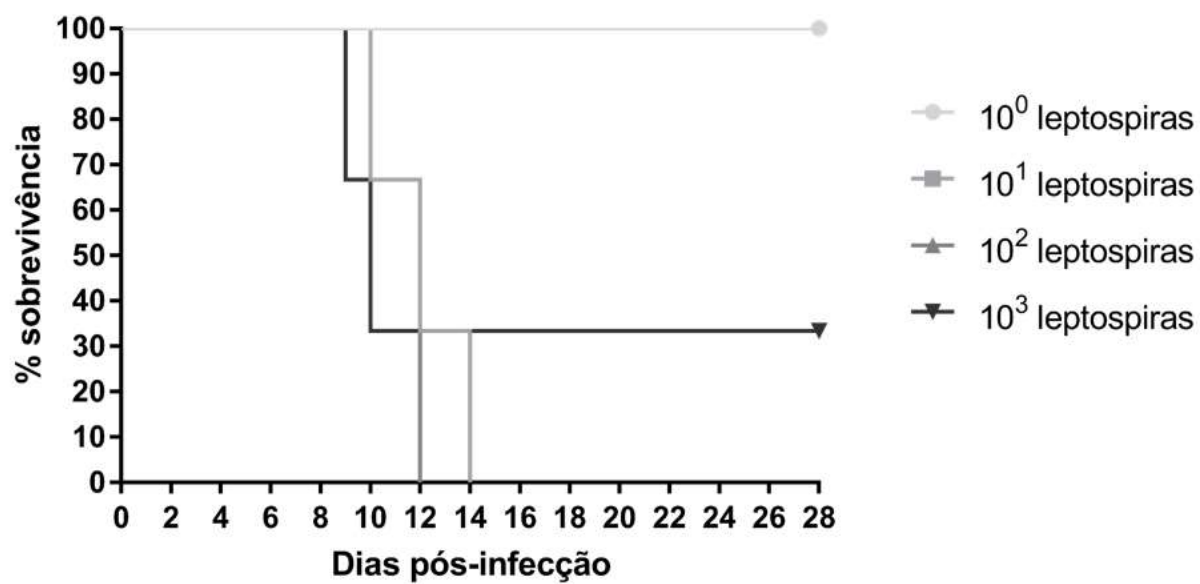


Figura 5.

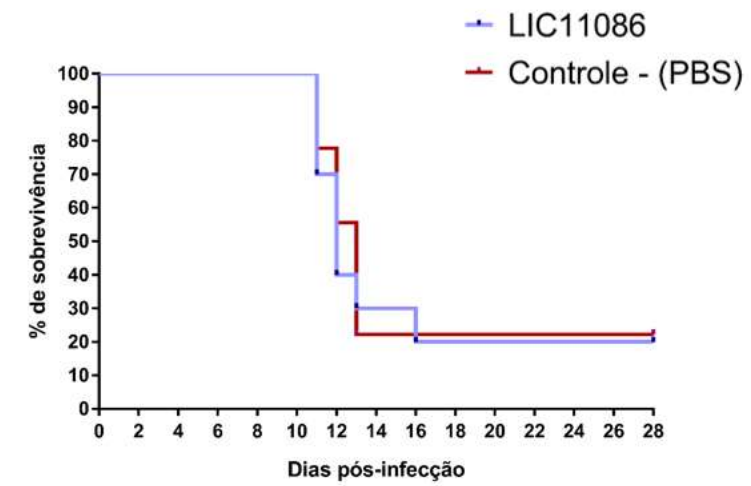
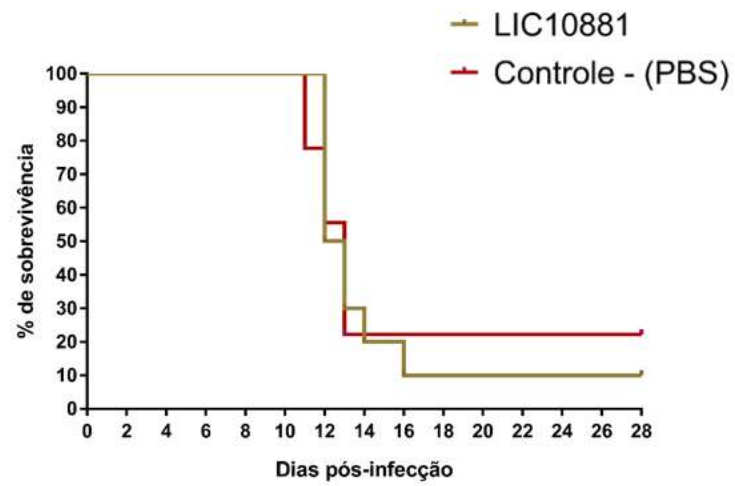
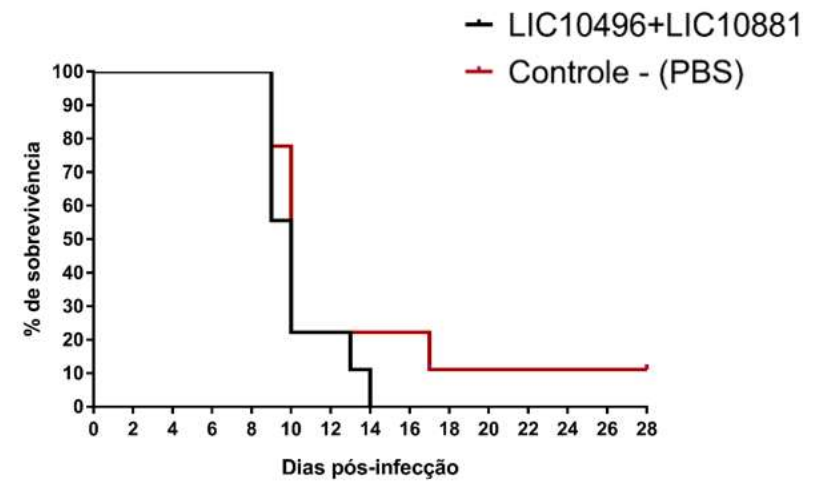
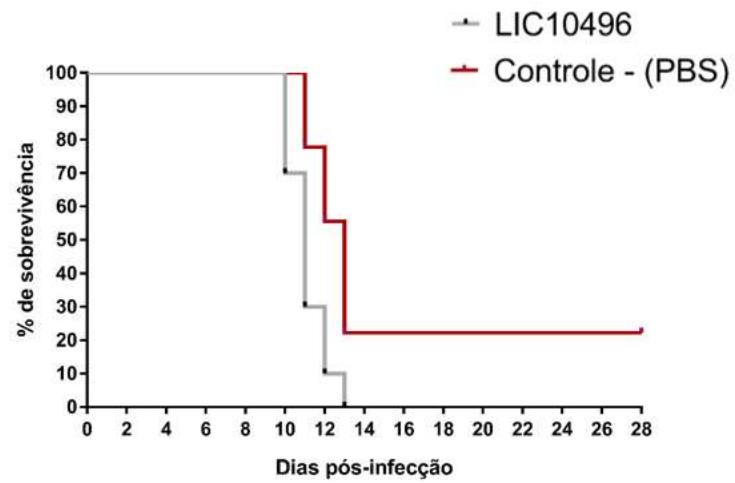
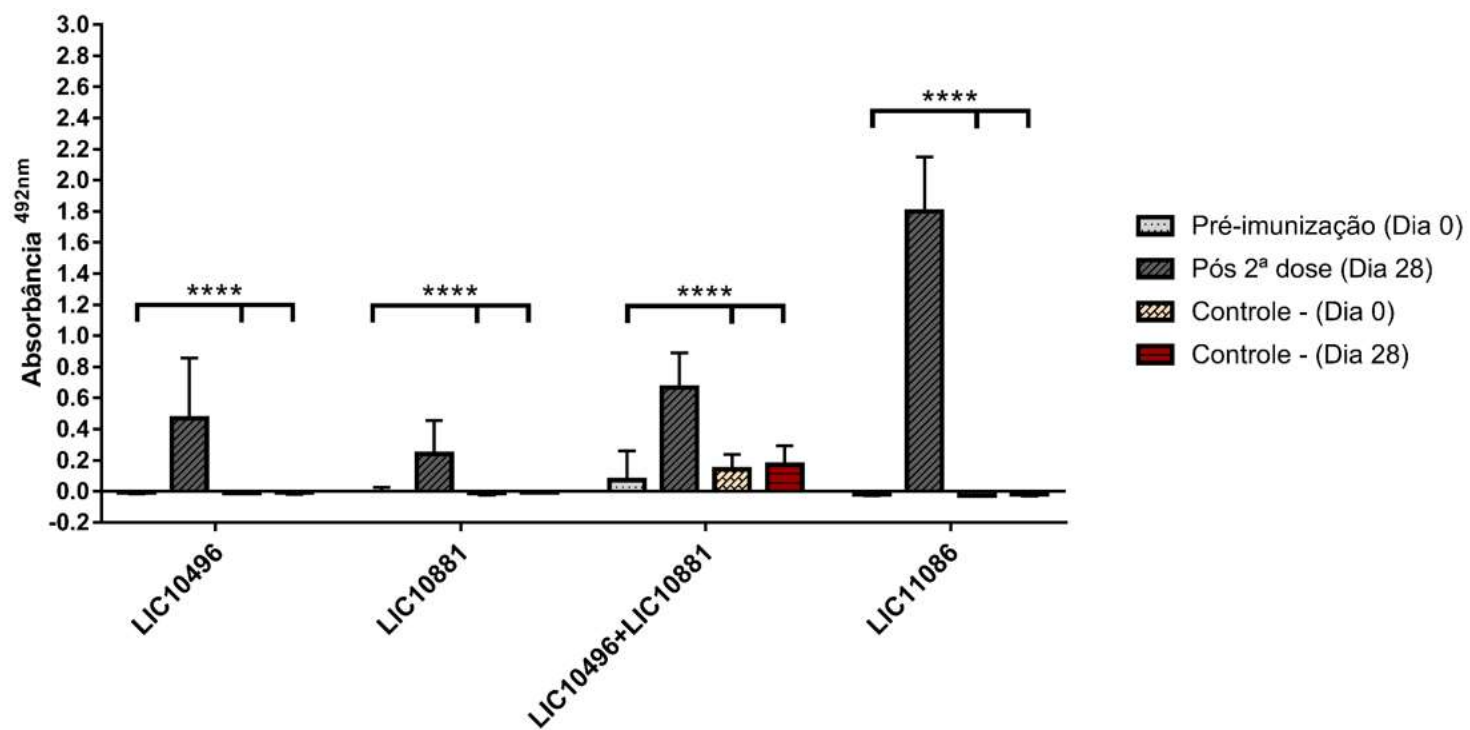


Figura 6.



Material Suplementar.

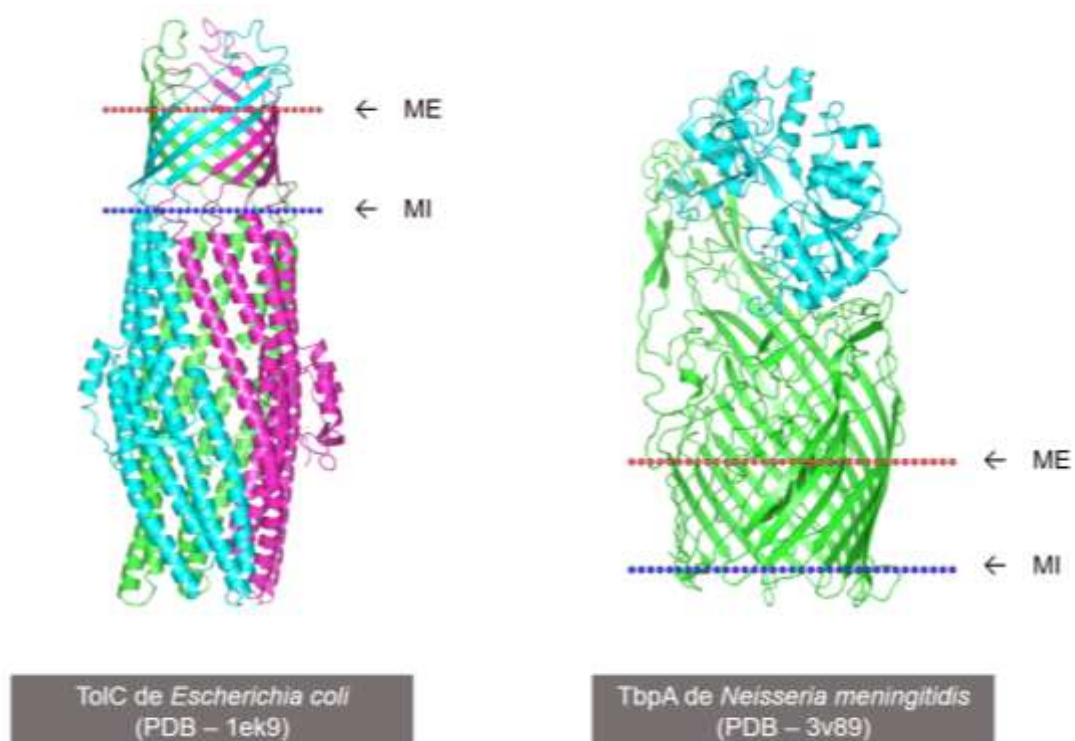


Figura S1. Estruturas tridimensionais (3D) das proteínas depositadas no *PROTEIN DATA BANK* (PDB) utilizadas como referências para a predição das regiões expostas a superfície celular. As proteínas TolC de *E. coli* (entrada 1ek9) e TbpA de *N. meningitidis* (entrada 3v89) foram usadas como modelos para a seleção das regiões expostas a superfície das OMPs recombinantes LIC10496 e LIC10881. **ME) Membrana externa; **MI)** Membrana interna.**

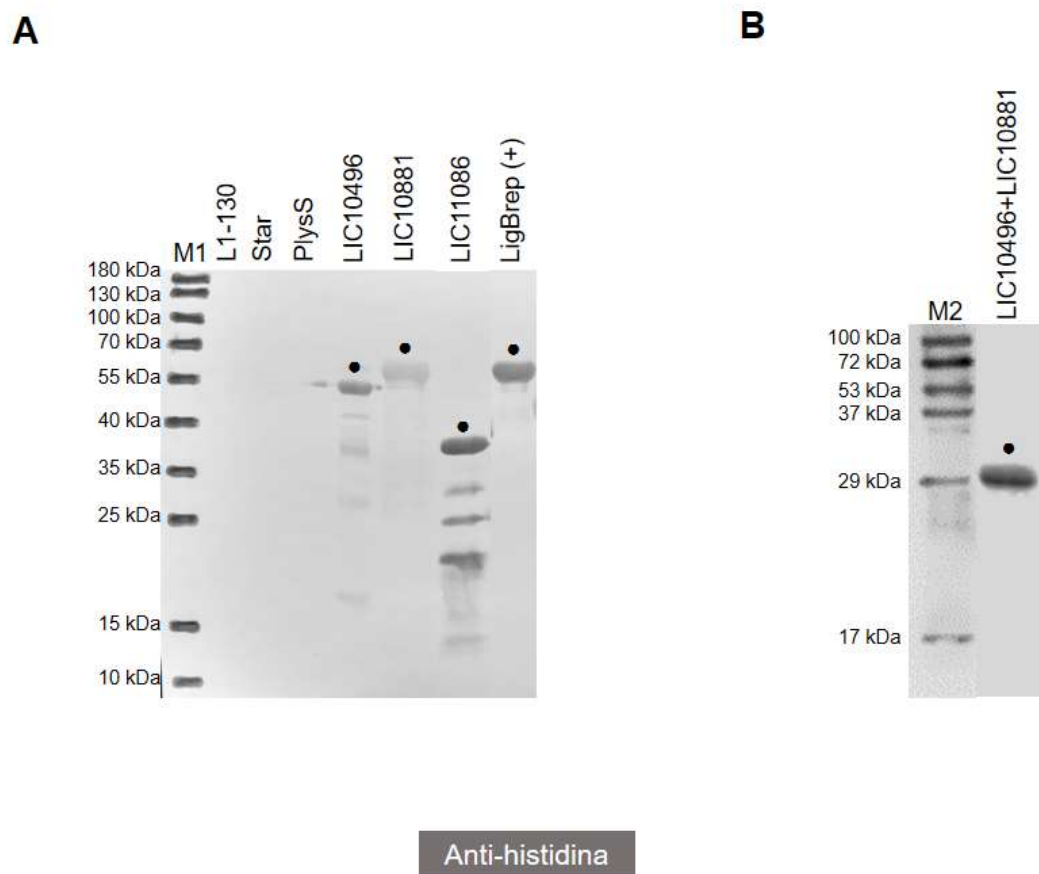


Figura S2. Caracterização das OMPs recombinantes expressas em sistema de expressão heterólogo em *E. coli*. A,B) *Western blots* incubados com anticorpo secundário anti-histidina, demonstrando que as proteínas recombinantes apresentaram as massas moleculares esperadas. **M1)** Marcador PageRuler™ *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific 26616, Illinois, USA); **M2)** Marcador de peso molecular de proteínas pré corado (Ludwig, Rio grande do Sul, Brasil; **L1-130)** Extrato de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 (10^8 bactérias); **Star)** Extrato de *E. coli* cepa BL21 (DE3) Star; **PlysS)** Extrato de *E. coli* cepa BL21 (DE3) PlysS; **LigBrep (+)** Controle positivo de reação. ● Indica a banda das proteínas recombinantes no tamanho esperado.

5. Conclusões gerais

- A revisão escrita pelo nosso grupo identificou os principais problemas que são importantes no campo de desenvolvimento de vacinas para humanos contra a leptospirose. A ausência de correlatos de imunidade, padronização de protocolos entre os grupos de pesquisa, modelo animal adequado que possibilite avaliar as respostas imunes induzidas pelas vacinas e durante a infecção bacteriana, e o escasso conhecimento da microbiologia básica de leptospirosas são as principais lacunas no desenvolvimento de vacinas recombinantes para a leptospirose.
- O entendimento da microbiologia básica de *Leptospira* spp. é uma ferramenta essencial para o aperfeiçoamento das pesquisas envolvendo leptospirosas patogênicas. Culturas utilizando o meio de cultura IHM (EMJH caseiro), em tubos estáticos e incubadas à 28 °C apresentaram um crescimento otimizado. Esse trabalho demonstrou que o meio de cultura e a temperatura influenciaram no cultivo *in vitro*, e leptospirosas em fase exponencial de crescimento foram mais virulentas no modelo hamster. Uma vez que diversos estudos de vacinologia apresentaram animais sobreviventes nos grupos controle negativo, o que pode indicar redução de virulência bacteriana, a capacidade de manter a virulência de leptospirosas estável é um fator essencial no desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose.
- A aplicação da técnica de CSIP em leptospirosas adaptadas ao hospedeiro foi capaz de reconhecer 24 antígenos que foram preditos com localização na membrana externa de leptospirosas. Essa técnica foi efetiva na identificação de antígenos imunoprecipitados com anticorpos de soros convalescentes humanos. Os antígenos identificados devem ser explorados quanto a capacidade de gerar proteção contra desafio letal em experimentos vacinais.
- As proteínas LIC10496, LIC10881 e LIC11086 identificadas por CSIP em leptospirosas adaptadas ao hospedeiro, apresentaram potencial imunogênico e induziram a produção de anticorpos em hamsters imunizados. Além disso, soros de humanos e bovinos reconheceram essas proteínas, sugerindo que elas são expressas durante a infecção no hospedeiro. Entretanto, essas proteínas não foram capazes de proteger os animais vacinados da infecção letal por leptospirosas patogênicas.

6. Referências

- Abdullah M, Chaubey K K, Namdev R, Sharma Rolee. (2021) *Leptospira*: A Review on Pathogenesis and Host Immune Response. *Annals of R.S.C.B.*, ISSN:1583-6258, v.25, 5, p. 18686 – 18694.
- Adler, B. (2014). "Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects." *Vet Microbiol*.
- Adler, B. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 387:1-293.
- Adler, B. (2015). "Vaccines against leptospirosis." *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 251-272.
- Adler, B. and A. de la Pena Moctezuma (2010). "Leptospira and leptospirosis." *Vet Microbiol* 140(3-4): 287-296.
- Ahmed, N., S. M. Devi, L. Valverde Mde, P. Vijayachari, R. S. Machang'u, W. A. Ellis and R. A. Hartskeerl (2006). "Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 28.
- Aidid M, Shahr E, Hayati & SI, Sharifah. (2018). Determinants of Leptospirosis Preventive Practices among the Community in a Flood-Prone Residential Area in Kuantan, Malaysia. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 14. 2636-9346.
- Ali B e Basak H. (2019). Importance of leptospirosis for human and animal health, present condition, problems and solution proposals in Turkey and the World. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2019, 04(02), 049–060. e-ISSN: 2581-9615, Cross Ref DOI: 10.30574/wjarr
- Bacelo, K. L., D. D. Hartwig, F. K. Seixas, R. Schuch, S. Moreira Ada, M. Amaral, T. Collares, C. T. Vendrusculo, A. J. McBride and O. A. Dellagostin (2014). "Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis." *Biomed Res Int* 2014: 636491.
- Barbosa, A. S. e L. Isaac (2020). "Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system." *FEBS Lett* 594(16): 2633-2644.
- Baseman, J. B. and C. D. Cox (1969). "Intermediate energy metabolism of *Leptospira*." *J Bacteriol* 97(3): 992-1000.
- Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett, P. N. Levett, R. H. Gilman, M. R. Willig, E. Gotuzzo and J. M. Vinetz (2003). "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance." *Lancet Infect Dis* 3(12): 757-771.
- Breda LCD, Hsieh C-L, Castiblanco Valencia MM, da Silva LB, Barbosa AS, Blom AM, et al. (2015) Fine Mapping of the Interaction between C4b-Binding Protein and Outer Membrane Proteins LigA and LigB of Pathogenic *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis* 9(10): e0004192. doi:10.1371/journal.pntd.0004192
- Caimano, M. J., S. K. Sivasankaran, A. Allard, D. Hurley, K. Hokamp, A. A. Grassmann, J. C. Hinton and J. E. Nally (2014). "A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni." *PLoS Pathog* 10(3): e1004004.

- Caimi, K. and P. Ruybal (2020). "Leptospira spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion." *Infect Genet Evol* 81: 104241.
- Cameron, C. E. (2015). "Leptospiral structure, physiology, and metabolism." *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 21-41.
- Campos, A. P., D. F. Miranda, H. W. Rodrigues, M. da Silva Carneiro Lustosa, G. H. Martins, A. L. Mineiro, V. Castro, S. S. Azevedo and S. M. de Sousa Silva (2017). "Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil." *Trop Anim Health Prod*.
- Casanovas-Massana, A., C. Hamond, L. A. Santos, D. de Oliveira, K. P. Hacker, I. Balassiano, F. Costa, M. A. Medeiros, M. G. Reis, A. I. Ko and E. A. Wunder (2020). "Leptospira yasudae sp. nov. and Leptospira stimsonii sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources." *Int J Syst Evol Microbiol* 70(3): 1450-1456.
- CDC. (2018). Centers for Disease Control and Prevention. *One Health*. Disponível em <<https://www.cdc.gov/onehealth/>>. Acesso em: 22 Nov. 2020.
- CDC. (2020). Centers for Disease Control and Prevention. Neglected Tropical diseases. Disponível em < <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>>. Acesso em: 20 Dez. 2020.
- Chakraborty, A., S. Miyahara, S. Y. Villanueva, M. Saito, N. G. Gloriani and S. Yoshida (2011). "A novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species." *Microbiol Immunol* 55(7): 494-501.
- Chin VK, Lee TY, Lim WF, Wan Shahrman YWY, Syafinaz AN, Zamberi S, Maha A. (2018). Leptospirosis in human: Biomarkers in host immune responses, *Microbiological Research*, v.207, p. 108-115. ISSN 0944-5013. doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.015.
- Chin, V. K., R. Basir, S. A. Nordin, M. Abdullah and Z. Sekawi (2019). "Pathology and Host Immune Evasion During Human Leptospirosis: a Review." *Int Microbiol*.
- Cilia, G.; Bertelloni, F.; Albini, S.; Fratini, F. (2021). Insight into the Epidemiology of Leptospirosis: A Review of Leptospira Isolations from "Unconventional" Hosts. *Animals*.11, 191. doi.org/10.3390/ani11010191
- Conrad, N. L., F. W. Cruz McBride, J. D. Souza, M. M. Silveira, S. Felix, K. S. Mendonça, C. S. Santos, D. A. Athanazio, M. A. Medeiros, M. G. Reis, O. A. Dellagostin and A. J. McBride (2017). "LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis." *PLoS Negl Trop Dis* 11(3): e0005441.
- Costa, F., J. E. Hagan, J. Calcagno, M. Kane, P. Torgerson, M. S. Martinez-Silveira, C. Stein, B. Abela-Ridder and A. I. Ko (2015). "Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review." *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0003898.
- Coutinho, M. L., H. A. Choy, M. M. Kelley, J. Matsunaga, J. T. Babbitt, M. S. Lewis, J. A. Aleixo and D. A. Haake (2011). "A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by Leptospira interrogans." *PLoS Negl Trop Dis* 5(12): e1422.
- Croda, J. (2008). Patógenese da síndrome pulmonar hemorrágica na leptospirose humana Doutor em Ciências, Universidade Federal de São Paulo.
- Croda, J., C. P. Figueira, E. A. Wunder, Jr., C. S. Santos, M. G. Reis, A. I. Ko and M. Picardeau (2008). "Targeted mutagenesis in pathogenic Leptospira species: disruption

of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis." *Infect Immun* 76(12): 5826-5833.

Cunha, C. E., J. Newcombe, O. A. Dellagostin and J. McFadden (2017). "Immunoprecipitation of cell surface proteins from Gram-negative bacteria." *Bio-Protocol* 7(9).

da Cunha, C. E. P., E. B. Bettin, A. Bakry, A. C. P. Seixas Neto, M. G. Amaral and O. A. Dellagostin (2019). "Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera." *Vaccine* 37(13): 1844-1852.

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).

Dhandapani, G., T. Sikha, A. Rana, R. Brahma, Y. Akhter and M. Gopalakrishnan Madanan (2018). "Comparative proteome analysis reveals pathogen specific outer membrane proteins of *Leptospira*." *Proteins*.

Dorsch, R., J. Ojeda, M. Salgado, G. Monti, B. Collado, C. Tomckowiack, C. Tejeda, A. Muller, T. Eberhard, H. Klaasen and K. Hartmann (2020). "Cats shedding pathogenic *Leptospira* spp.-An underestimated zoonotic risk?" *PLoS One* 15(10): e0239991.

Ellinghausen, H. C., Jr. (1973). "Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospires." *J Med Microbiol* 6(4): 487-497.

Ellinghausen, H. C., Jr. and W. G. McCullough (1965). "Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80." *Am J Vet Res* 26: 45-51.

Ellis, W. A. (2015). "Animal leptospirosis." *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 99-137.

Ellis, W. A., J. Montgomery and J. A. Cassells (1985). "Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar hardjo." *Res Vet Sci* 39(3): 292-295.

Eshghi, A., K. Lourdault, G. L. Murray, T. Bartpho, R. W. Sermswan, M. Picardeau, B. Adler, B. Snarr, R. L. Zuerner and C. E. Cameron (2012). "*Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence." *Infect Immun* 80(11): 3892-3899.

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.

Evangelista, K. V., K. Lourdault, J. Matsunaga and D. A. Haake (2017). "Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis." *PLoS One* 12(7): e0180004.

Faine, S. B., B. Adler, C. Bolin and P. Perolat (1999). *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, MediSci.

Faisal, S. M., W. Yan, S. P. McDonough, C. F. Chang, M. J. Pan and Y. F. Chang (2009). "Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model." *Vaccine* 27(47): 6537-6545.

Faisal, S. M., W. Yan, S. P. McDonough and Y. F. Chang (2009). "Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity." *Vaccine* 27(3): 378-387.

Faisal, S. M., W. Yan, S. P. McDonough, H. O. Mohammed, T. J. Divers and Y. F. Chang (2009). "Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis." *Vaccine* 27(44): 6129-6136.

Fávero J F, Araújo H L, Lilenbaum W, Machado G, Tonin A A, Baldissera M D, Stefani L M, Silva A S (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation, *Microbial Pathogenesis*. v.107, p. 149-154. ISSN 0882-4010. doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032.

Fernandes, L. G., G. H. Siqueira, A. R. Teixeira, L. P. Silva, J. M. Figueredo, M. R. Cosate, M. L. Vieira and A. L. Nascimento (2015). "Leptospira spp.: Novel insights into host-pathogen interactions." *Vet Immunol Immunopathol*.

Fernandes, L.G.V., Hornsby, R.L., Nascimento, A.L.T.O. *et al.* (2021). Genetic manipulation of pathogenic *Leptospira*: CRISPR interference (CRISPRi)-mediated gene silencing and rapid mutant recovery at 37 °C. *Sci Rep* 11, 1768. doi.org/10.1038/s41598-021-81400-7

Forster, K. M., D. D. Hartwig, T. L. Oliveira, K. L. Bacelo, R. Schuch, M. G. Amaral and O. A. Dellagostin (2015). "DNA prime-protein boost based vaccination with a conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins enhances protection against leptospirosis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(8): 989-995.

Forster, K. M., D. D. Hartwig, F. K. Seixas, K. L. Bacelo, M. Amaral, C. P. Hartleben and O. A. Dellagostin (2013). "A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis." *Clin Vaccine Immunol* 20(5): 725-731.

Fouts, D. E., M. A. Matthias, H. Adhikarla, B. Adler, L. Amorim-Santos, D. E. Berg, D. Bulach, A. Buschiazzi, Y. F. Chang, R. L. Galloway, D. A. Haake, D. H. Haft, R. Hartskeerl, A. I. Ko, P. N. Levett, J. Matsunaga, A. E. Mechaly, J. M. Monk, A. L. Nascimento, K. E. Nelson, B. Palsson, S. J. Peacock, M. Picardeau, J. N. Ricaldi, J. Thaipandungpanit, E. A. Wunder, Jr., X. F. Yang, J. J. Zhang and J. M. Vinetz (2016). "What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*." *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004403.

Fraser, T. and P. D. Brown (2017). "Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp." *Front Microbiol* 8: 783.

Ge, Y. M., A. H. Sun, D. M. Ojcius, S. J. Li, W. L. Hu, X. Lin and J. Yan (2020). "M16-Type Metalloproteases Are Involved in Virulence for Invasiveness and Diffusion of *Leptospira interrogans* and Transmission of Leptospirosis." *J Infect Dis* 222(6): 1008-1020.

Goarant, C., M. Picardeau, S. Morand and K. M. McIntyre (2019). "Leptospirosis under the bibliometrics radar: evidence for a vicious circle of neglect." *J Glob Health* 9(1): 010302.

Grassmann, A. A., S. R. Felix, C. X. dos Santos, M. G. Amaral, A. C. Seixas Neto, M. Q. Fagundes, F. K. Seixas, E. F. da Silva, F. R. Conceicao and O. A. Dellagostin (2012). "Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or

coadministered with the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin." Clin Vaccine Immunol 19(5): 740-745.

Grassmann, A. A., F. S. Kremer, J. C. Dos Santos, J. D. Souza, L. D. S. Pinto and A. J. A. McBride (2017). "Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology." Front Immunol 8: 463.

Grassmann, A. A., A. J. McBride, J. E. Nally and M. J. Caimano (2015). "Generation of Mammalian Host-adapted Leptospira interrogans by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats." Bio Protoc 5(14): e1536.

Grassmann A.A., da Cunha C.E.P., Bettin E.B., McBride A.J.A. (2017) Overview of Leptospirosis. In: Singh S. (eds) Neglected Tropical Diseases - South Asia. *Neglected Tropical Diseases*. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-68493-2_8

Gualtieri A F e Hecht J P. (2019). An Epidemic Model for the Propagation of Leptospirosis Outbreaks. *Journal of Health Sciences*. 7 (2019) 135-141 doi: 10.17265/2328-7136/2019.02.010

Guglielmini, J., P. Bourhy, O. Schiettekatte, F. Zinini, S. Brisse and M. Picardeau (2019). "Genus-wide Leptospira core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance." PLoS Negl Trop Dis 13(4): e0007374.

Haake, D. A., M. Dundoo, R. Cader, B. M. Kubak, R. A. Hartskeerl, J. J. Sejvar and D. A. Ashford (2002). "Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis." Clin Infect Dis 34(9): e40-43.

Haake, D. A. and P. N. Levett (2015). "Leptospirosis in humans." Curr Top Microbiol Immunol 387: 65-97.

Haake, D. A., M. K. Mazel, A. M. McCoy, F. Milward, G. Chao, J. Matsunaga and E. A. Wagar (1999). "Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection." Infect Immun 67(12): 6572-6582.

Haake, D. A. e Matsunaga, J. (2021). Leptospiral Immunoglobulin-Like Domain Proteins: Roles in Virulence and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11:579907. doi: 10.3389/fimmu.2020.579907

Hagan, J. E., P. Moraga, F. Costa, N. Capian, G. S. Ribeiro, E. A. Wunder, Jr., R. D. Felzemburgh, R. B. Reis, N. Nery, F. S. Santana, D. Fraga, B. L. Dos Santos, A. C. Santos, A. Queiroz, W. Tassinari, M. S. Carvalho, M. G. Reis, P. J. Diggle and A. I. Ko (2016). "Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil." PLoS Negl Trop Dis 10(1): e0004275.

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.

Hartwig, D. D., K. L. Bacelo, P. D. Oliveira, T. L. Oliveira, F. K. Seixas, M. G. Amaral, C. P. Hartleben, A. J. McBride and O. A. Dellagostin (2014). "Mannosylated LigANI produced in Pichia pastoris protects hamsters against leptospirosis." Curr Microbiol 68(4): 524-530.

- Hartwig, D. D., K. M. Forster, T. L. Oliveira, M. Amaral, A. J. McBride and O. A. Dellagostin (2013). "A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis." *Clin Vaccine Immunol* 20(5): 747-752.
- Holzapfel, M., D. Bonhomme, J. Cagliero, F. Vernel-Pauillac, M. Fanton d'Andon, S. Bortolussi, L. Fiette, C. Goarant, E. A. Wunder, Jr., M. Picardeau, A. I. Ko, D. Werling, M. Matsui, I. G. Boneca and C. Werts (2020). "Escape of TLR5 Recognition by *Leptospira* spp.: A Rationale for Atypical Endoflagella." *Front Immunol* 11: 2007.
- Hornsby, R. L., D. P. Alt and J. E. Nally (2020). "Isolation and propagation of leptospires at 37 degrees C directly from the mammalian host." *Sci Rep* 10(1): 9620.
- Hu W, Imran M, Li K et al. (2020). Exoproteome from *Leptospira interrogans* and Host Cells during Infection: Leptospiral Virulence Factors and Cellular Proteins Involved in Stress and Inflammation, 29 June 2020, PREPRINT (Version 1) available at *Research Square*. doi.org/10.21203/rs.3.rs-37165/v1]
- Johnson, R. C. and V. G. Harris (1967). "Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures." *J Bacteriol* 94(1): 27-31.
- Johnson, R. C., J. Walby, R. A. Henry and N. E. Auran (1973). "Cultivation of parasitic leptospires: effect of pyruvate." *Appl Microbiol* 26(1): 118-119.
- Kędzierska-Mieszkowska S, Arent Z. AAA+ Molecular Chaperone ClpB in *Leptospira interrogans*: Its Role and Significance in Leptospiral Virulence and Pathogenesis of Leptospirosis (2020). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18):6645. doi.org/10.3390/ijms21186645
- King, A. M., T. Bartpho, R. W. Sermswan, D. M. Bulach, A. Eshghi, M. Picardeau, B. Adler and G. L. Murray (2013). "Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis but requires a small chaperone protein, lep, for stable expression." *Infect Immun* 81(8): 2768-2776.
- Ko, A. I., C. Goarant and M. Picardeau (2009). "Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen." *Nat Rev Microbiol* 7(10): 736-747.
- Koizumi, N. and H. Watanabe (2004). "Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity." *Vaccine* 22(11-12): 1545-1552.
- Kumar A, Varma V P, Sridhar K, Addullah M, Vyas P, Muhammed A T, Chang Y, Faisal S M. (2020). Deciphering the role of *Leptospira* surface protein LigA in modulating the host innate immune response. *bioRxiv*.10.12.329177. doi.org/10.1101/2020.10.12.329177
- Lata, K. S., S. Kumar, V. Vaghasia, P. Sharma, S. B. Bhairappanvar, S. Soni and J. Das (2018). "Exploring Leptospiral proteomes to identify potential candidates for vaccine design against Leptospirosis using an immunoinformatics approach." *Sci Rep* 8(1): 6935.
- Lauretti-Ferreira, F., P. L. D. Silva, N. M. Alcantara, B. F. Silva, I. Grabher, G. O. Souza, E. Nakajima, M. A. Akamatsu, S. A. Vasconcellos, P. A. E. Abreu, E. Carvalho, E. A. L. Martins, P. L. Ho and J. B. da Silva (2020). "New strategies for *Leptospira* vaccine development based on LPS removal." *PLoS One* 15(3): e0230460.
- Lessa-Aquino, C., J. C. Lindow, A. Randall, E. Wunder, J. Pablo, R. Nakajima, A. Jasinskas, J. S. Cruz, A. O. Damiao, N. Nery, G. S. Ribeiro, F. Costa, J. E. Hagan, M. G. Reis, A. I. Ko, M. A. Medeiros and P. L. Felgner (2017). "Distinct antibody responses

of patients with mild and severe leptospirosis determined by whole proteome microarray analysis." *PLoS Negl Trop Dis* 11(1): e0005349.

Levett, P. N. (2001). "Leptospirosis." *Clin Microbiol Rev* 14(2): 296-326.

Lin, M. H., Y. C. Chang, C. D. Hsiao, S. H. Huang, M. S. Wang, Y. C. Ko, C. W. Yang and Y. J. Sun (2013). "LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani." *PLoS One* 8(12): e83246.

Lin, X., G. Xiao, D. Luo, L. Kong, X. Chen, D. Sun and J. Yan (2016). "Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs." *BMC Microbiol* 16(1): 241.

Lo, M., D. M. Bulach, D. R. Powell, D. A. Haake, J. Matsunaga, M. L. Paustian, R. L. Zuerner and B. Adler (2006). "Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays." *Infect Immun* 74(10): 5848-5859.

Lo, M., S. J. Cordwell, D. M. Bulach and B. Adler (2009). "Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature." *PLoS Negl Trop Dis* 3(12): e560.

Lourdault, K., L. C. Wang, A. Vieira, J. Matsunaga, R. Melo, M. S. Lewis, D. A. Haake and M. Gomes-Solecki (2014). "Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni." *Infect Immun* 82(2): 893-902.

Loureiro, A. P., G. Martins, P. Pinto, L. Narduche, R. C. Teixeira and W. Lilenbaum (2015). "Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospires from bovine clinical samples." *Lett Appl Microbiol* 61(6): 603-606.

Marcisin, R. A., T. Bartpho, D. M. Bulach, A. Srikram, R. W. Sermswan, B. Adler and G. L. Murray (2013). "Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection." *J Med Microbiol* 62(Pt 10): 1601-1608.

Marquez, A., T. Olivieri, E. Benoit, A. Kodjo and V. Lattard (2019). "House Mice as a Real Sanitary Threat of Human and Animal Leptospirosis: Proposal for Integrated Management." *Biomed Res Int* 2019: 3794876.

Marteli A N, Genro L V, Diament D, Guasselli L. A. (2020). Análise espacial da leptospirose no Brasil. *Saúde Debate*. v. 44, N. 126, P. 805-817. doi: 10.1590/0103-1104202012616

Martins, G. and W. Lilenbaum (2017). "Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment." *Res Vet Sci* 112: 156-160.

Matsui, M., L. Roche, M. E. Soupe-Gilbert, M. Hasan, D. Monchy and C. Goarant (2017). "High level of IL-10 expression in the blood of animal models possibly relates to resistance against leptospirosis." *Cytokine* 96: 144-151.

Matsunaga, J., M. Lo, D. M. Bulach, R. L. Zuerner, B. Adler and D. A. Haake (2007). "Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition." *Infect Immun* 75(6): 2864-2874.

McBride, A. J., D. A. Athanazio, M. G. Reis and A. I. Ko (2005). "Leptospirosis." *Curr Opin Infect Dis* 18(5): 376-386.

- Monaris, D., M. E. Sbrogio-Almeida, C. C. Dib, T. A. Canhamero, G. O. Souza, S. A. Vasconcellos, L. C. Ferreira and P. A. Abreu (2015). "Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant *Leptospira interrogans* Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant." *Clin Vaccine Immunol* 22(8): 965-973.
- Murray, G. L. (2013). "The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology." *Vet Microbiol* 162(2-4): 305-314.
- Murray, G. L. (2015). "The molecular basis of leptospiral pathogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 139-185.
- Murray, G. L., T. Simawaranon, C. Kaewraemruaen, B. Adler and R. W. Sermiswan (2018). "Heterologous protection elicited by a live, attenuated, *Leptospira* vaccine." *Vet Microbiol* 223: 47-50.
- Murray, G. L., A. Srikrum, R. Henry, R. A. Hartskeerl, R. W. Sermiswan and B. Adler (2010). "Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence." *Mol Microbiol* 78(3): 701-709.
- Naing, C., S. A. Reid, S. N. Aye, N. H. Htet and S. Ambu (2019). "Risk factors for human leptospirosis following flooding: A meta-analysis of observational studies." *PLoS One* 14(5): e0217643.
- Nair, N., M. S. Guedes, C. Werts and M. Gomes-Solecki (2020). "The route of infection with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni affects the kinetics of bacterial dissemination and kidney colonization." *PLoS Negl Trop Dis* 14(1): e0007950.
- Nally, J. E., A. A. Grassmann, S. Planchon, K. Sergeant, J. Renaut, J. Seshu, A. J. McBride and M. J. Caimano (2017). "Pathogenic *Leptospirae* Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 362.
- Nascimento, A. L., A. I. Ko, E. A. Martins, C. B. Monteiro-Vitorello, P. L. Ho, D. A. Haake, S. Verjovski-Almeida, R. A. Hartskeerl, M. V. Marques, M. C. Oliveira, C. F. Menck, L. C. Leite, H. Carrer, L. L. Coutinho, W. M. Degraive, O. A. Dellagostin, H. El-Dorry, E. S. Ferro, M. I. Ferro, L. R. Furlan, M. Gamberini, E. A. Giglioti, A. Goes-Neto, G. H. Goldman, M. H. Goldman, R. Harakava, S. M. Jeronimo, I. L. Junqueira-de-Azevedo, E. T. Kimura, E. E. Kuramae, E. G. Lemos, M. V. Lemos, C. L. Marino, L. R. Nunes, O. R. C. de, G. G. Pereira, M. S. Reis, A. Schrieffer, W. J. Siqueira, P. Sommer, S. M. Tsai, A. J. Simpson, J. A. Ferro, L. E. Camargo, J. P. Kitajima, J. C. Setubal and S. M. A. Van (2004). "Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis." *J Bacteriol* 186(7): 2164-2172.
- Nazifi N, Mousavi S M, Moradi S, Jaydari A, Jahandar M H, et al. (2018). *In Silico* B Cell and T Cell Epitopes Evaluation of lipL32 and OmpL1 Proteins for Designing a Recombinant Multi-Epitope Vaccine Against Leptospirosis, *Int J Infect*. 5(2):e63255. doi:10.5812/iji.63255.
- Newcombe, J., T. A. Mendum, C. P. Ren and J. McFadden (2014). "Identification of the immunoproteome of the meningococcus by cell surface immunoprecipitation and MS." *Microbiology* 160(Pt 2): 429-438.
- Oliveira, T. L., C. Rizzi, C. E. P. da Cunha, J. Dorneles, A. C. P. Seixas Neto, M. G. Amaral, D. D. Hartwig and O. A. Dellagostin (2019). "Recombinant BCG strains

expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis." *Vaccine* 37(6): 776-782.

Oliveira, T. L., R. A. Schuch, G. R. Inda, B. C. Roloff, A. Neto, M. Amaral, O. A. Dellagostin and D. D. Hartwig (2018). "LemA and Erp Y-like recombinant proteins from *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge using AddaVax as adjuvant." *Vaccine* 36(19): 2574-2580.

Organization, W. H. (2011). Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group: 37.

Passalia, F. J., E. Carvalho, M. B. Heinemann, M. L. Vieira and A. Nascimento (2020). "The *Leptospira interrogans* LIC10774 is a multifunctional surface protein that binds calcium and interacts with host components." *Microbiol Res* 235: 126470.

Pal, Mahendra & Bulcha, Mati & Bune, Wakuma & Leptospirosis,. (2021). Leptospirosis and One Health Perspective. *American Journal of Public Health Research*. 9. 10.12691/ajphr-9-4-9. DOI:10.12691/ajphr-9-4-9

Patarakul, K., M. Lo and B. Adler (2010). "Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum." *BMC Microbiol* 10: 31.

Pappas CJ, Picardeau M. (2015). Control of gene expression in *Leptospira* spp. by transcription activator-like effectors demonstrates a potential role for LigA and LigB in *Leptospira interrogans* virulence. *Appl Environ Microbiol*, 81:7888–92. doi: 10.1128/AEM.02202-15

Pereira, M. M., M. C. Schneider, C. Munoz-Zanzi, F. Costa, J. Benschop, R. Hartskeerl, J. Martinez, M. Jancloes and E. Bertherat (2018). "A road map for leptospirosis research and health policies based on country needs in Latin America." *Rev Panam Salud Publica* 41: e131.

Phoka T, Techawiwattanaboon T, Sangjun N, Komane P, Murray G L, Sermswan R W, Adler B, Patarakul K. (2021). Identification of in vivo expressed proteins in live attenuated lipopolysaccharide mutant that mediates heterologous protection against *Leptospira* spp, *Veterinary Microbiology*, V.262, 109220, ISSN: 0378-1135. doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109220.

Picardeau, M. (2013). "Diagnosis and epidemiology of leptospirosis." *Med Mal Infect* 43(1): 1-9.

Picardeau, M. (2017). "Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?" *Nat Rev Microbiol* 15(5): 297-307.

Picardeau, M., E. Bertherat, M. Jancloes, A. N. Skouloudis, K. Durski and R. A. Hartskeerl (2014). "Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies." *Diagn Microbiol Infect Dis* 78(1): 1-8.

Picardeau, M., D. M. Bulach, C. Bouchier, R. L. Zuerner, N. Zidane, P. J. Wilson, S. Creno, E. S. Kuczek, S. Bommezzadri, J. C. Davis, A. McGrath, M. J. Johnson, C. Boursaux-Eude, T. Seemann, Z. Rouy, R. L. Coppel, J. I. Rood, A. Lajus, J. K. Davies, C. Medigue and B. Adler (2008). "Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis." *PLoS One* 3(2): e1607.

Pinto, P. S., H. Libonati and W. Lilenbaum (2017). "A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America." *Trop Anim Health Prod* 49(2): 231-238.

- Putz, E. J. and J. E. Nally (2020). "Investigating the Immunological and Biological Equilibrium of Reservoir Hosts and Pathogenic *Leptospira*: Balancing the Solution to an Acute Problem?" *Front Microbiol* 11: 2005.
- Qin, J. H., Y. Y. Sheng, Z. M. Zhang, Y. Z. Shi, P. He, B. Y. Hu, Y. Yang, S. G. Liu, G. P. Zhao and X. K. Guo (2006). "Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601." *BMC Microbiol* 6: 51.
- Ramirez-Garcia R, Florez P A, Saenz L A. (2019). Inmunologia de la leptospirosis. *Rev CES Med*. 33(3):192-200. [dx.doi.org/10.21615/cesmedicina.33.3.4](https://doi.org/10.21615/cesmedicina.33.3.4)
- Rappuoli R. (2000). Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*, Oct;3 (5):445–450. [doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)
- Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, et al. Reverse vaccinology 2.0: human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med.*, Apr 4;213(4):469–481. doi.org/10.1084/jem.20151960
- Ren, S. X., G. Fu, X. G. Jiang, R. Zeng, Y. G. Miao, H. Xu, Y. X. Zhang, H. Xiong, G. Lu, L. F. Lu, H. Q. Jiang, J. Jia, Y. F. Tu, J. X. Jiang, W. Y. Gu, Y. Q. Zhang, Z. Cai, H. H. Sheng, H. F. Yin, Y. Zhang, G. F. Zhu, M. Wan, H. L. Huang, Z. Qian, S. Y. Wang, W. Ma, Z. J. Yao, Y. Shen, B. Q. Qiang, Q. C. Xia, X. K. Guo, A. Danchin, G. I. Saint, R. L. Somerville, Y. M. Wen, M. H. Shi, Z. Chen, J. G. Xu and G. P. Zhao (2003). "Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing." *Nature* 422(6934): 888-893.
- Rodriguez, A. G., N. B. Santiesteban, Y. V. Abreu and G. M. Gonzalez (2002). "[Growth, virulence and antigenicity of *Leptospira interrogans* serovar mozdok in modified EMJH medium]." *Rev Cubana Med Trop* 54(1): 32-36.
- Rossini, A. D., A. F. Teixeira, A. Souza Filho, G. O. Souza, S. A. Vasconcellos, M. B. Heinemann, E. C. Romero and A. Nascimento (2020). "Identification of a novel protein in the genome sequences of *Leptospira interrogans* with the ability to interact with host's components." *J Microbiol Immunol Infect* 53(1): 163-175.
- Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, Cedola M, Pretre G, Drut R, et al. (2015). Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003927.
- Seixas, F. K., E. F. da Silva, D. D. Hartwig, G. M. Cerqueira, M. Amaral, M. Q. Fagundes, R. G. Dossa and O. A. Dellagostin (2007). "Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge." *Vaccine* 26(1): 88-95.
- Srikram A, Zhang K, Bartpho T, Lo M, Hoke D E, Sermswan R W, Adler B, Murray G L. (2011). Cross-protective Immunity Against Leptospirosis Elicited by a Live, Attenuated Lipopolysaccharide Mutant, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 203, Issue 6, 15 March 2011, p. 870–879. doi.org/10.1093/infdis/jiq127
- Silva, E. F., M. A. Medeiros, A. J. McBride, J. Matsunaga, G. S. Esteves, J. G. Ramos, C. S. Santos, J. Croda, A. Homma, O. A. Dellagostin, D. A. Haake, M. G. Reis and A. I. Ko (2007). "The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis." *Vaccine* 25(33): 6277-6286.
- Silva P Y O A, Midon L M, Heinemann M B, Vasconcelos D M, Barbosa A S, Isaac L. (2020). Contribution of Complement System pathways to the killing of *Leptospira*

spp., *Microbes and Infection*, v.22, 10, p. 550-557. ISSN:1286-4579.
doi.org/10.1016/j.micinf.2020.07.005.

Sondergaard, M. M., A. Tursunovic, P. Thye-Ronn, J. C. Bang and I. M. Hansen (2016). "Leptospirosis-Associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome with Lower Back Pain as an Initial Symptom." *Am J Case Rep* 17: 883-886.

Sun, A. H., X. X. Liu and J. Yan (2020). "Leptospirosis is an invasive infectious and systemic inflammatory disease." *Biomed J* 43(1): 24-31.

Tahara, H., K. Takabe, Y. Sasaki, K. Kasuga, A. Kawamoto, N. Koizumi and S. Nakamura (2018). "The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: Swimming and crawling." *Sci Adv* 4(5): eaar7975.

Thibeaux, R., G. Iraola, I. Ferres, E. Bierque, D. Girault, M. E. Soupe-Gilbert, M. Picardeau and C. Goarant (2018). "Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence." *Microb Genom*.

Torgerson, P. R., J. E. Hagan, F. Costa, J. Calcagno, M. Kane, M. S. Martinez-Silveira, M. G. Goris, C. Stein, A. I. Ko and B. Abela-Ridder (2015). "Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years." *PLoS Negl Trop Dis* 9(10): e0004122.

Validi, M., A. Karkhah, V. K. Prajapati and H. R. Nouri (2018). "Immuno-informatics based approaches to design a novel multi epitope-based vaccine for immune response reinforcement against Leptospirosis." *Mol Immunol* 104: 128-138.

Vasylieva, N., M. Andreychyn, Y. Kravchuk, C. Chervinska capital O and I. Iosyk (2017). "Changes in leptospirosis etiology in animals and humans." *Ann Agric Environ Med* 24(4): 671-675.

Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, 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.org/10.1371/journal.pntd.0007270

Vieira, A. S., P. S. Pinto and W. Lilenbaum (2017). "A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America." *Trop Anim Health Prod*.

Vieira, M. L., H. Herwald and A. Nascimento (2020). "The interplay between host haemostatic systems and *Leptospira* spp. infections." *Crit Rev Microbiol* 46(2): 121-135.

Vieira, M. L., A. F. Teixeira, G. Pidde, A. T. C. Ching, D. V. Tambourgi, A. Nascimento and H. Herwald (2018). "*Leptospira interrogans* outer membrane protein LipL21 is a potent inhibitor of neutrophil myeloperoxidase." *Virulence* 9(1): 414-425.

Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang XF, Zhang C, et al. (2012) Leptospiral Hemolysins Induce Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptor 2-and 4-Mediated JNK and NF-kB Signaling Pathways. *PLoS ONE* 7(8): e42266.
doi:10.1371/journal.pone.0042266

Wunder, E. A., H. Adhikarla, C. Hamond, K. A. Owers Bonner, L. Liang, C. B. Rodrigues, V. Bisht, J. E. Nally, D. P. Alt, M. G. Reis, P. J. Diggle, P. L. Felgner and A. Ko (2021). "A live attenuated-vaccine model confers cross-protective immunity against different species of the *Leptospira* genus." *Elife* 10.

Xia, B., L. Sun, X. Fan, H. Xiao, Y. Zhu, J. Qin, C. Cai, W. Zhao, Y. F. Chang, Y. Zhang, X. Guo and P. He (2017). "A new model of self-resolving leptospirosis in mice infected

with a strain of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis harboring LPS signaling only through TLR4." *Emerg Microbes Infect* 6(5): e36.

Xu, J., N. Koizumi and S. Nakamura (2020). "Crawling Motility on the Host Tissue Surfaces Is Associated With the Pathogenicity of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*." *Front Microbiol* 11: 1886.

Yan, W., S. M. Faisal, S. P. McDonough, T. J. Divers, S. C. Barr, C. F. Chang, M. J. Pan and Y. F. Chang (2009). "Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model." *Microbes Infect* 11(2): 230-237.

Yang, C.-W., M.-S. Wu and M.-J. Pan (2001). "Leptospirosis renal disease." *Nephrology Dialysis Transplantation* 16(Supplement 5): 73-77.

Zeng, L., D. Wang, N. Hu, Q. Zhu, K. Chen, K. Dong, Y. Zhang, Y. Yao, X. Guo, Y. F. Chang and Y. Zhu (2017). "A Novel Pan-Genome Reverse Vaccinology Approach Employing a Negative-Selection Strategy for Screening Surface-Exposed Antigens against leptospirosis." *Front Microbiol* 8: 396.

Zhang, L., C. Zhang, D. M. Ojcius, D. Sun, J. Zhao, X. Lin, L. Li, L. Li and J. Yan (2012). "The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals." *Mol Microbiol* 83(5): 1006-1023.

Zhukova, A., L. G. Fernandes, P. Hugon, C. J. Pappas, O. Sismeiro, J. Y. Coppee, C. Becavin, C. Malabat, A. Eshghi, J. J. Zhang, F. X. Yang and M. Picardeau (2017). "Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*." *Front Cell Infect Microbiol* 7: 10.

Zuerner, R. L. (2005). "Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*." *Curr Protoc Microbiol* Chapter 12: Unit 12E.11.

Zuerner, R. L. (2015). "Host response to leptospira infection." *Curr Top Microbiol Immunol* 387: 223-250.

7. Anexos

7.1 Anexo A – Depósito de Patente das proteínas recombinantes identificadas por Vacinologia reversa e Estrutural e Imunoproteômica



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 022933 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: cit@ufpel.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SEQUÊNCIAS MODIFICADAS DE DNA, PROTEÍNAS CODIFICADAS POR ESTAS SEQUÊNCIAS E SEU USO COMO VACINA E DIAGNÓSTICO.

Resumo: Esta invenção refere-se às sequências de DNA modificadas e as proteínas codificadas por estas. Mais especificamente, a invenção refere-se ao uso destas moléculas como vacina recombinante contra leptospirose. Estas sequências poderão ser utilizadas na prevenção ou diagnóstico da leptospirose em humanos e animais.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN

CPF: 42251850015

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua São José do Norte, 554

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96090-690

País: BRASIL

Telefone: (53) 999 888392

Fax:

Email: odirad@terra.com.br

Inventor 2 de 10

Nome: NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA

CPF: 02705102060

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Henrique Dias, 790 bloco 3 apto 311

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96040-720

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 212399

Fax:

Email: oliveira_natasha@hotmail.com

Inventor 3 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

Nome: MARA ANDRADE COLARES MAIA

CPF: 04953603338

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 1643

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: BRASIL

Telefone: (53) 998 045006

Fax:

Email: maracamaia@hotmail.com

Inventor 4 de 10

Nome: ANDRÉ ALEX GRASSMANN

CPF: 05002794971

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Duque de Caxias, 255. Bloco F Apto 101

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96030-001

País: BRASIL

Telefone: (53) 327 57587

Fax:

Email: grassmann.aa@gmail.com

Inventor 5 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

Nome: ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE

CPF: 83888705053

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. J K de Oliveria, 3527, Ap 604, bairro Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96020-045

País: BRASIL

Telefone: (53) 999 666539

Fax:

Email: alan.mcbride@ufpel.edu.br

Inventor 6 de 10

Nome: SÉRGIO JORGE

CPF: 14043162804

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Prefeito Ary Alcantara, n° 1000, casa 167, bairro Três Vendas

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96060-294

País: BRASIL

Telefone: (53) 327 57587

Fax:

Email: sergiojorgevet@hotmail.com

Inventor 7 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

Nome: TIFFANY THUROW BUNDE

CPF: 04251917022

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua São Paulo, 343, bairro Três Vendas

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96065-550

País: BRASIL

Telefone: (53) 327 57587

Fax:

Email: tiffany_bia@hotmail.com

Inventor 8 de 10

Nome: ANA CAROLINA KURZ PEDRA

CPF: 04319298071

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Av. Imperador Dom Pedro I, 3677

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96030-350

País: BRASIL

Telefone: (53) 327 57587

Fax:

Email: caarolpedra@hotmail.com

Inventor 9 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

Nome: LIANA NUNES BARBOSA

CPF: 02203647027

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Cipriano Mascarenhas, número 324, bairro Fragata

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96050-500

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 438098

Fax:

Email: liana.tlo@gmail.com

Inventor 10 de 10

Nome: AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO

CPF: 01110710038

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Olegário Mariano, 231 casa 85

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96065-390

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 115897

Fax:

Email: amiltonseixas@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/10/2019 às 17:10, Petição 870190111344

7.2 Anexo B –

Parecer do Comitê de Ética e Experimentação Animal para o projeto de Microbiologia básica, gerando o manuscrito 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PARECER Nº
PROCESSO Nº

129/2018/CEEA/REITORIA
23110.026878/2018-61

Certificado

Certificamos que a solicitação de **adendo** à proposta intitulada "**Microbiologia básica de *Leptospira* spp.: ferramenta para otimização dos estudos em *Leptospirose***" processo número 23110.026878/2018-99 (CEEA 4337-2015), de responsabilidade de Alan John Alexander McBride - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Prorrogado até 07/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mesocricetus auratus</i> /Capa dourada
Nº de animais	Acréscimo de 288
Idade	3-4 semanas

Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro CEEA 4337-2015



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, Médico Veterinário, em 14/12/2018, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0390226** e o código CRC **0277D953**.

Referência: Processo nº 23110.026878/2018-61

SEI nº 0390226

7.3 Anexo C – Parecer do Comitê de Ética e Experimentação Animal para o projeto de Vacinologia reversa e Estrutural e imunoproteômica, gerando o manuscrito 2 e 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PARECER Nº
PROCESSO Nº128/2018/CEEA/REITORIA
23110.059050/2018-99

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Identificação de antígenos candidatos de *Leptospira* spp. para vacina e diagnóstico baseado em vacinologia reversa e estrutural e imunoproteômica"** processo número 23110.059050/2018-99, de responsabilidade de Alan John Alexander McBride - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino	
Vigência da autorização	01/01/2019 a 31/12/2022	
Espécie/linhagem/raça	<i>Mesocricetus auratus</i> /Copa dourada	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	810	80
Idade	3-4 semanas	4-6 semanas

Sexo	Machos e Fêmeas	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel	

Código para cadastro CEEA 59050-2018

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 14/12/2018, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_uniao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0390177** e o código CRC **FEADC0C7**.

Referência: Processo nº 23110.059050/2018-99

SEI nº 0390177