



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *Leptospira* E  
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL  
MUNICIPIO DE CULIACÁN SINALOA”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**MC. ROGELIO LAGARDE GUERRERO**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTOR(ES)

**Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado**

**Dra. María de Jesús Navarro Arias**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A **MAYO** DE 2024.



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## **DEDICATORIA**

A mis padres Zenaida y Rogelio por su amor, paciencia, dedicación y esfuerzo en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido y seguirá siendo un orgullo y un privilegio ser su hijo.

A mis hermanos Marisol y Manuel por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mi sobrino Sergio por ser el motor que me impulsa a superarme día a día, y por dar las alegrías en los momentos difíciles.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos, por apoyarme cuando más los necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, de verdad mil gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la FCQB por la formación como Lic. Químico Farmacéutico Biólogo.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y maestría en sus instalaciones.

Al programa de posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme ser parte de él y brindarme las herramientas necesarias para desempeñar mi profesión.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada

Al Dr. José Guadalupe Rendon Maldonado por permitirme desarrollarme como profesional, por felicitarme las instalaciones del laboratorio, brindarme la confianza de incursionar en el área de investigación, por sus asesorías y buenos consejos para que este trabajo se desarrollara con éxito.

Al la Dra. María de Jesús Navarro Arias por ser mi directora de tesis y brindarme sus consejos y asesorías los cuales fueron parte clave y fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Sergio por haberme apoyado en la realización de algunos ensayos y por sus consejos útiles durante la realización de este trabajo.

A Samantha por ser mi amiga incondicional, la que me acompañó a lo largo de mi formación académica, soportar mis cambios de humor, así como ser ya un miembro mas de la familia.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE CUADROS .....	XIII
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Leptospirosis .....	3
IV. ANTECEDENTES .....	4
4.1 Etiología de la leptospirosis .....	4
4.2 Fisiopatología.....	4
4.3 Manifestaciones clínicas .....	5
4.4 Inmunopatogenesis .....	6
4.5 Tratamiento .....	11
4.6 <i>Leptospira</i> .....	11
4.7 Epidemiología de la leptospirosis .....	12
4.7.1 Epidemiología mundial.....	12
4.7.2 Epidemiología en México .....	13
4.8 Diagnóstico .....	18
4.8.1 Diagnóstico diferencial.....	18
4.8.2 Cultivo de la bacteria .....	18
4.8.3 Pruebas serológicas .....	19
4.8.4 Diagnóstico molecular.....	19
4.9 Genes de <i>Leptospira</i> .....	20
4.10 Identificación de <i>Leptospira</i> .....	20
4.11 Patogenicidad de <i>Leptospira</i> .....	21
V. JUSTIFICACIÓN .....	22

VI.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
VII.	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
	7.1. <b>Objetivo general</b> .....	24
	7.2. <b>Objetivos específicos</b> .....	24
VIII.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
	8.1. <b>Tipo de estudio</b> .....	25
	8.2 <b>Criterios de inclusión</b> .....	25
	8.3 <b>Criterios de eliminación</b> .....	25
	8.4 <b>Tratamiento de las muestras</b> .....	26
	8.5 <b>Extracción de material genético</b> .....	26
	8.6 <b>Integridad del material genético</b> .....	26
	8.7 <b>Identificación de <i>Leptospira</i> por PCR en tiempo real</b> .....	27
	8.8 <b>Análisis de potencial inmunogénico de proteínas de membrana de <i>leptospira</i>.</b> 27	
	8.8.1 <b>Búsqueda y selección de secuencias</b> .....	27
	8.8.2 <b>Potencial inmunogénico de las proteínas de membrana de <i>Leptospira</i>.</b> .....	28
	8.8.3 <b>Predicción de epítomos en línea de linfocitos T MHC-1</b> .....	28
	8.8.4 <b>Predicción de epítomos en line de linfocitos T MHC-II</b> .....	28
	8.8.5 <b>Predicción de epítomos en línea de linfocitos B</b> .....	29
	8.8.6 <b>Predicción de alergenicidad y toxicidad</b> .....	29
	8.8.7 <b>Análisis de mimetismo molecular y cobertura en la población</b> .....	29
IX.	<b>RESULTADOS</b> .....	31
	9.1 <b>Descripción de la población</b> .....	31
	9.2 <b>Extracción de material genético</b> .....	37
	9.3 <b>amplificación del gen <math>\beta</math>-actina</b> .....	37
	9.4 <b>Identificación de <i>Leptospira</i> por PCR en tiempo real</b> .....	40
	9.5. <b>Análisis de las secuencias de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1</b> ..	46
	9.6. <b>Potencial inmunogénico de las proteínas <i>LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1</i> de <i>Leptospira</i>.</b> .....	48

9.6.1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas <i>LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1</i> de <i>Leptospira</i> .....	48
9.7 Predicción de epítomos en línea de linfocitos T por HLApred MHC-1. ....	52
9.8 Predicción de epítomos en línea de linfocitos T por HLApred MHC-II. ....	59
9.9 Predicción de epítomos en línea de linfocitos B .....	62
9.10 Predicción de alergenicidad y toxicidad .....	64
9.11 Análisis de mimetismo molecular y cobertura en la población .....	64
X.    DISCUSIÓN.....	75
10.1 Descripción de la población .....	75
10.2 Extracción de material genético .....	75
10.3 Amplificación del gen $\beta$ -actina .....	75
10.4 Identificación de <i>Leptospira</i> por PCR .....	76
10.5 Análisis de las secuencias de las proteínas <i>LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1</i> .	78
10.6. Potencial inmunogénico de las proteínas <i>LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1</i> de <i>Leptospira</i> .....	78
10.6.1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas <i>LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1</i> de <i>Leptospira</i> .....	78
XI.    CONCLUSIONES.....	80
11.1. Conclusión general .....	80
11.2. Conclusiones específicas .....	80
XII.    PERSPECTIVAS DEL PROYECTO .....	81
XIII.    BIBLIOGRAFÍA.....	82
XIV.    ANEXOS .....	93
14.1 Documentos complementarios.....	93
14.2 Producción científica.....	158
14.3 Participación en congresos .....	170
14.3 formación de recursos .....	173
14.3.1 Tesis de maestría dirigidas.....	173
14.3.2 Tesis de licenciatura dirigida .....	175

<b>XV.</b>	<b>SIGLAS Y ABREVIACIONES .....</b>	<b>177</b>
------------	-------------------------------------	------------



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Ciclo de transmisión de leptospirosis.....	8
2	Fases de la leptospirosis. ....	9
3	Inmunopatogénesis de la leptospirosis.....	10
4	Epidemiología mundial de leptospirosis.....	15
5	Epidemiología en México de leptospirosis.....	16
6	Porcentaje de muestras obtenidas.....	32
7	Distribución de la población humana por genero.....	33
8	Distribución de la población humana por grupos etarios.....	34
9	Distribución de la población canina por genero.....	35
10	Distribución de la población canina por edad.....	36
11	Gel representativo de la extracción de ADN.....	38
12	Gel representativo de la amplificación del fragmento del gen $\beta$ -actina.....	39
13	Positividad de las muestras febriles analizadas.....	41
14	Positividad de las muestras no febriles analizadas.....	42
15	Positividad de las muestras caninas analizadas.....	43
16	Distribución porcentual de casos de leptospirosis humana por género y rango de edad.....	44
17	Distribución porcentual de casos de leptospirosis canina por género y rango de edad.....	45

18	Secuencia aminoacídica de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> .....	47
19	Potencial inmunogénico de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> .....	50
20	Propiedades fisicoquímicas de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> .....	51
21	Cobertura de epítomos de LipL21 en alelos MHC clase I.....	71
22	Cobertura de epítomos de OmpL1 en alelos MHC clase I.....	72
23	Cobertura de epítomos de LipL21 en alelos MHC clase II.....	73
24	Cobertura de epítomos de OmpL1 en alelos MHC clase II.....	74

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Clasificación de <i>Leptospira</i> según su patogenicidad.....	7
2 Casos de <i>Leptospira</i> en México por estados, periodo 2000-2021.....	17
3 Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> y su frecuencia en alelos del MHC clase I.....	53
4 Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> y su frecuencia en alelos del MHC clase II.....	60
5 Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> para células B.....	63
6 Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> para MHC clase I no considerados tóxicos ni como alérgenos.....	65
7 Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> para MHC clase II no considerados tóxicos ni como alérgenos.....	66
8 Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de <i>Leptospira</i> para células B no considerados tóxicos ni como alérgenos.....	66

## I. RESUMEN

**Introducción.** La leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana común que con una tasa de mortalidad elevada. sus síntomas inespecíficos y su diagnóstico limitado sugieren una subestimación de la incidencia, prevalencia y mortalidad. Se han reportado proteínas como *LipL21*, *LipL32*, *LipL42*, *OmpL1*, implicadas en la patogénesis de *Leptospira* con potencial inmunogénico. **Objetivo.** Determinar la frecuencia de *Leptospira* en muestras con cuadro febril de etiología desconocida, así como analizar epítomos inmunogénicos en las proteínas de membrana. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio transversal, observacional, comparativo y descriptivo en muestras de sangre de perros y humanos en Culiacán para detectar *Leptospira*, además se analizaron proteínas de membrana para detectar posibles efectos inmunogénicos. **Resultados.** Se analizaron 218 muestras de seres humanos donde se encontró un 10.09 % de positividad en este grupo. Respecto al grupo de perros, se analizaron 144 muestras encontrando un 9% de positividad. El análisis *in silico* del genoma de *Leptospira* reflejó que existen al menos 40 epítomos de LipL21 y 49 de OmpL1 para el MHC de clase I, así como 9 epítomos de LipL21 y 6 de OmpL1 para el MHC de clase II como candidatos para el desarrollo de vacunas. **Conclusiones.** Este es el primer estudio en Sinaloa donde se busca genoma bacteriano en muestras con cuadro febril de etiología desconocida. El análisis *in silico* de los genes y de las proteínas de membrana de *Leptospira* permite establece las bases para prevenir y controlar la enfermedad, así como el desarrollo de vacunas.

(**Palabras clave:** *Leptospira*, leptospirosis, Identificación molecular, Proteínas de membrana.)

## II. ABSTRACT

**Introduction.** Leptospirosis is a common bacterial zoonotic disease with a high mortality rate. Its nonspecific symptoms and limited diagnosis suggest an underestimation of incidence, prevalence, and mortality. Proteins such as LipL21, LipL32, LipL42, OmpL1 have been reported to be involved in the pathogenesis of *Leptospira* with immunogenic potential. **Objective.** To determine the frequency of *Leptospira* in samples with febrile illnesses of unknown etiology, as well as to analyze immunogenic epitopes in membrane proteins. **Materials and methods.** A cross-sectional, observational, comparative, and descriptive study was carried out on blood samples from dogs and humans in Culiacan to detect leptospira. In addition, membrane proteins were analyzed to detect possible immunogenic effects. **Results.** A total of 218 samples from humans were analyzed, and 10.09% positivity was found in this group. Regarding the group of dogs, 144 samples were analyzed, finding 9% positivity. In silico analysis of the *Leptospira* genome showed that there are at least 40 LipL21 and 49 OmpL1 epitopes for MHC class I, as well as 9 LipL21 and 6 OmpL1 epitopes for MHC class II, as candidates for vaccine development. **Conclusions.** This is the first study in Sinaloa where the bacterial genome is searched in samples with febrile illnesses of unknown etiology. The in silico analysis of genes and membrane proteins in *Leptospira* allows for establishing the basis for preventing and controlling the disease, as well as the development of vaccines.

(**Keywords:** *Leptospira*, Leptospirosis, Molecular identification, Membrane proteins.)

### III. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Leptospirosis

La leptospirosis es la zoonosis bacteriana de mayor importancia, ampliamente distribuida alrededor del mundo tanto en seres humanos como en otras especies de animales (López Robles et al., 2021). Actualmente, se considera una enfermedad emergente causante de epidemias internacionalmente, es subestimada por entidades de salud pública, especialmente en los países en desarrollo, gracias a que las manifestaciones clínicas en las primeras etapas de la infección son compartidas con otras infecciones febriles como influenza, dengue, rickettsiosis, malaria, salmonelosis, entre otras (Miraglia et al., 2013; Moreno & Agudelo-Flórez, 2010; Riazi et al., 2014).

La enfermedad se adquiere principalmente por la interacción con la bacteria en agua y alimentos contaminados con orina de hospederos infectados, al ingresar en el organismo la *Leptospira* rápidamente se disemina a través de la circulación sanguínea alojándose preferentemente en hígado y riñones (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2023). Generalmente la infección cursa de forma asintomática; sin embargo, existe una forma severa conocida como enfermedad de Weil, caracterizada por ictericia, hipotensión, hemorragias, lesión pulmonar aguda y falla multiorgánica (Petakh et al., 2022). La lesión e insuficiencia renal aguda ocurren en el 87% de los pacientes pudiéndose presentar un aumento de bilirrubina en sangre (ictericia), el sangrado puede variar desde petequias hasta hemorragias pulmonares (leptospirosis severa con hemorrágica pulmonar o LSHP) (Kozyk et al., 2022). La leptospirosis severa con LSHP puede alcanzar una mortalidad de hasta un 70% de los casos (Romero-Vivas & Falconar, 2016; Vieira et al., 2018).

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1 Etiología de la leptospirosis

Se han identificado 15 especies del género *Leptospira* asociados con la leptospirosis humana las cuales se clasifican como patógenas (*Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. mayottensis*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi*, y *L. alstonii*), patógenas intermedias o patogenicidad poco clara (*L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. licerasiae*, *L. wolffii*) pero también existen otras especies saprofitas como (*L. biflexa*, *L. idonii*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. vanthielli*, *L. wolbachii*, *L. yanagawae*) (Cuadro 1) (Ballados-González et al., 2018). La leptospirosis puede ser causa de muerte si no es tratada adecuadamente (Taylor et al., 2015).

### 4.2 Fisiopatología

*Leptospira* ingresa al ser humano gracias a su movilidad, penetra a través de lesiones de piel o de membranas mucosas de ojos, nariz o garganta al estar en contacto con agua y tierra contaminadas con orina de hospederos infectados (Figura 1) (Evangelista & Coburn, 2010). Su periodo de incubación es de 7 a 26 días con un promedio de 12 días por lo que el inicio de la enfermedad es variable y la infección puede durar meses. Se disemina rápidamente de forma sistémica alcanzando órganos y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Céspedes, 2005).

Durante la primer semana post infección *Leptospira* se encuentra en sangre y LCR pudiendo manifestarse sin complicaciones o con cuadro febril (fase leptospiremica), después de la primera semana aparecen los anticuerpos en sangre (fase de leptospiruria) y *Leptospira* alcanza órganos diana como el riñón donde es excretada por orina iniciando el ciclo de infección, en esta etapa la leptospirosis puede

complicarse presentando síntomas graves como fallas multiorgánicas (Figura 2) (Céspedes Chaves et al., 2017).

La leptospirosis puede presentar una amplia variedad de manifestaciones clínicas y la severidad depende de la cepa de *Leptospira* implicada, el tamaño del inóculo para algunas cepas, así como la edad, salud y estado inmunológico del paciente (Evangelista & Coburn, 2010).

Los mecanismos de la patogénesis de la *Leptospira* son poco conocidos; sin embargo, se han reportado algunos factores de virulencia de la bacteria que participan en la patogenia de la enfermedad incluyendo LPS, hemolisinas, proteínas de la membrana exterior y otras proteínas de superficie como moléculas de adhesión (Evangelista & Coburn, 2010; Guerrier & D'Ortenzio, 2013).

### **4.3 Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas de la infección varía ampliamente en el ser humano pudiéndose presentar desde manera asintomática que son los casos más frecuentes hasta el desarrollo de cuadros icterohemorrágicos con serias complicaciones hepático-renales los cuales pueden tener desenlaces fatales (Céspedes et al., 2007).

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes en una leptospirosis no icterica se encuentran cefalea intensa recurrente, mialgias en la región lumbar, inyección conjuntival, escalofríos y dolor abdominal (OPS., 2023). Se presentan náuseas, vómitos y un acentuado malestar general con postración. La fiebre es de carácter remitente alcanzando 40 °C o más. Se puede presentar confusión mental, tos, dolor torácico o hemoptisis y exantema petequial en el paladar. En la enfermedad grave (síndrome de Weil) se presentan complicaciones de la función hepática, renal,



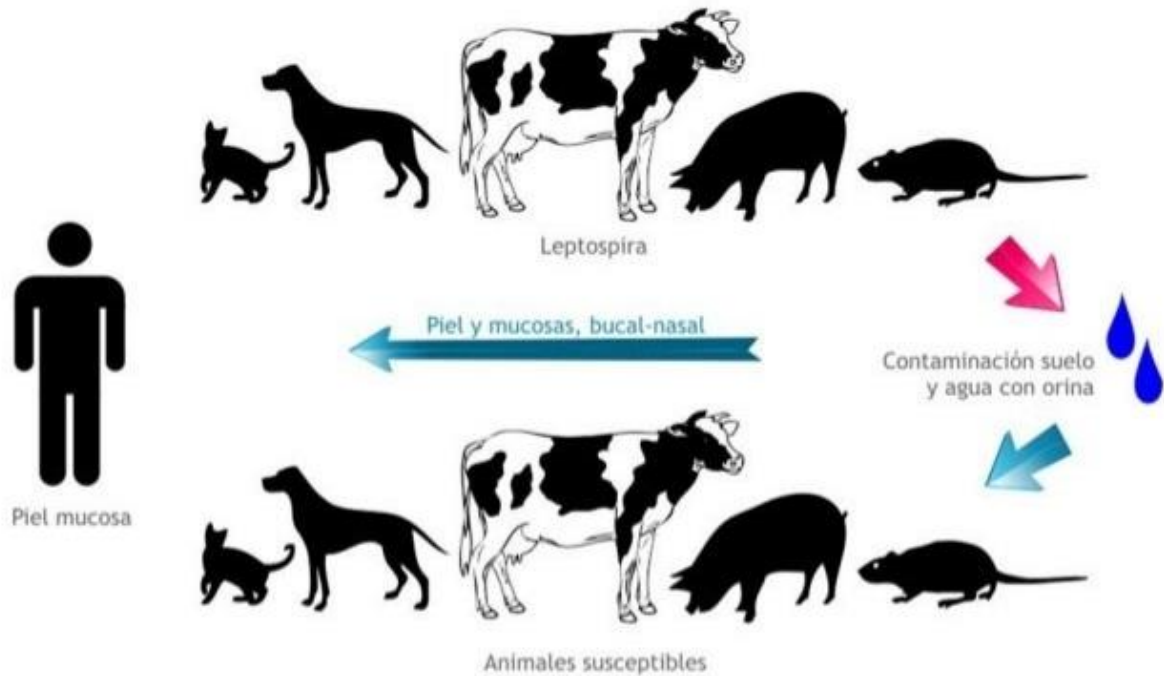
hemorragias, colapso vascular y una mortalidad de hasta el 40% de los casos de leptospirosis grave (Cespedes., 2005).

#### **4.4 Inmunopatogenesis**

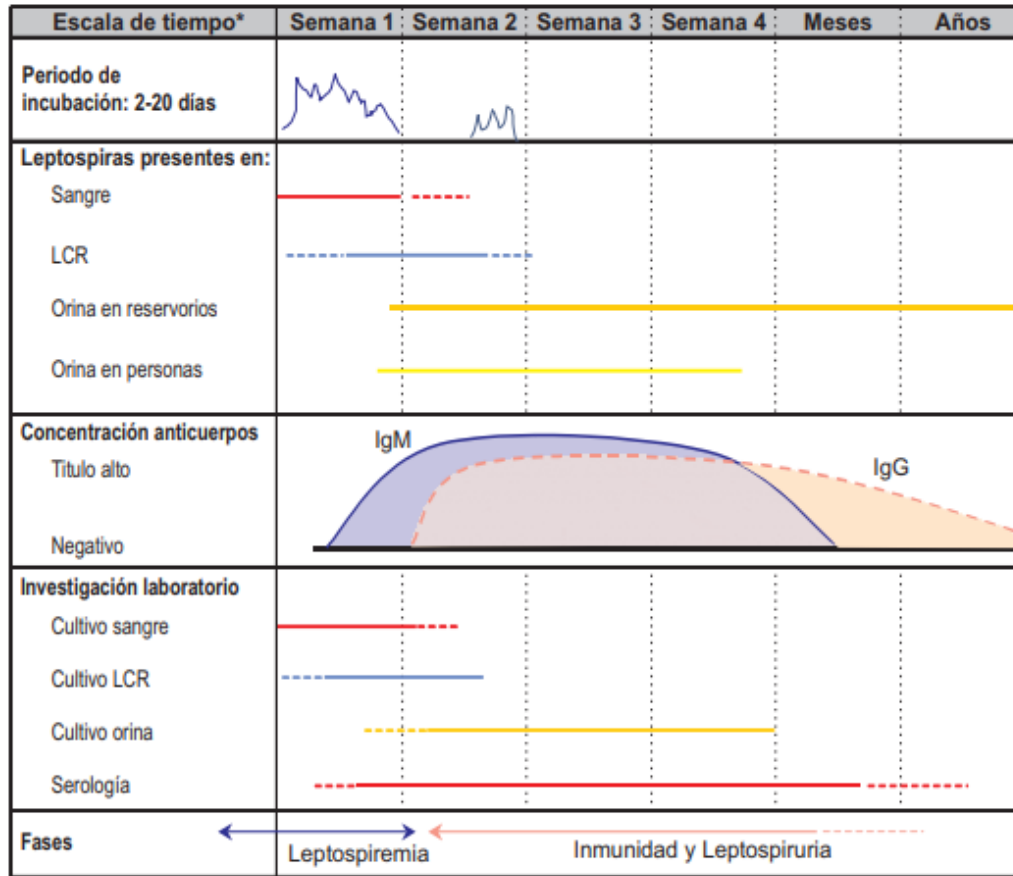
Posterior a que *Leptospira* ingresa al ser humano es transportada por la circulación sanguínea, alcanzando órganos diana, principalmente riñón e hígado manteniendo tropismo por estos órganos debido a la presencia de ácidos grasos de cadena larga los cuales son utilizados por la espiroqueta para su desarrollo (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012). En estos órganos la respuesta inmune del hospedero puede inducir la lisis de la bacteria liberando algunos antígenos como glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) o *Leptospira* utiliza algunos mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2023). La respuesta inmune del huésped elimina a las bacterias, promoviendo la liberación de endotoxinas (LPS, GLP, ligasas LIPIDA, Proteínas de Membrana: LipL32, y ácidos grasos no esterificados) las cuales son reconocidas por células del sistema inmune innato del ser humanos y ratones a través de receptores específicos. Esta respuesta está mediada por receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y NKA) que desencadenan vías de señalización que conducen a la activación de los factores de transcripción NFκB y NLRP3, lo que conduce a una mayor producción de mediadores inflamatorios (Figura 3) (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2023). Este escenario crea un microambiente proinflamatorio que puede conducir a disfunción de órganos y desencadenar la muerte (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012, 2023).

**Cuadro 1. Clasificación de *Leptospira* según su patogenicidad**

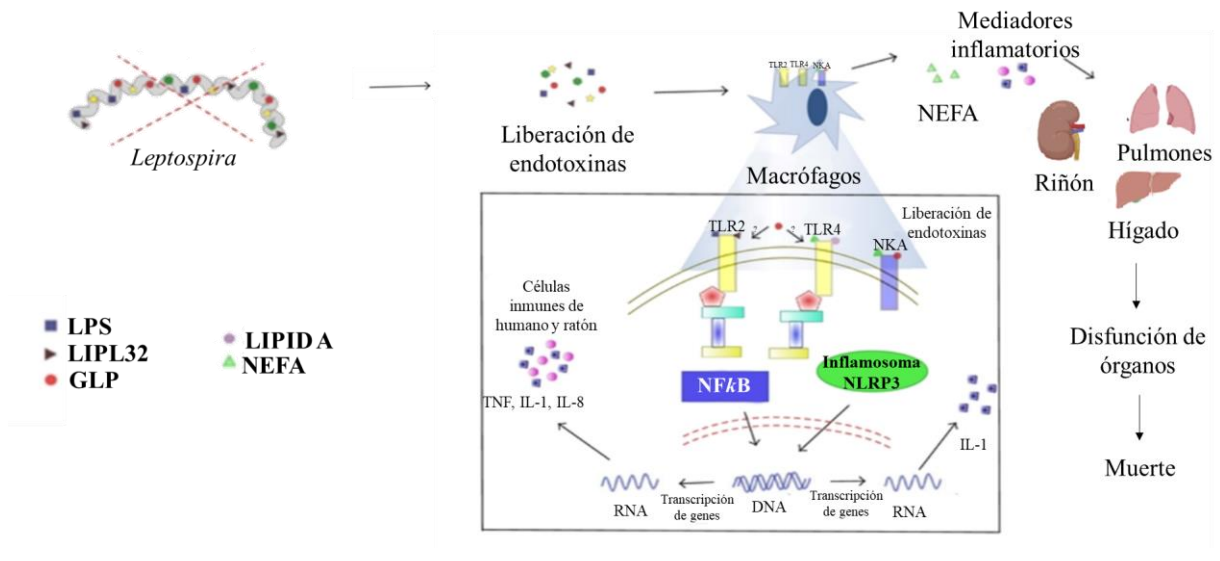
ESPECIES NO PATÓGENAS	ESPECIES DE PATOGENICIDAD MEDIA	ESPECIES PATÓGENAS
<p><i>L. biflexa</i></p> <p><i>L. idonii</i></p> <p><i>L. meyeri</i></p> <p><i>L. terpstrae</i></p> <p><i>L. vanthielli</i></p> <p><i>L. wolbachil</i></p> <p><i>L. yanawae</i></p>	<p><i>L. broomii</i></p> <p><i>L. fainei</i></p> <p><i>L. inadai</i></p> <p><i>L. licerasiae</i></p> <p><i>L. wolffii</i></p>	<p><i>L. interrogans</i></p> <p><i>L. borgpetersenii</i></p> <p><i>L. kirschneri</i></p> <p><i>L. santarosai</i></p> <p><i>L. mayottensis</i></p> <p><i>L. noguchi</i></p> <p><i>L. weili</i></p> <p><i>L. alexanderi</i></p> <p><i>L. kmety</i></p> <p><i>L. alstoni</i></p>



**Figura 1. Ciclo de transmisión de leptospirosis.** *Leptospira* ingresa al ser humano por medio de mucosas y heridas de piel al estar en contacto con suelo y agua contaminada con orina de reservorios naturales de la bacteria. De igual manera otros animales libres de infección pueden infectarse mediante este mecanismo. (<https://notichinandega.com/leptospirosis>).



**Figura 2. Fases de la leptospirosis.** La leptospirosis consta generalmente de dos fases, una primera fase denominada leptospirémica donde *Leptospira* puede ser detectada en sangre, inicia desde el primer día de infección hasta el séptimo y una segunda fase denominada leptospiruria que inicia a partir del séptimo día y se prolonga incluso a meses detectando a *Leptospira* en orina (Céspedes et al., 2007).



**Figura 3. Immunopatogénesis de la leptospirosis.** La respuesta inmune del hospedero induce la lisis de la bacteria liberando algunos antígenos como LPS, LIPL32, GLP, LIPIDA, NEFA, etc. los cuales son reconocidos por células del sistema inmune como macrófagos a través de receptores tipo *Toll* (TLR2, TLR4) desencadenan vías de señalización que conducen a la activación de los factores de transcripción (NFκB y NLRP3), lo que conduce a una mayor producción de mediadores proinflamatorios (Gonalves-De-Albuquerque et al., 2012)

## 4.5 Tratamiento

El tratamiento para la leptospirosis se basa en el uso de antibióticos principalmente penicilina G entre otros (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Aun cuando se ha demostrado que la terapia temprana con el antibiótico reduce el tiempo de infección y la tasa de mortalidad también se ha observado que en pacientes con LSHP no se reduce la mortalidad (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

La penicilina G es un antibiótico betalactámico que tiene principalmente propiedades bactericidas que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana (Suárez & Gudiol, 2009). Se administra mediante inyección intravenosa o intramuscular, ya sea de forma continua o intermitente, su administración por vía oral no es recomendada ya que el ácido del estómago la destruye fácilmente (Suárez & Gudiol, 2009).

## 4.6 *Leptospira*

El género *Leptospira* y los géneros *Leptonema* y *Turnerella* pertenecen a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales*, clase *Spirochaetia* y familia *Spirochaetes* (San Martín et al., 2023). El género *Leptospira*, derivado de las palabras griegas *Leptos* (delgado) y la palabra latina *spira* (espiral), contiene bacterias móviles que se asemejan a sacacorchos con forma de signo de interrogación; Tienen entre 6 y 20  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Son bacterias aeróbicas obligadas que crecen de forma óptima a una temperatura de 28-30 °C y un pH de 7,2-7,6 (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

El genoma de *Leptospira* se compone de dos cromosomas circulares, uno grande (cromosoma I) y otro pequeño (cromosoma II), que tienen una longitud de aproximadamente 3500-4300 Kb y 300-350 Kb, respectivamente (Jorge et al., 2018).

Además, las especies de saprofitas tienen un tercer replicón circular llamado p74, que ha sido relacionado con su supervivencia en el medio ambiente (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

#### **4.7 Epidemiología de la leptospirosis**

*Leptospira* infecta un amplio número de especies animales, particularmente mamíferos y algunos vertebrados de sangre fría inclusive al humano (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Los reservorios definitivos de *Leptospira* son animales con infección crónica en los túbulos renales proximales donde causa poco daño e inclusive permanecen asintomáticos. Se han identificado algunos animales como reservorios como: ratas (de las serovariedades Icterohaemorrhagiae y Copenhageni), ratones de (Arborea, Ballum y bin), ganado vacuno de (Pomona, Hardjo y Grippytyphosa), cerdos de (Pomona, Tarassovi y Bratislava), perros de (Canicola) y marsupiales de Grippytyphosa (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

Los brotes epidemiológicos de la leptospirosis se incrementan principalmente después de fuertes lluvias debido a la fácil dispersión por agua, ocurre en todo el mundo y se está convirtiendo en un problema de salud pública en países tropicales y subtropicales, donde afecta mayormente a las poblaciones vulnerables (OPS, 2017).

##### **4.7.1 Epidemiología mundial**

La epidemiología de la leptospirosis ha sido subestimada a nivel mundial, debido a la falta de especificidad de técnicas de laboratorio actualmente implementadas; sin embargo, el *Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group* (LERG) coordinado por la OMS estima la frecuencia a nivel mundial. Según estudios previos *Leptospira*

causa a nivel mundial un millón de casos severos anualmente con una mortalidad de seiscientos mil infectados (OPS, 2017).

El Sistema de control de eventos (EMS) es un componente del Reglamento Sanitario Internacional (RSI) que entró en vigor en el 2007, en el cual se registra los incidentes considerados potencialmente emergencias internacionales de salud pública, considerando a la leptospirosis uno de los 10 principales sucesos infecciosos (OPS., 2017

La leptospirosis humana tiene una amplia distribución geográfica, con el sudeste asiático, Oceanía, el Subcontinente indio, el Caribe y América Latina considerada como altamente endémica de la enfermedad (Figura 4) (Evangelista & Coburn, 2010). En estas regiones, los cambios climáticos y las inundaciones, los niveles de saneamiento deficientes, y altas poblaciones de hospedadores de mantenimiento como las ratas, son determinantes importantes de la infección. Aunque en las últimas décadas se han visto cambios en el patrón epidemiológico (Evangelista & Coburn, 2010). En regiones donde la enfermedad no era común, como Canadá, EE. UU. y Europa, han ocurrido brotes esporádicos asociados con actividades deportivas acuáticas en lugares contaminados con *Leptospira* patógenas o a cambios en el patrón climático (Evangelista & Coburn, 2010).

#### **4.7.2 Epidemiología en México**

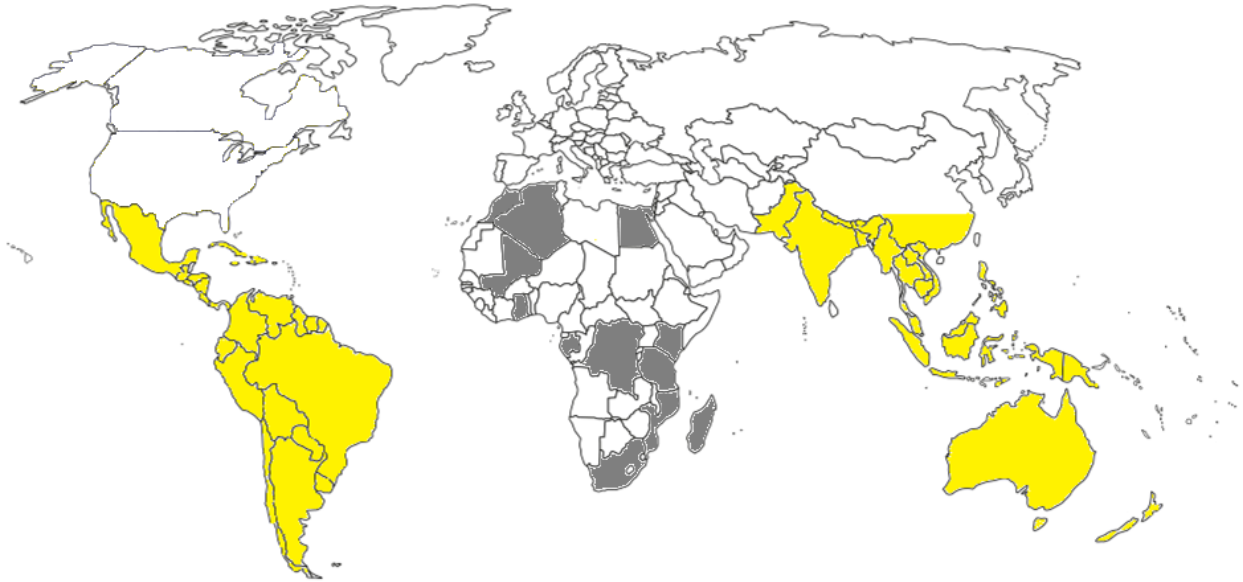
En Mérida, Yucatán, la leptospirosis se notificó por primera vez en personas diagnosticadas inicialmente de fiebre amarilla.; sin embargo, el aislamiento de las bacterias demostró que se trataba de leptospirosis (Sánchez-Montes et al., 2015). A



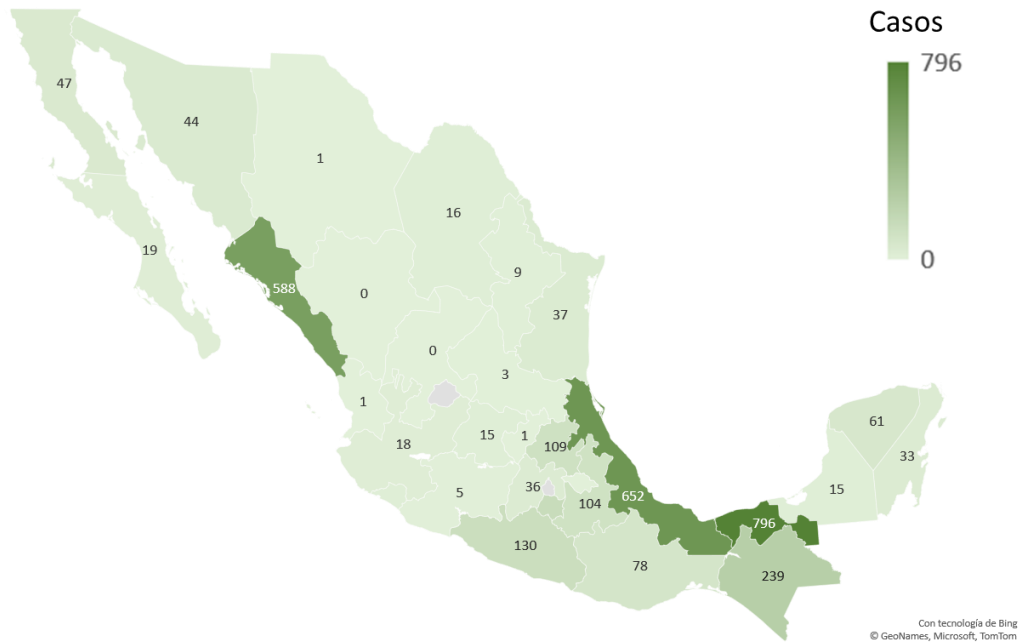
partir de entonces, varios autores reportaron la prevalencia de la enfermedad principalmente en la parte sureste del país; sin embargo, la prevalencia nacional aún se desconoce (Sánchez-Montes., 2015).

Durante el periodo de 2000-2010 se registraron 1,547 casos confirmados en 27 de los 32 estados en México. El estado reportado con número más alto de casos fue Veracruz con 377, seguido por Tabasco 260, Sinaloa 129, Hidalgo 116 y Oaxaca 97. Los estados con menor número de casos fueron Nayarit y Tlaxcala con 3, Michoacán 2 y Aguascalientes 1. Otros estados como Baja California, Durango, Guanajuato, Querétaro y Zacatecas no reportaron casos (Sánchez-Montes et al., 2015).

De acuerdo con los reportes publicados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en México, en el año 2016 ocurrieron un total de 269 casos siendo Sinaloa el estado con mayor incidencia, manteniéndose en los primeros tres lugares hasta la semana 22 del presente año junto con Tabasco y Veracruz (Figura 5), (Cuadro 2) (SINAVE., 2017).



**Figura 4. Epidemiología mundial de leptospirosis.** En amarillo se muestran los países considerados como endémicos, donde se ha reportado un número elevado de casos de leptospirosis por parte de entidades de salud incluyendo a México; y en gris los países donde a pesar de no haber reportes por entidades de salud se han reportado casos por grupos de investigación. Adaptado de (Evangelista & Coburn, 2010).



**Figura 5. Epidemiología en México de leptospirosis.** En el mapa se muestran los estados con reportes de leptospirosis en un periodo del 2000 al 2021, mostrando con color más intenso los estados con mayor número de reportes, encontrando en primer lugar a Tabasco con 796 casos, seguido de Veracruz con 652 y en tercer lugar Sinaloa con 588 (“DGE,” 2019).

**Cuadro 2. Casos de *Leptospira* en México por estados, periodo 2000-2021**

Estado	CASOS
Aguas calientes	1
Baja california	47
Baja california sur	19
Campeche	15
Chiapas	239
Chihuahua	1
Coahuila	16
Colima	16
Durango	0
Guanajuato	15
Guerrero	130
Hidalgo	109
Jalisco	18
Mexico	36
Michoacan	5
Morelos	146
Nayarit	1
Nuevo leon	9
Oaxaca	78
Puebla	104
Queretaro	1
Quintana roo	33
San luis potosi	3
Sinaloa	588
Sonora	44
Tabasco	796
Tamaulipas	37
Tlaxcala	2
Veracruz	652
Yucatan	61
Zacatecas	0
Total	3222

## **4.8 Diagnóstico**

### **4.8.1 Diagnóstico diferencial**

El Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis establece que las siguientes afecciones deben investigarse junto con la vigilancia de la leptospirosis: la gripe, el dengue, el dengue hemorrágico, las infecciones por hantavirus, como el síndrome pulmonar por hantavirus u otros síndromes de dificultad respiratoria, la rickettsiosis, la borreliosis, la meningitis aséptica, la fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas, y la hepatitis vírica, porque comparten síntomas durante la fase inicial de la infección por *Leptospira* y, por lo tanto, el diagnóstico clínico es inadecuado (OMS, 2017).

### **4.8.2 Cultivo de la bacteria**

Durante los 10 primeros días de la infección, la regla de oro es aislar el organismo de la sangre, el líquido cefalorraquídeo o los fluidos corporales (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Alternativamente, durante la fase inmunitaria de la infección, el organismo puede aislarse de la orina (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Durante esta fase, el organismo crece mejor a temperaturas entre 28 y 30°C en un medio suplementado con ácidos grasos de cadena larga, sales de calcio y vitaminas B1 y B12 (Evangelista & Coburn, 2010). Por el momento, las únicas fuentes de energía y carbono conocidas de *Leptospira* son los ácidos grasos de cadena larga. El medio McCullough-Johnson-Harris es el más utilizado (EMJH). (Evangelista & Coburn, 2010; Romero-Vivas & Falconar, 2016). La utilidad de esta prueba radica en la multiplicación de la bacteria para su posterior tipificación por distintos métodos diagnósticos.

*Leptospira* es de crecimiento lento y en cultivo puede tardar hasta 4 meses en crecer, además del co-crecimiento con otras bacterias hacen que este tipo de diagnóstico sea insensible y no oportuno (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

#### **4.8.3 Pruebas serológicas**

*Leptospira* se ha diagnosticado mediante técnicas serológicas como ELISA y la prueba de microscopía de aglutinación microscópica (MAT) OPS., 2017). La MAT puede arrojar resultados negativos en la fase aguda de la enfermedad o cuando no se dispone de los serovares prevalentes en la región (Romero-Vivas & Falconar, 2016). La prueba ELISA no suele detectar IgM durante los cinco primeros días de la infección, debido a que los anticuerpos empiezan a aparecer pocos días después del inicio de la enfermedad y pueden durar semanas, meses o incluso años en ciertos casos (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Lamentablemente, mientras la infección sigue siendo crónica, los títulos de anticuerpos pueden disminuir hasta niveles indetectables (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

#### **4.8.4 Diagnóstico molecular**

Como método de diagnóstico definitivo oportuno, confiable, sensible y específico desde la fase aguda de la enfermedad, incluso antes de que los anticuerpos sean detectables por las pruebas serológicas, se han implementado metodologías como PCR para detectar la infección causada por *Leptospira* basadas en la identificación de genes como *rrs* que codifica para la subunidad ribosomal 16S, *rrl* codifica para la subunidad ribosomal 23S, *gyrB*, gen que codifica la subunidad B de la enzima ADN girasa, y *secY* codificante para una proteína translocasa (Martin PL, Arauz, 2015). Además, existen pruebas que se basan en la identificación de genes exclusivos de las

especies patógenas del género *Leptospira*. Estos genes incluyen lipL21, lipL32, lipL41, ligA y ligB, así como p74, que se encuentra exclusivamente en especies no patógenas. (Martin PL, Arauz, 2015; Romero-Vivas & Falconar, 2016).

La técnica PCR es conocida por ser una herramienta de diagnóstico altamente específica y sensible. La especificidad analítica del método puede alcanzar niveles aceptables en función de diversos factores, incluido el diseño del cebador, mientras que la sensibilidad oscila entre 100 y 1.000 copias del genoma del microorganismo investigado. Cuando se utiliza la PCR anidada, tanto la sensibilidad como la especificidad pueden aumentar (Carvalho-Pereira et al., 2020).

#### **4.9 Genes de *Leptospira***

El genoma está constituido por un amplio número de genes en su gran mayoría de función desconocida, sin embargo, se ha establecido la función para algunos de ellos tales como aquellos que codifican para proteínas con funciones esenciales de la bacteria como su movilidad (*fliY*), la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*), subunidades ribosomales (*rrs* y *rrl*), subunidades translocadoras de proteínas (*secY*), proteínas de membrana externa (*lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *OmpL1*) (Jorge et al., 2018).

#### **4.10 Identificación de *Leptospira***

Diferentes grupos de investigación han utilizado los genes de *Leptospira* para su identificación mediante técnicas de PCR en muestras biológicas y ambientales demostrando una alta sensibilidad para esta técnica inclusive mayor a la reportada para técnicas diagnósticas convencionales (ELISA, MCO, MAT) reportando sensibilidad del 100% para la identificación utilizando los genes *16S*, *lipL32*, *secY* entre

otros, los cuales han demostrado ser específicos para el género *Leptospira* (Djadid et al., 2009; Moreno and Agudelo-Flórez, 2010).

De igual manera se ha logrado discriminar entre especies patógenas y especies saprofitas por técnicas como PCR-RFLP (Djadid et al., 2009).

Cabe aclarar que estas técnicas son solo usadas en investigación y no se han utilizado como método diagnóstico convencional, además de no diferenciar entre especies por métodos accesibles como PCR punto final y se necesitan metodologías menos accesibles como PCR digital y secuenciación.

#### **4.11 Patogenicidad de *Leptospira***

Se han descrito 15 especies de *Leptospira* capaces de infectar al ser humano y establecer una enfermedad pero su patogenicidad no está del todo clara, aun así, se han establecido algunos factores que favorecen su infección y el establecimiento de la enfermedad, entre ellos el tamaño del inóculo inicial, el estado inmunológico del paciente, la especie de bacteria infectante y en cuanto a factores de virulencia se ha estudiado la relación de la patogenicidad de la bacteria con la expresión de proteínas de superficie, entre las que se encuentran *LipL21*, *32*, *41*, *Loa22*, *Lig A*, *B*, *C*, *OmpL1* entre otros lo que ha sugerido que su expresión es distinta entre especie patógena de *Leptospira*, lo que pudiera estar implicado en las manifestaciones clínicas (Dietrich et al., 2015; Evangelista & Coburn, 2010; Patra et al., 2015).



## V. JUSTIFICACIÓN

Sinaloa reúne las características climáticas que favorecen los brotes de leptospirosis siendo uno de los estados con mayor incidencia de la enfermedad en México; sin embargo, esta enfermedad es fácilmente confundida con otras infecciones febriles, por lo que el número de casos podría estar subestimado. Además, la mortalidad causada por esta infección alcanza hasta el 50 por ciento por la falta de detección temprana y la administración de un medicamento eficaz, por lo que es de suma importancia implementar metodologías para la detección desde la etapa inicial de la enfermedad, con el fin de contar con estudios que permitan mejorar las estrategias de prevención y control de la enfermedad. El conocimiento de las proteínas relacionadas con la infectividad y patogenicidad, permitirán conocer y entender mejor los mecanismos patogénicos, así como el desarrollo de vacunas como profilaxis de la enfermedad.

## **VI. HIPÓTESIS**

El análisis de las proteínas de membrana permitirá estimar la frecuencia de leptospirosis en al menos el 3% en pacientes con cuadro febril de etiología desconocida y permitirá la predicción de epítomos con potencial inmunogénico.

## VII.OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

Establecer la frecuencia de *Leptospira* en muestras de pacientes con cuadro febril de etiología desconocida y predecir el potencial inmunogénico de péptidos derivados de las proteínas lipL32. lipL21. lipL42, ompL1.

### 7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Determinar la frecuencia y distribución de la infección por *Leptospira* en pacientes con cuadro febril de etiología desconocida de Culiacán, Sinaloa.

7.2.2 Determinar la frecuencia y distribución de la infección por *Leptospira* en perros de Culiacán Sinaloa.

7.2.3 Analizar el potencial inmunogénico de las proteínas de membrana (LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1) de *Leptospira*

7.2.4. Predecir péptidos de las proteínas lipL32. lipL21. lipL41, ompL1 con posible potencial inmunogénico.

7.2.5 Analizar toxicidad y alergenicidad de los epítomos estudiados.

## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Tipo de estudio**

Se realizó un estudio de tipo transversal, observacional, comparativo y descriptivo en donde se realizó un muestreo a conveniencia, de sangre de personas con sintomatología febril y pacientes sin sintomatología que acudieron a servicios de laboratorios clínicos privado en el municipio de Culiacán, Sinaloa. Cada participante otorgó su consentimiento para el manejo y análisis de las muestras.

Adicionalmente se obtuvieron muestras de sangre de perros domésticos del mismo laboratorio privado.

### **8.2 Criterios de inclusión**

Se incluyeron dos grupos de muestras una de pacientes que presentaron cuadro febril no diagnosticado, que acudieron a realizarse análisis durante el periodo de estudio y firmaron el consentimiento informado, así como muestras de personas sin sintomatología aparente que de igual forma firmaron el consentimiento para manejo y procesamiento de las muestras.

Las muestras de perros que acudieron hacerse análisis de sangre al laboratorio y los dueños otorgaron el consentimiento para el análisis de las muestras.

### **8.3 Criterios de eliminación**

Se descartaron aquellas muestras cuyo material fue insuficiente para su adecuado procesamiento.

#### **8.4 Tratamiento de las muestras**

Se recolectaron por punción venosa 3 mL de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA de cada paciente y un tubo igual de los perros. Las muestras fueron transportaron al laboratorio de Microscopia de la facultad de ciencias químico-biológicas de la universidad autónoma de Sinaloa, donde se procedió a su procesamiento. Las muestras que no se utilizaron inmediatamente fueron almacenadas a 4 °C (Bhatia et al., 2015; Perez & Goarant, 2010).

#### **8.5 Extracción de material genético**

La extracción de DNA se realizó mediante el *kit* "Tissue DNA Preparation-column kit" (Jena Bioscience) siguiendo las recomendaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Se añadió una alícuota de 1 mL de sangre de cada paciente y 13 mL de solución de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 1,55 M, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM y EDTA 1 Mm) a un tubo cónico de 15 mL, se mezcló por inversión y se incubó a 4 °C por 20 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 4500xg durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se repitió la lisis de eritrocitos hasta obtener una pastilla blanca. el ADN fue recuperado con el kit indicado anteriormente. La calidad y concentración del ADN se evaluaron mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop (Thermo Scientific).

#### **8.6 Integridad del material genético**

Para corroborar la integridad del DNA se diseñó un par de primers para el gen constitutivo  $\beta$ -actina, se amplificó este gen para cada una de las muestras analizadas, fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñido con *RedGel*.

## 8.7 Identificación de *Leptospira* por PCR en tiempo real

El ADN de *Leptospira* se detectó mediante la amplificación de un fragmento de 242 pb del gen *lipL32* utilizando los cebadores LipL32-45F 5'-AAG CAT TACCGC TTG TGG TG-3', LipL32-286R 5'-GAA CTCCCA TTT CAG CGA TT-3', la sonda LipL32-189P FAM-5'-AA AGC CAG GAC AAG CGCCG-3'-BHQ1 y el *Taq Man gene expression master mix* (Applied Biosystems). Para la mezcla de PCR se utilizaron 12,5 µL del mix de expresión, 10 pmol de cada cebador, 10 pmol de la sonda y 50 ng de ADN en un volumen de reacción de 20 µL. Se utilizó ADN de *Leptospira* (ATCC 23481) como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de activación de 50 °C por 2 min, seguido de un ciclo de desnaturalización de 95 °C por 5 min y 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg y 60 °C de hibridación por 30 segundo utilizando el dispositivo Blackstar 96 (Gen2Life) (Piredda et al., 2021).

## 8.8 Análisis de potencial inmunogénico de proteínas de membrana de *leptospira*.

### 8.8.1 Búsqueda y selección de secuencias

Se analizaron las secuencias aminoacídicas completas de las proteínas de membrana *LipL21*, *LipL32*, *LipL41* y *OmpL1* obtenidas de la base de datos del NCBI para la posterior predicción de los epítomos inmunogénicos de células B y T en base a su afinidad con los diferentes alelos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano y de ratón utilizando herramientas bioinformáticas como: HLApred Server, BepiPred, SEPPA y MIMOPRO (Ali et al., 2017; Karkhah et al., 2017).

### **8.8.2 Potencial inmunogénico de las proteínas de membrana de *Leptospira*.**

Se analizaron las proteínas *LipL21*, *LipL32*, *LipL41* y *OmpL1* utilizando el servidor VaxiJen 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). Para predecir el potencial inmunogénico de cada una de las proteínas de membrana tomando como punto de corte 0.4 debido a que toda proteína con un score antigénico mayor a 0.4 son consideradas como posibles antígenos (Anand et al., 2020; Salod & Mahomed, 2022).

### **8.8.3 Predicción de epítomos en línea de linfocitos T MHC-1.**

La predicción de epítomos para la clase MHC-1 se realizó mediante el programa HLApred Server: (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlapred/>). Para los alelos A1, A2, A\*0201, A\*0202, A\*0203, A\*0205, A\*0206, A3, A11, A\*1101, A20, A24, A\*2402, A31, A\*3101, A\*3302, B7, B\*0702, B8, B14, B27, B\*2702, B\*2705, B35, B\*3501, B\*3701, B\*3801, B\*3901, B\*3902, B40, B\*4403, B51, B\*5101, B\*5102, B\*5103, B\*5201, B\*5301, B\*5401, B\*5801, B60, B61, B62, utilizando un punto de corte de 3 con 4 epítomos por alelo, con una predicción basada en matrices cuantitativas (Taheri-Anganeh et al., 2021; Zaheer et al., 2020).

### **8.8.4 Predicción de epítomos en línea de linfocitos T MHC-II.**

La predicción de epítomos para la clase MHC-II se realizó mediante el programa HLApred Server: (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlapred/>). Para los alelos; HLA-DRB1\*0101, HLA-DRB1\*0102, HLA-DRB1\*0301 HLA-DRB1\*0305 HLA-DRB1\*00306 HLA-DRB1\*0307, HLA-DRB1\*0308, HLA-DRB1\*0309, HLA-DRB1\*0311, HLA-DRB1\*0401, HLA-DRB1\*0402, HLA-DRB1\*0404, HLA-DRB1\*0405, HLA-DRB1\*0405, HLA-DRB1\*0410, HLA-DRB1\*0421, HLA-DRB1\*0426, HLA-DRB1\*0701, HLA-

DRB1\*0703, HLA-DRB1\*0801, HLA-DRB1\*0802, HLA-DRB1\*0804, HLA-DRB1\*0806, HLA-DRB1\*0813, HLA-DRB1\*0817, HLA-DRB1\*1101, HLA-DRB1\*01102, HLA-DRB1\*1104, HLA-DRB1\*1106, HLA-DRB1\*1107, HLA-DRB1\*1114, HLA-DRB1\*1120, HLA-DRB1\*1121, HLA-DRB1\*1128, HLA-DRB1\*1301, HLA-DRB1\*1302, HLA-DRB1\*1304, HLA-DRB1\*1305, HLA-DRB1\*1307, HLA-DRB1\*1311, HLA-DRB1\*1321, HLA-DRB1\*1322, HLA-DRB1\*1323, HLA-DRB1\*1327, HLA-DRB1\*1328, HLA-DRB1\*1501, HLA-DRB1\*1502, HLA-DRB1\*1506, HLA-DRB5\*0101, HLA-DRB5\*0105 utilizando un punto de corte de 3 con 4 epítomos por alelo, con una predicción basada en matrices cuantitativas (Taheri-Anganeh et al., 2021; Zaheer et al., 2020).

#### **8.8.5 Predicción de epítomos en línea de linfocitos B**

La predicción de epítomos de células B se realizó en el servidor ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>). Utilizando un punto de corte de 0.5, mostrando 16 epítomos por ventana, con una predicción basada en una red neuronal artificial recurrente parcial (Galanis et al., 2021; Malik et al., 2022).

#### **8.8.6 Predicción de alergenicidad y toxicidad**

Los servidores AllergenFP v.1.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/index.html>) y ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) fueron utilizados para predecir alergenicidad y toxicidad de los epítomos predicho.

#### **8.8.7 Análisis de mimetismo molecular y cobertura en la población**

El mimetismo molecular de los epítomos predichos contra moléculas propias del ser humano fue analizado utilizando el servidor HLApred (<http://crdd.osdd.net/cgi-bin/hlapred/mimicry.pl>). aquellos epítomos que no mostraron



identidad idéntica con el humano fueron considerados como candidatos para estudio en el desarrollo de vacunas.

Los epítomos predichos no alergénicos, no tóxicos y sin mimetismo molecular fueron agrupados por alelos para evaluar la cobertura en la población.

## IX. RESULTADOS

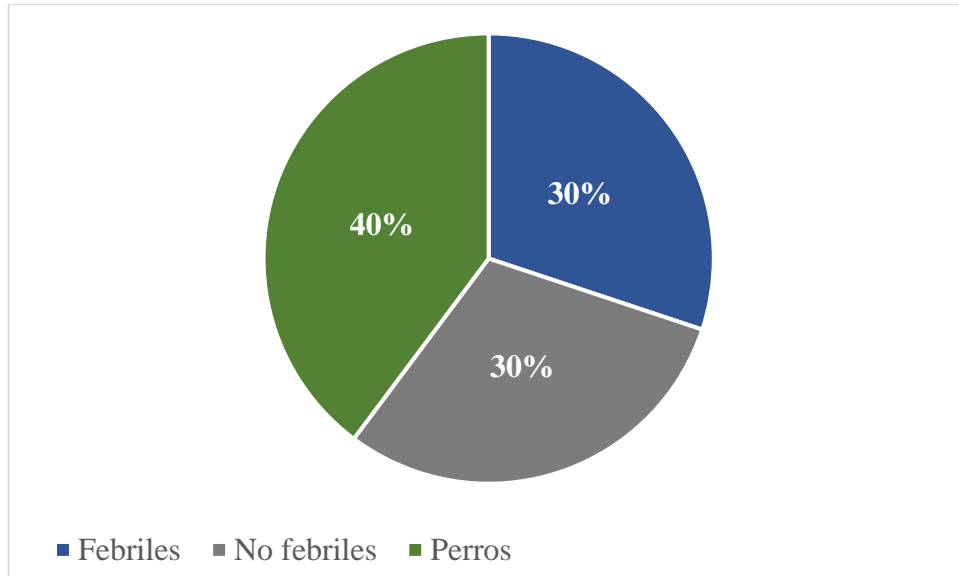
### 9.1 Descripción de la población

Se recolectaron 362 muestras de sangre donadas por un laboratorio de análisis clínico privado, de las cuales 109 corresponden a pacientes con cuadro febril de origen desconocido, 109 a pacientes sin cuadro febril y 144 muestras de perros domésticos (Figura 6), además de 7 muestras de ADN's de *Leptospira interrogans* donados por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) los cuales fueron utilizados como controles.

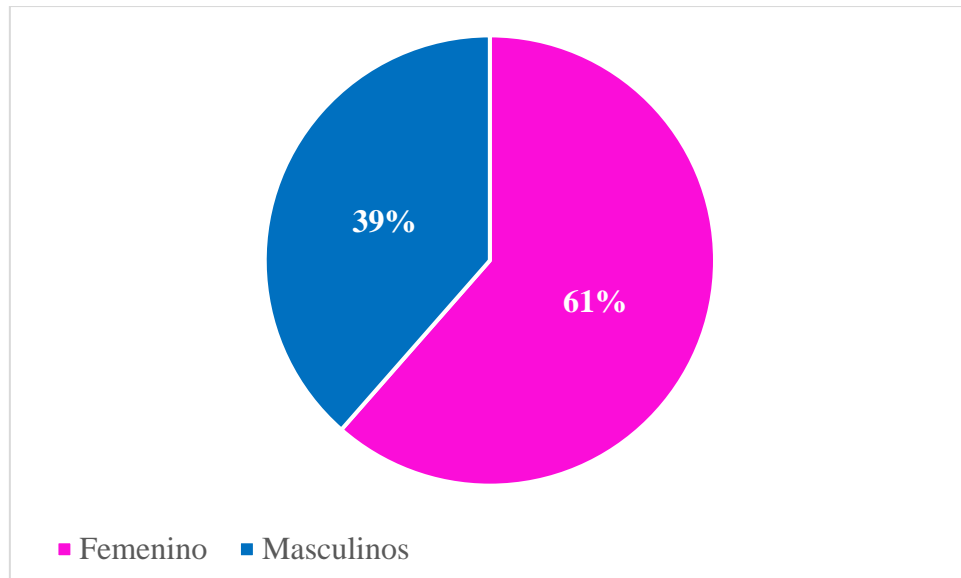
Se obtuvo ADN de 218 muestras a partir de sangre de humanos voluntarios participantes todos de origen sinaloense; 109/218 (50%) de pacientes con un cuadro febril de origen desconocido, y 109/218 (50%) de pacientes asintomáticos.

La muestra estudiada fue conformada por 134 mujeres y 84 hombres, con un predominio del sexo femenino (61.47%) (Figura 7). Las edades oscilaron entre 1 y 92 años, las cuales fueron organizadas por grupos etarios con un segmento mayor entre 27 a 59 años (53%) (Figura 8).

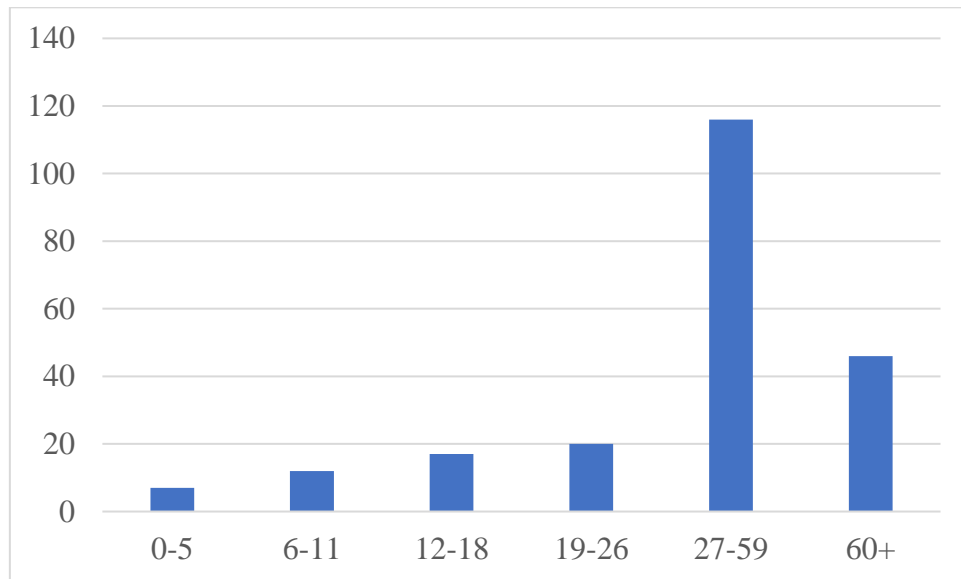
Las 144 muestras de perros analizadas estuvieron conformadas por 59 hembras y 85 machos con predominio del sexo masculino (59%) (Figura 9). Las edades oscilaron entre 1 mes y 18 años y fueron agrupados por edades con un segmento mayor entre 1 y 3 años (Figura 10)



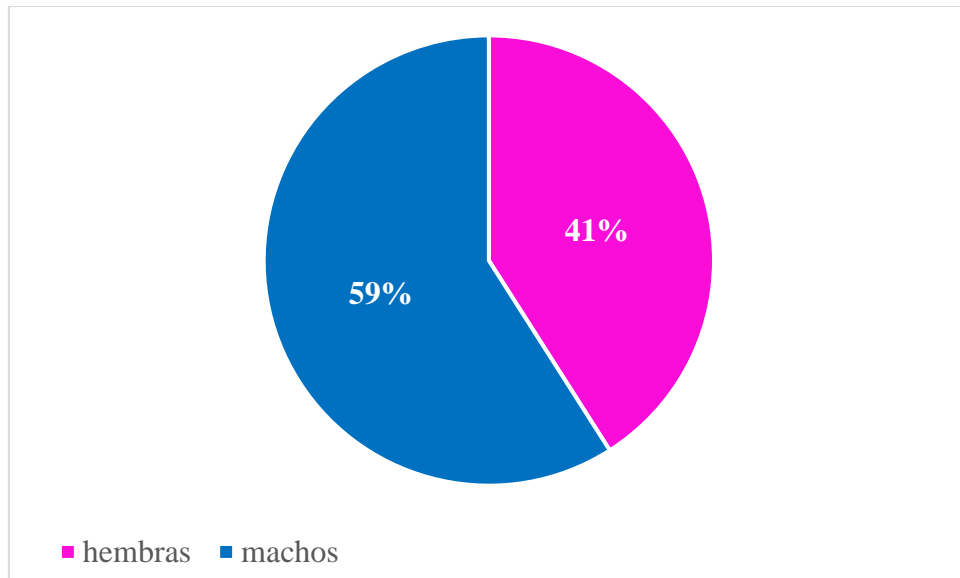
**Figura 6. Porcentaje de muestras obtenidas.** Se recolectaron 362 muestras; 109 con cuadro febril (30%), 109 sin cuadro febril (30%) y 144 muestras de perros domésticos (40%)



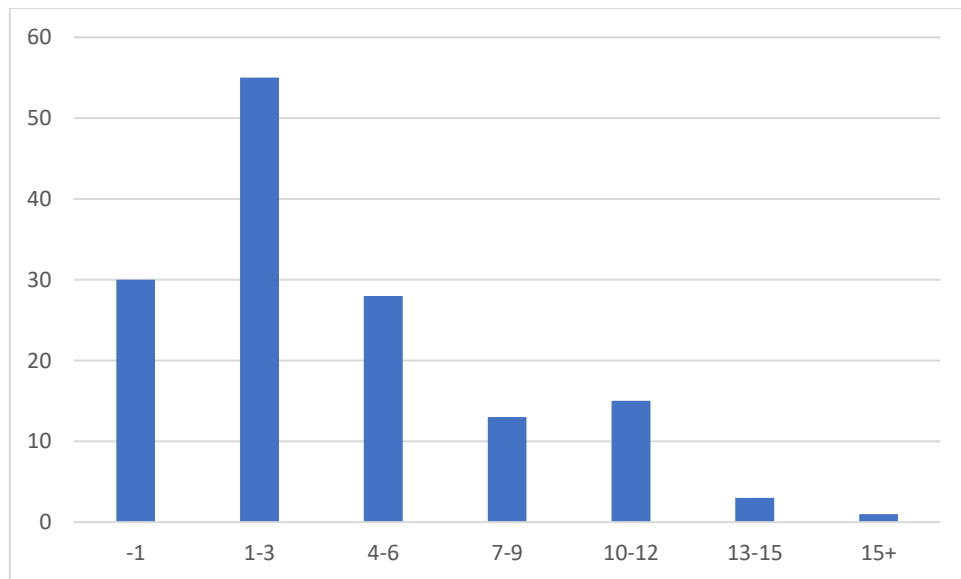
**Figura 7: Distribución de la población humana por género.** De las 218 muestras de sangre humana; 134 correspondían al género femenino (61%) y 84 al género masculino (39%).



**Figura 8: Distribución de la población humana por grupos etarios.** Se agruparon por rangos de edad de 0-5, 6-11, 12-18, 19-26, 27-59 y más de 60 años con una distribución de 7, 12, 17, 20, 116 y 46 personas, respectivamente.



**Figura 9: Distribución de la población canina por género.** De las 144 muestras de sangre canina; 59 individuos fueron hembras (41%) y 85 fueron machos (59%).



**Figura 10. Distribución de la población canina por edad.** La población canina se agrupo por edades con rangos de -1, 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15 y más de 15 años con una distribución de 30, 55, 28, 13, 15, 3 y 1 perros, respectivamente.

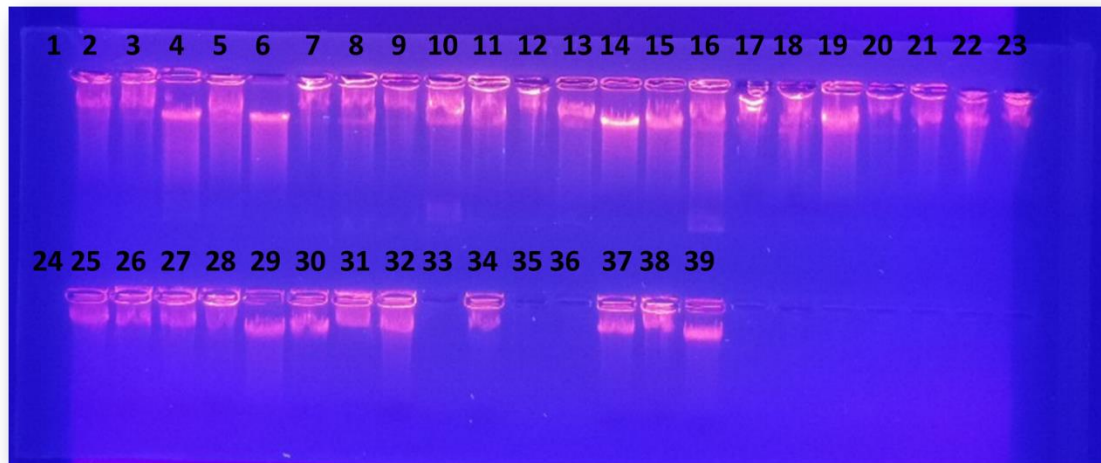
## **9.2 Extracción de material genético**

Se procesaron un total de 362 muestras de las cuales se obtuvo DNA integro para cada una de las muestras lo cual fue observado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con *GelRed* (Figura 11).

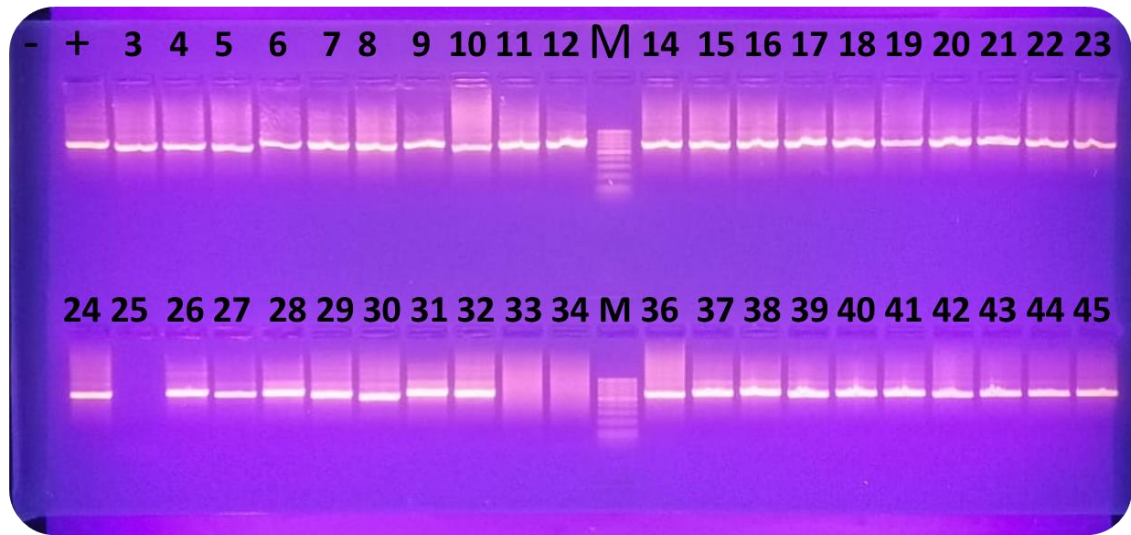
## **9.3 amplificación del gen $\beta$ -actina**

Para corroborar la integridad del DNA se diseñó un par de primers para el gen constitutivo  $\beta$ -actina, se amplifico este gen para cada una de las muestras analizadas, fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñido con *RedGel* (Figura 12).





**Figura 11. Gel representativo de la extracción de ADN:** el ADN de las muestras fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed. Carril 1 espacio en blanco, del carril 2 al carril 39 extracción de muestras. Las muestras 24,33,35 y 36 no se observa la banda característica del DNA genómico sin embargo no fueron descartadas hasta comprobar si el DNA presente era insuficiente para ser amplificado.



**Figura 12. Gel representativo de la amplificación del fragmento del gen  $\beta$ -actina.**

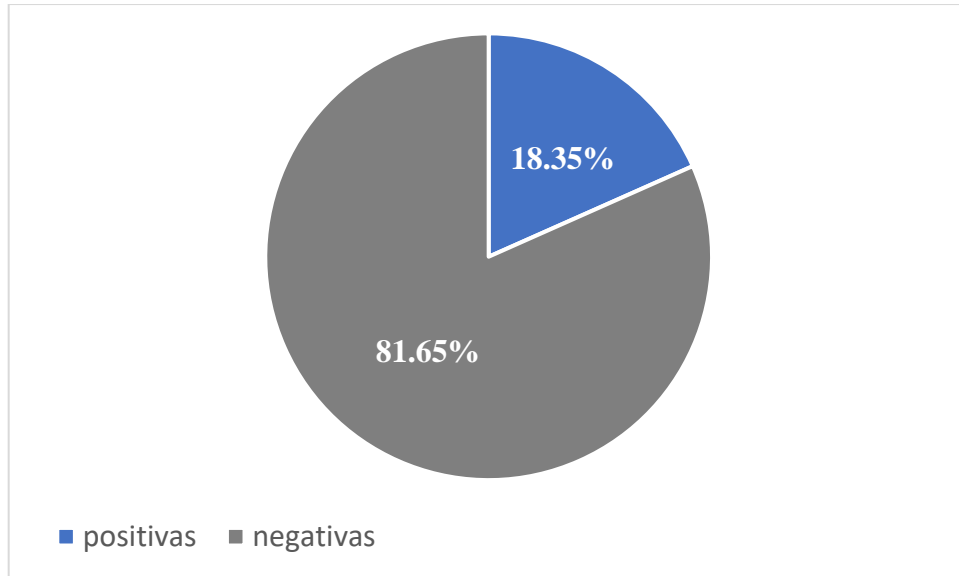
la amplificación del fragmento de 822pb del gen  $\beta$ -actina fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con GelRed. Carril 1; control negativo de reacción, Carril 2; control positivo de reacción, Carriles 13-12, 14-34, 36-45 muestras, Carriles 14 y 35; marcador de 100pb. La muestra 25 fue descartada debido a que no se observó la banda de 822 pb esperada lo que indico material inadecuado para su procesamiento.

#### **9.4 Identificación de *Leptospira* por PCR en tiempo real**

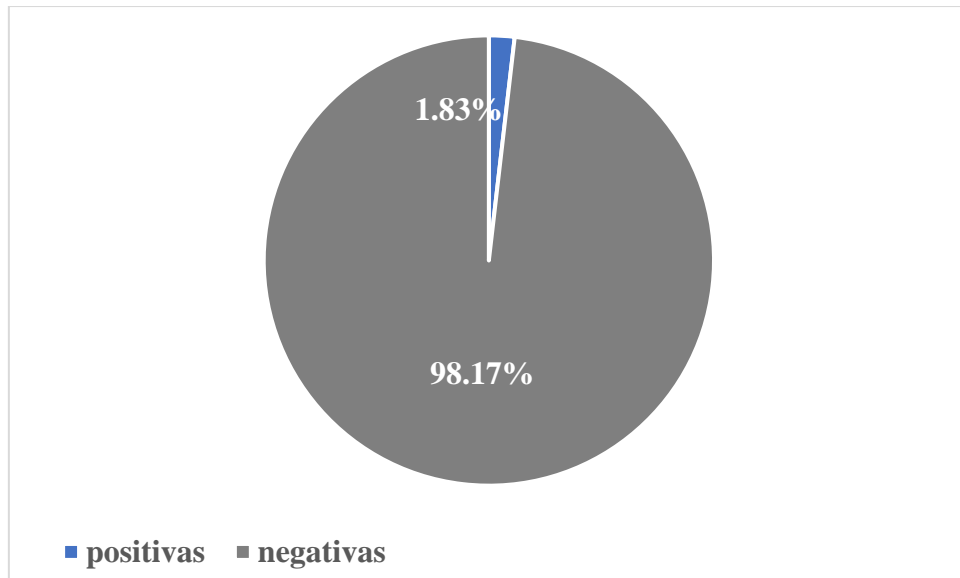
Se identifico a *Leptospira* mediante la amplificación de un fragmento del gen *LipL32* de 242 pb obteniendo positividad en un 9.67 % del total de muestras analizadas, de las 109 muestras febriles se obtuvo un 18.35% de positividad (Figura 13). De las 109 muestras no febriles 1.83 % fueron positivas (Figura 14) y de las 144 muestras de perros analizadas se obtuvo un 9 % (Figura 15).

De las muestras humanas positivas (22); 16 correspondieron al género femenino y 6 al género masculino, en cuanto a su distribución por grupos etarios se obtuvieron 2 muestras positivas para el rango de 0-5 años, 2 en el rango de 6-11; dos en el rango de 12-18 años; 2 más para el rango de 19-26 años; 11 en el grupo de 27-59 y 3 positivas en el grupo de mayor o igual a 60 años (figura 16).

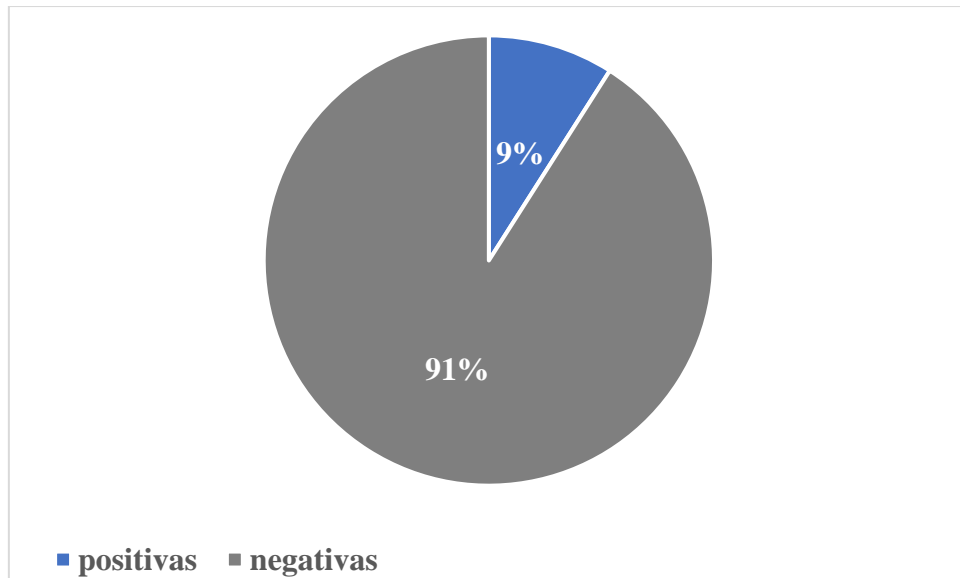
De las muestras caninas positivas (13); 4 hembras y 9 machos, en cuanto a su distribución por edades se obtuvieron 3 muestras positivas para el rango menores a 1 años, 7 en el rango de 1-3 años; 1 en el rango de 4-6 años; 1 para el rango de 7-9 años; 1 en el grupo de 10-12; 0 para los grupos de 13-15 años y 0 en los mayores de 15 años (figura 17).



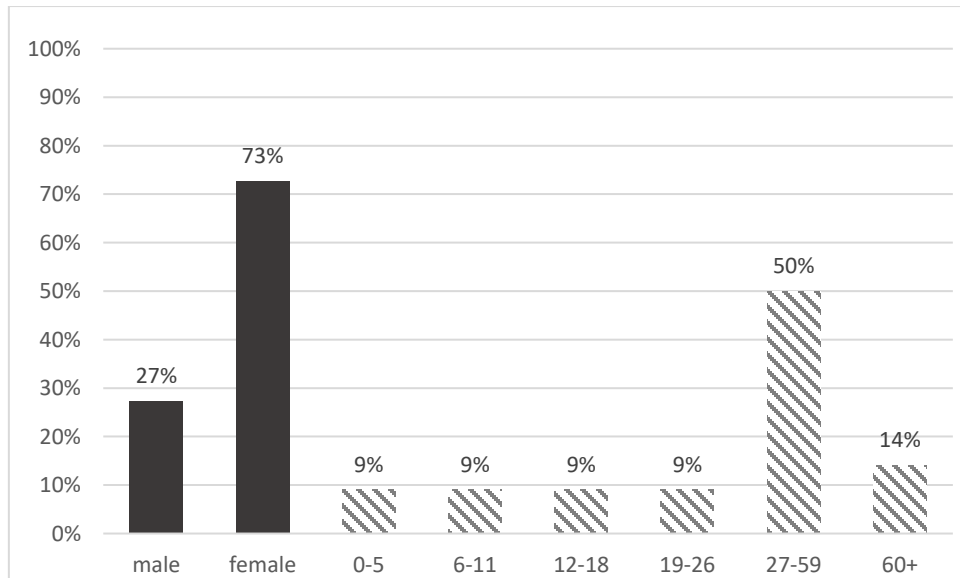
**Figura 13. Positividad de las muestras febriles analizadas.** Se analizaron 109 muestras febriles equivalente a un 30 por ciento del total de muestras analizadas, donde se encontraron 20 muestras positivas representando un 18.35 % de positividad en este grupo.



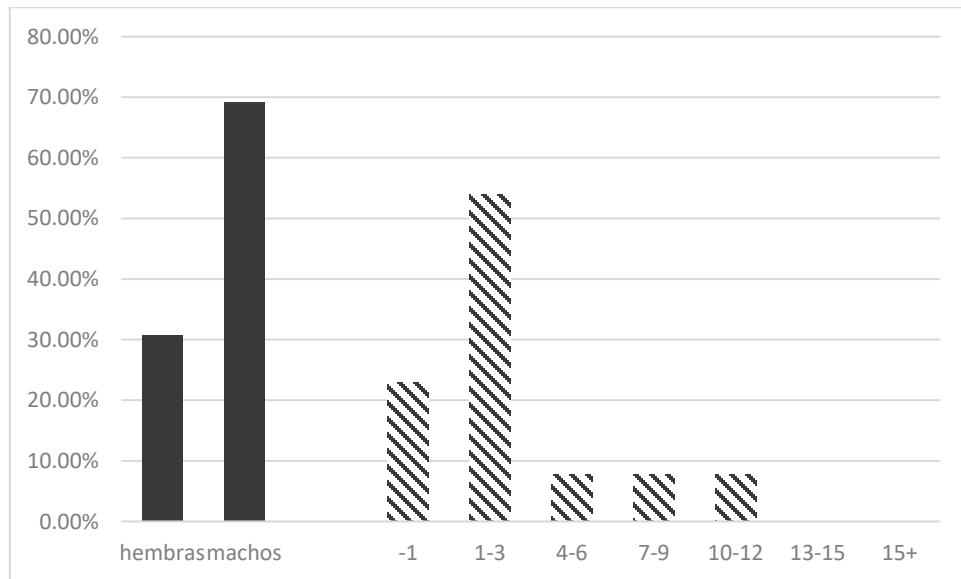
**Figura 14. Positividad de las muestras no febriles analizadas.** Se analizaron 109 muestras no febriles equivalente a un 30 por ciento del total de muestras analizadas, donde se encontraron 2 muestras positivas representando un 13.73 % de positividad en este grupo.



**Figura 15. Positividad de las muestras caninas analizadas.** Se analizaron 144 muestras de perro equivalente a un 40 por ciento del total de muestras analizadas, donde se encontraron 13 muestras positivas representando un 9 % de positividad en este grupo.



**Figura 16: Distribución porcentual de casos de leptospirosis humana por género y rango de edad.** Las barras negras representan las muestras positivas por sexo y las barras rayadas representan las muestras positivas por grupo de edad. El mayor número de muestras positivas se encontró en pacientes mujeres (> 70%) y en el grupo de edad de 27 a 59 años.



**Figura 17: Distribución porcentual de casos de leptospirosis canina por género y rango de edad.** Las barras negras representan las muestras positivas por sexo y las barras rayadas representan las muestras positivas por grupo de edad. El mayor número de muestras positivas se encontró en los perros machos (> 69%) y en el grupo de edad de 1 a 3 años.



## **9.5. Análisis de las secuencias de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1**

Se recuperaron y alinearon las secuencias aminoacídicas completas de las proteínas de membrana; LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1 de especies patógenas de *Leptospira*. una vez alineadas se obtuvo una secuencia consenso la cual fue utilizada para la búsqueda y selección de epítomos inmunogénicos (Figura 18).

```

LipL21-1  M I N R L I A L S L A T M I F A A C S S T D T G Q K D A T T V G D G G W T F E G W G G P P E Q R N D G K T P R D T N P K D W Y Y I K F S S R
LipL21-1  A S G K A V A K K S Q A M M Q S T C R E A S R L Q G A S D V V K K M V G E T V E S A S G V S D G E A T A S V I V S Q S Q G V V K G V G V Y E
LipL21-1  C K A T G S G S D P K D V S K D N W E E C Q C V I Y A K F P G G K D A L V A K A Q E V S K Q

LipL32-1  M K K L S I L A I S V A L F A S I T A C G A F G G L P S L K S S F V L S E D T I P G T N E T V K T L L P Y G S V I N Y Y G V K P G Q A P D
LipL32-1  G L V D G N K K A Y Y L Y V W I P A V I A E M G V R M I S P T G E I G E P G D G D L V S D A F K A A T P E E K S M P H W F D T W I R V E R M
LipL32-1  S A I M P D Q I A K A A K A K P V Q K L D D D D G D D T Y K E E R H N K Y N S L T R I K I P N P P K S F D D L K N I D T K K L L V R G L Y
LipL32-1  R I S F T T Y K P G E V K G S F V A S V G L L F P P G I P G V S P L I H S N P E E L Q K Q A I A A E E S L K K A A S D A T K

LipL41-1  M R K L S S L I S V L V L L M F L G N C A A T V D V E Y P V F P K D K E G R A L Q K F L G T I R N V G L A V E A P K K S L W E A I F G E G S
LipL41-1  S F I D Q M P S K V F E A F D K E S Y Y K L T D L S K R A D A I N E A S L S L T G I T K N R A K I G N L I G A E A I L Y I G Y Q K P Y T E C
LipL41-1  S T E N K I D A V A A G L K V A G F A A S M A T G K D V N T G N E P V S K P T G V R M M L I P L D A T L I K V E T G E V K K A V V S S P A K
LipL41-1  I F N S V G N L E C P S I L D S F G Q G L D E A A A Y I K G R L S P I V K T E R I K V F V K D E D E E V K E L L Q E G Y E E I V G E T P S F
LipL41-1  K K A K E A W E K A D K K A K G Q S W G A K A N L A T Y Y F S T G D F E K S I K L Y E E A M K L K D A D K S Y L R E L R K R V E A T F A V D
LipL41-1  E S N A K

OmpL1-1  M I R N I S K A L L I L A V A L S S A A S L S A K T Y A I V G F G L Q L D L G Q L G G T I T K D G L D A A S Y Y G P V R S T D T C T V G P N
OmpL1-1  D P T C V Q N P G K P T G E G N Y L G V A P R K A I P A E N R L I T L D R T T G G L I N A R S T K G A M V G G N L M V G Y E S D F G K Y F F
OmpL1-1  W R V A A E Y T Q K I S G G I T K A D I A G Y N I V D M T W G F S S I V I P A T V G I K L N V T E D A A I Y M G A G L N Y F N G G W S L N G
OmpL1-1  S N N L K G G H D I L A A A G A G S V V N L I A D G T D P V T T R E H V R F R T S G I A P N F L I G T Q A R V T D K G H V F L E L E T I M S
OmpL1-1  A A Y A V G K T Q S A G G A T N L S P F P A Y P I V V G G Q I Y R F G Y K H E L

```

**Figura 18. Secuencia aminoacídica de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1 de *Leptospira*.** Secuencias aminoacídicas seleccionadas resultado de la búsqueda y alineación de las proteínas de superficie de *Leptospira*. La proteína completa de LipL21 tiene una longitud de 186 aminoácidos, la proteína LipL32 una longitud de 272 aminoácidos, la proteína LipL41 una longitud de 355 aminoácidos y la OmpL1 una longitud de 320 aminoácidos.

## **9.6. Potencial inmunogénico de las proteínas *LipL21*, *LipL32*, *LipL41* y *OmpL1* de *Leptospira*.**

Una vez recuperadas las secuencias aminoacídicas de las proteínas de membrana de *Leptospira*; *LipL21*, *LipL32*, *LipL41* y *OmpL1* se utilizó la herramienta bioinformática *VaxiJen 2.0* para la predicción del potencial inmunogénico de cada una de las proteínas. Las cuatro proteínas analizadas mostraron potencial inmunogénico ya que mostraron un score antigénico mayor o igual a 0.4 lo que es considerado como potencial inmunogénico a excepción de *LipL41* para *L. borgpeterseni* y *L. santarosai*. Las proteínas con mayor score antigénico fueron *LipL21* y *OmpL1* de *L. interrogans* (Figura 19).

### **9.6.1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas *LipL21*, *LipL32*, *LipL41* y *OmpL1* de *Leptospira*.**

La proteína *LipL21* de 186 aa mostro un peso de 19661.03 Da con un PI de 7.54, 22 residuos totales con carga negativa, 23 residuos totales con carga positiva, un índice de estabilidad de 34.14, una vida media de 30 hrs, un índice alifático de 59.78 y un gran promedio de hidropaticidad (GRAVY) de -0.459 (Figura 20).

La proteína *LipL32* de 272 aa mostro un peso de 29612.97 Da con un PI de 6.34, 34 residuos totales con carga negativa, 33 residuos totales con carga positiva, un índice de estabilidad de 32.53, una vida media de 30 hrs, un índice alifático de 85.74 y un gran promedio de hidropaticidad (GRAVY) de -0.257 (Figura 20).

La proteína *LipL41* de 355 aa mostro un peso de 38952.80 Da con un PI de 7.52, 51 residuos totales con carga negativa, 52 residuos totales con carga positiva, un índice

de estabilidad de 25.46, una vida media de 30 hrs, un índice alifático de 87.84 y un gran promedio de hidropaticidad (GRAVY) de -0.245 (Figura 20).

La proteína OmpL1 de 320 aa mostro un peso de 33491.11 Da con un PI de 8.91, 22 residuos totales con carga negativa, 26 residuos totales con carga positiva, un índice de estabilidad de 27.60, una vida media de 30 hrs, un índice alifático de 88.78 y un gran promedio de hidropaticidad (GRAVY) de -0.092 (Figura 20).

PROTEINA	LONGITUD	SCORE	SCORE	SCORE	SCORE	SCORE	SCORE
		INTERROGANS	BORGPETERSENII	KIRSCHNERI	NOGUCHII	SANTAROSAI	WEILII
<b>LipL21</b>	<b>186aa</b>	0.7832	0.7258	0.7620	0.7525	0.7345	0.7286
<b>LipL32</b>	<b>272aa</b>	0.4325	0.4271	0.4325	0.4325	0.4380	0.4271
<b>LipL41</b>	<b>355aa</b>	0.4197	0.3925	0.4362	0.4247	0.3939	0.4332
<b>OmpL1</b>	<b>320aa</b>	0.6427	0.6087	0.6291	0.6427	0.6197	0.6427

**Figura 19. Potencial inmunogénico de las proteínas LipL21, LipL31, LipL41 y OmpL1 de *Leptospira*.** Se muestra el potencial inmunogénico de las proteínas predicho con VaxiJen 2.0 de LipL21, LipL31, LipL41 y OmpL1 de *Leptospira* por especie con un score antigénico por encima del umbral de 0.4 considerándose proteínas con potencial inmunogénico.

CRITERIO	LipL21	LipL32	LipL41	OmpL1
<i>Numero de aminoácidos</i>	186	272	355	320
<i>Peso molecular</i>	19661.03	29612.97	38952.80	33491.11
<i>Formula</i>	C <sub>844</sub> H <sub>1349</sub> N <sub>239</sub> O <sub>281</sub> S <sub>10</sub>	C <sub>1339</sub> H <sub>2113</sub> N <sub>341</sub> O <sub>400</sub> S <sub>7</sub>	C <sub>1749</sub> H <sub>2804</sub> N <sub>450</sub> O <sub>531</sub> S <sub>10</sub>	C <sub>1499</sub> H <sub>2355</sub> N <sub>405</sub> O <sub>449</sub> S <sub>8</sub>
<i>PI teórico</i>	7.54	6.34	7.52	8.91
Residuos totales con carga negativa (Asp+Glu)	22	34	51	22
Residuos totales con carga positiva (Arg+Lys)	23	33	52	26
Ext. Coeficiente	28210	32890	34505	37458
Vida media estimada	30 hrs. en RM	30 hrs. en RM	30 hrs. en RM	30 hrs. en RM
índice de inestabilidad	34.14	32.53	25.46	27.60
Índice alifático	59.78	85.74	87.44	88.78
Gran promedio de hidropaticidad (GRAVY)	-0.459	-0.257	-0.245	0.092

**Figura 20. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas LipL21, LipL31, LipL41 y OmpL1 de *Leptospira*.** Se muestra las propiedades fisicoquímicas como numero de aminoácidos, PM, formula, PI, coeficiente de extinción, vida media, índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropaticidad establecidas con ProtParam.

### **9.7 Predicción de epítomos en línea de linfocitos T por HLApred MHC-1.**

Se analizaron las dos proteínas con mayor puntaje antigénico: LipL21 (0.7832) y OmpL1 (0.6427) y se predijeron un total de 220 epítomos de LipL21 y 220 epítomos de OmpL1 para 51 alelos del MHC clase I, sin embargo, algunos alelos compartían el reconocimiento a los mismos epítomos resultando un total de 102 epítomos de LipL21 y 129 epítomos de OmpL1. Los epítomos de LipL21 con mayor cobertura de alelos fueron: INRLIALSL y CQCVIYAKF con 7 alelos; RLIALLSLAT, VAKAQEVSK y AKAQEVSKQ con 6 alelos; VGDGGWTFE y RDTNPKDWY con 5 alelos; TTVGDGGWT, RASGKAVAK, REASRLQGA, VVKKMVGET, VSQSQGVVK, SQGVVKGVG, DNWEECQCV y KFPGGKDAL con 4 alelos. Mientras que los epítomos de OmpL1 con mayor cobertura fueron: QNPGKPTGE con 8 alelos; GQLGGTITK con 6 alelos; GQIYRFGYK con 5 alelos; KDGLDAASY, ADIAGYNIV, LNGSNLKG y GHVFLELET con 4 alelos (Cuadro 3).

**Cuadro 3: Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de *Leptospira* y su frecuencia en alelos del MHC clase I**

LipL21			OmpL1		
posición	frecuencia	epítopo MHC-1	posición	frecuencia	epítopo MHC-1
1	1	MINRLIALS	1	1	MIRNISKAL
2	7	INRLIALSL	2	3	IRNISKALL
3	2	NRLIALSLA	3	1	RNISKALLI
4	6	RLIALSLAT	4	1	NISKALLIL
6	3	IALSLATMI	8	1	ALLILAVAL
7	1	ALSLATMIF	11	1	ILAVALSSA
15	1	FAACSSTDT	17	2	SSAASLSAK
18	1	CSSTDTGQK	19	1	AASLSAKTY
22	1	DTGQKDATT	21	2	SLSAKTYAI
24	3	GQKDATTVG	22	1	LSAKTYAIV
25	1	QKDATTVGD	24	2	AKTYAIVGF
28	2	ATTVGDGGW	25	1	KTYAIVGFG
29	4	TTVGDGGWT	26	2	TYAIVGFGL
30	3	TVGDGGWTF	27	1	YAIVGFGLQ
31	5	VGDGGWTFE	30	1	VGFGQLQLDL
35	1	GWTFEGWGG	33	1	GLQLDLGQL
38	2	FEGWGGPPE	35	1	QLDLGQLGG
39	1	EGWGGPPEQ	37	1	DLGQLGGTI



40	2	GWGGPPEQR	39	6	GQLGGTITK
41	1	WGGPPEQRN	47	4	KDGLDAASY
44	2	PPEQRNDGK	48	1	DGLDAASY
45	2	PEQRNDGKT	56	2	YGPVRSTDT
48	1	RNDGKTPRD	58	1	PVRSTDTCT
51	1	GKTPRDTNP	59	1	VRSTDTCTV
52	3	KTPRDTNPK	62	1	TDTCTVGPN
55	5	RDTNPKDWY	65	1	CTVGPNDPT
56	3	DTNPKDWYY	69	2	PNDPTCVQN
57	2	TNPKDWYYI	72	1	PTCVQNPBK
58	3	NPKDWYYIK	74	1	CVQNPBKPT
59	1	PKDWYYIKF	75	2	VQNPBKPTG
60	2	KDWYYIKFS	76	8	QNPBKPTGE
61	1	DWYYIKFSS	79	3	GKPTGEGNY
62	2	WYYIKFSSR	80	1	KPTGEGNYL
69	1	SRASGKAVA	82	1	TGEGNYLGV
70	4	RASGKAVAK	83	2	GEGNYLGVA
71	1	ASGKAVAKK	85	2	GNYLGVAPR
72	1	SGKAVAKKS	86	2	NYLGVAPRK
73	3	GKAVAKKSQ	88	1	LGVAPRKAI
74	1	KAVAKKSQA	93	3	RKAIPAENR
77	2	AKKSQAMMQ	96	2	IPAENRLIT
78	1	KKSQAMMQS	99	1	ENRLITLDR

79	2	KSQAMMQST	101	1	RLITLDRTT
80	1	SQAMMQSTC	103	1	ITLDRTTGG
81	2	QAMMQSTCR	104	3	TLDRTTGGGL
84	1	MQSTCREAS	105	2	LDRTTGGGLI
85	2	QSTCREASR	108	2	TTGGLINAR
86	2	STCREASRL	110	1	GGLINARST
88	1	CREASRLQG	111	2	GLINARSTK
89	4	REASRLQGA	113	2	INARSTKGA
91	1	ASRLQGASD	116	1	RSTKGAMVG
92	2	SRLQGASDV	123	2	VGGNLMVGY
93	1	RLQGASDVV	130	1	GYESDFGKY
94	3	LQGASDVVK	131	1	YESDFGKYF
95	2	QGASDVVKK	132	1	ESDFGKYFF
97	1	ASDVVKKMV	133	3	SDFGKYFFW
98	1	SDVVKKMVG	134	2	DFGKYFFWR
100	4	VVKKMVGET	139	2	FFWRVAAEY
101	1	VKKMVGETV	140	2	FWRVAAEYT
102	1	KKMVGETVE	141	1	WRVAAEYTQ
107	3	ETVESASGV	142	3	RVAAEYTQK
116	2	SDGEATASV	147	2	YTQKISGGI
117	1	DGEATASVI	148	3	TQKISGGIT
118	3	GEATASVIV	149	3	QKISGGITK
120	3	ATASVIVSQ	155	1	ITKADIAGY

122	3	ASVIVSQSQ	157	1	KADIAGYNI
126	4	VSQSQGVVK	158	4	ADIAGYNIV
127	1	SQSQGVVKG	160	1	IAGYNIVDM
128	1	QSQGVVKGV	161	1	AGYNIVDMT
129	4	SQGVVKGVG	162	1	GYNIVDMTW
130	2	QGVVKGVG	163	1	YNIVDMTWG
131	3	GVVKGVG	164	1	NIVDMTWGF
132	2	VVKGVG	165	1	IVDMTWGFS
133	1	VKGVGVYEC	168	2	MTWGFSSIV
134	3	KGVGVYECK	173	1	SSIVIPATV
136	1	VGVECKAT	175	2	IVIPATVGI
139	1	YECKATGSG	176	1	VIPATVGIK
142	1	KATGSGSDP	177	2	IPATVGIKL
143	2	ATGSGSDPK	179	1	ATVGIKLN
147	1	GSDPKDVSK	180	1	TVGIKLNVT
148	1	SDPKDVSKD	181	1	VGIKLNVT
150	1	PKDVSKDNW	183	3	IKLNVTEDA
151	1	KDVSKDNWE	184	1	KLNVTEDAA
152	1	DVSKDNWEE	189	1	EDAAIYMGA
153	2	VSKDNWEEC	191	1	AAIYMGAGL
154	1	SKDNWEECQ	193	1	IYMGAGLNY
156	4	DNWEECQCV	198	1	GLNYFN
157	3	NWEECQC	199	2	LN

158	2	WEECQCVIY	202	1	FNGGWSLNG
159	3	EECQCVIYA	206	1	WSLNGSNL
160	1	ECQCVIYAK	207	2	SLNGSNLTK
161	7	CQCVIYAKF	208	4	LNGSNLTKG
163	1	CVIYAKFPG	210	2	GSNNLKGGH
165	2	IYAKFPGGK	211	1	SNNLKGGH
167	2	AKFPGGKDA	213	1	NLKGGH
168	4	KFPGGKDAL	214	2	LKGGH
169	1	FPGGKDALV	218	1	HDILAAAGA
171	3	GGKDALVAK	221	2	LAAAGAGSV
172	2	GKDALVAKA	222	1	AAAGAGSVV
174	1	DALVAKAQE	224	1	AGAGSVVNL
175	1	ALVAKAQEV	227	1	GSVVNL
177	6	VAKAQEVSK	235	1	DGTDVPTTR
178	6	AKAQEVSKQ	240	2	VTTREHVRF
			241	1	TTREHVRF
			245	1	HVRFRTSGI
			246	1	VRFRTSGIA
			249	1	RTSGIAPNF
			254	1	APNFLIGTQ
			256	1	NFLIGTQAR
			261	1	TQARVTDKG
			264	1	RVTDKGHVF

			265	3	VTDKGHVFL
			267	1	DKGHVFLEL
			269	4	GHVFLELET
			273	3	LELETIMSA
			274	1	ELETIMSAA
			275	1	LETIMSAAAY
			279	2	MSAAYAVGK
			281	2	AAAYAVGKTQ
			283	1	YAVGKTQSA
			286	3	GKTQSAGGA
			295	2	TNLSPFPAY
			297	2	LSPFPAYPI
			298	1	SPFPAYPIV
			301	2	PAYPIVGG
			303	3	YPIVGGQI
			305	3	IVVGGQIYR
			309	5	GQIYRFGYK
			311	1	IYRFGYKHE
			312	2	YRFGYKHEL

### **9.8 Predicción de epítomos en line de linfocitos T por HLApred MHC-II.**

Se predijeron un total de 204 epítomos de LipI21 y 204 epítomos de OmpL1 para 36 alelos del MHC clase II, al homologar estos resultados se determinaron 23 de epítomos de LipI21 y 24 epítomos de OmpL1. Los epítomos de LipI21 con mayor cobertura de alelos fueron: MINRLIALS con 32 alelos; YIKFSSRAS con 27 alelos; INRLIALSL con 23 alelos; YYIKFSSRA con 17 alelos; LIALSLATM y VKGVGVYEC con 16 alelos y IKFSSRASG con 13 alelos. Mientras que los epítomos de OmpL1 con mayor cobertura fueron: LLILAVALS con 44 alelos; IRNISKALL con 33 alelos; LILAVALSS con 30 alelos; IVIPATVGI con 21 alelos y FLELETIMS con 12 alelos (Cuadro 4).

**Cuadro 4: Epítomos de las proteínas LipL21 y Omp1 de *Leptospira* y su frecuencia en alelos del MHC clase II**

<b>posició n</b>	<b>Frecuenci a</b>	<b>epítomo MHC- II</b>	<b>posició n</b>	<b>frecuenci a</b>	<b>epítomo MHC- II</b>
<b>1</b>	32	MINRLIALS	<b>2</b>	33	IRNISKALL
<b>2</b>	23	INRLIALSL	<b>9</b>	44	LLILAVALS
<b>5</b>	16	LIALSLATM	<b>10</b>	30	LILAVALSS
<b>6</b>	3	IALSLATMI	<b>29</b>	1	IVGFGLQLD
<b>8</b>	2	LSLATMIFA	<b>59</b>	5	VRSTDCTV
<b>13</b>	3	MIFAACSST	<b>87</b>	5	YLGVAPRKA
<b>14</b>	2	IFAACSSTD	<b>103</b>	1	ITLDRTTGG
<b>62</b>	4	WYYIKFSSR	<b>112</b>	1	LINARSTKG
<b>63</b>	17	YYIKFSSRA	<b>113</b>	3	INARSTKGA
<b>64</b>	27	YIKFSSRAS	<b>122</b>	3	MVGGNLMVG
<b>65</b>	13	IKFSSRASG	<b>128</b>	2	MVGYESDFG
<b>76</b>	1	VAKKSQAMM	<b>135</b>	1	FGKYFFWRV
<b>83</b>	3	MMQSTCREA	<b>138</b>	7	YFFWRVAAE
<b>84</b>	4	MQSTCREAS	<b>141</b>	2	WRVAAEYEQ
<b>100</b>	6	VVKKMVGET	<b>175</b>	21	IVIPATVGI
<b>101</b>	2	VKKMVGETV	<b>177</b>	2	IPATVGIKL
<b>104</b>	9	MVGETVESA	<b>181</b>	2	VGIKLNVT
<b>124</b>	5	VIVSQSQGV	<b>183</b>	7	IKLNVTEA

<b>133</b>	16	VKGVGVYEC	193	2	IYMGAGLNY
<b>136</b>	3	VGVECKAT	199	3	LNYFNNGWS
<b>139</b>	2	YECKATGSG	246	6	VRFRRTSGIA
<b>165</b>	4	IYAKFPGGK	272	12	FLELETIMS
<b>176</b>	7	LVAKAQEV	303	2	YPIVVGGQI
			312	9	YRFGYKHEL



## 9.9 Predicción de epítomos en línea de linfocitos B

Se predijeron un total de 19 epítomos de LipL21 y 31 epítomos de OmpL1 para células B, de los cuales se seleccionaron los primeros 15 con mayor score antigénico, para LipL21 resultaron los siguientes epítomos: EGWGGPPEQRNDGKTP, TGQKDATTVGDGGWTF, TGSGSDPKDVSKDNWE, KKMVGETVESASGVSD, TTVGDGGWTFEGWGPP, GVGVECKATGSGSDP, FAACSSTDTGQKDATT, IVSQSQGVVKGVGVE, SRLQGASDVVKKMVE, TPRDTNPKDWYYIKFS, AMMQSTCREASRLQGA, QCVIYAKFPGGKDALV, PGGKDALVAKAQEVSK, KFSSRASGKAVAKKSQ y PEQRNDGKTPRDTNPK. Los 15 epítomos predichos para OmpL1 fueron: NVTEDAAIYMGAGLNY, DTCTVGPNDPTCVQNP, FSSIVIPATVGIKLV, GGITKADIAGYNIVDM, GGLINARSTKGAMVGG, AASYGPVIRSTDTCTV, TLDRTTGGLINARSTK, PTCVQNP GKPTGEGNY, QSAGGATNLSPFPAYP, LETIMSAAYAVGKTQS, GGTITKDGLDAASYG, PVTTREHVRFRFTSGIA, IADGTDPVTTREHVRF, GHDILAAAGAGSVVNL y YNIVDMTWGFSSIVIP (Cuadro 5).

**Cuadro 5: Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de *Leptospira* para células**

**B**

LIPL21			OMPL1		
Rango	Secuencia	score	rango	secuencia	Score
1	EGWGGPPEQRNDGKTP	0.93	1	NVTEDAAIYMGAGLNY	0.95
1	TGQKDATTVGDGGWTF	0.93	2	DTCTVGPNDPTCVQNP	0.92
2	TGSGSDPKDVSKDNWE	0.92	3	FSSIVIPATVGIKLVN	0.91
3	KKMVGETVESASGVSD	0.9	4	GGITKADIAGYNIVDM	0.9
4	TTVGDGGWTFEGWGGP	0.87	5	GGLINARSTKGAMVGG	0.89
4	GVGVYECKATGSGSDP	0.87	6	AASYYPVVRSTDTCTV	0.88
5	FAACSSTDTGQKDATT	0.85	7	TLDRTTGGLINARSTK	0.87
5	IVSQSQGVVKGVGVE	0.85	8	PTCVQNPVKPTGEGNY	0.85
6	SRLQGASDVVKKMVGE	0.84	8	QSAGGATNLSPFPAYP	0.85
7	TPRDTNPKDWYYIKFS	0.83	8	LETIMSAAYAVGKTQS	0.85
8	AMMQSTCREASRLQGA	0.82	9	GGITKDGLDAASYYG	0.83
8	QCVIYAKFPGGKDALV	0.82	9	PVTTREHVRFRVTSIA	0.83
9	PGGKDALVAKAQEVSK	0.8	10	IADGTDPVTTREHVRV	0.82
10	KFSSRASGKAVAKKSQ	0.78	10	GHDILAAAGAGSVVNL	0.82
11	PEQRNDGKTPRDTNPK	0.77	11	YNIVDMTWGFSSIVIP	0.81

### **9.10 Predicción de alergenicidad y toxicidad**

Una vez analizada la alergenicidad y toxicidad de cada péptido, fueron descartados aquellos epítotos que fueron considerados como posible alérgeno y/o tóxico fueron descartados (Anexos 1, 2, 3 y 4) dando como resultado 40 epítotos de LipL21 y 49 de OmpL1 para el MHC de clase I (Cuadro 6); para el MHC de clase II resultaron 9 péptidos de LipL21 y 6 de OmpL1 (Cuadro 7). 11 epítotos de LipL21 y 12 de OmpL1 resultaron viables para células B (Cuadro 8).

### **9.11 Análisis de mimetismo molecular y cobertura en la población**

El mimetismo molecular analizado por MHCpred mostró que todas las moléculas predichas como epítotos no mantenían identidad con humanos (Anexos 5 y 6).

Se analizaron los epítotos contra su unión con las moléculas de MHC para conocer la cobertura en la población, los epítotos de LipL21 con mayor cobertura alélica de MHC clase I fueron: INRLIALSL con cobertura en 7 alelos; VGDGGWTFE<sup>II</sup> y RDTNPKDWY con 5 alelos; RASGKAVAK, VVKKMVGET, VSQSQGVVK, SQGVVKGVG y KFPGGKDAL con cobertura en 4 alelos (Figura 21). En OmpL1 los epítotos con mayor cobertura de alélica fueron: QNPGKPTGE con 8 alelos cubiertos; GQLGGTITK con 6 alelos; KDGLDAASY y ADIAGYNIV con 4 alelos (Figura 22).

Los epítotos de LipL21 con mayor cobertura en el MHC de clase II fueron: INRLIALSL con cobertura en 23 alelos; YYIKFSSRA con 17 alelos; LIALSLATM y VKGVGVYEC con 16 alelos; IKFSSRASG con 13 alelos (Figura 23). En OmpL1 los epítotos con más cobertura alélica fueron: YFFWRVAAE, VRFRTSGIA y VRSTDTCTV con 7, 6 y 5 alelos cubiertos respectivamente (Figura 24).

**Cuadro 6: Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de *Leptospira* para MHC clase I no considerados tóxicos ni como alérgenos**

LIPL21			OmpL1		
Posición	frecuencia	epítopo	Posición	Epítopo	frecuencia
2	7	INRLIALSL	1	MIRNISKAL	1
22	1	DTGQKDATT	4	NISKALLIL	1
28	2	ATTVGDGGW	19	AASLSAKTY	1
31	5	VGDGGWTFE	24	AKTYAIVGF	2
35	1	GWTFEGWGG	25	KTYAIVGFG	1
38	2	FEGWGGPPE	26	TYAIVGFGL	2
40	2	GWGGPPEQR	33	GLQLDLGQL	1
41	1	WGGPPEQRN	39	GQLGGTITK	6
44	2	PPEQRNDGK	47	KDGLDAASY	4
45	2	PEQRNDGKT	59	VRSTDTCTV	1
48	1	RNDGKTPRD	69	PNDPTCVQN	2
55	5	RDTNPKDWY	72	PTCVQNPBK	1
60	2	KDWYYIKFS	76	QNPBKPTGE	8
70	4	RASGKAVAK	79	GKPTGEGNY	3
78	1	KKSQAMMQS	82	TGEGNYLGV	1
79	2	KSQAMMQST	85	GNYLGVAPR	2
86	2	STCREASRL	86	NYLGVAPRK	2
91	1	ASRLQGASD	93	RKAIPAENR	3

95	2	QGASDVVKK	99	ENRLITLDR	1
98	1	SDVVKKMVG	101	RLITLDRTT	1
100	4	VVKKMVGET	104	TLDRTTGGL	3
116	2	SDGEATASV	105	LDRTTGGLI	2
117	1	DGEATASVI	108	TTGGLINAR	2
118	3	GEATASVIV	116	RSTKGAMVG	1
122	3	ASVIVSQSQ	130	GYESDFGKY	1
126	4	VSQSQGVVK	131	YESDFGKYF	1
128	1	QSQGVVKGV	133	SDFGKYFFW	3
129	4	SQGVVKGVG	140	FWRVAAEYT	2
130	2	QGVVKGVG	141	WRVAAEYTQ	1
131	3	GVVKGVG	147	YTQKISGGI	2
132	2	VVKGVG	148	TQKISGGIT	3
133	1	VKGVGVYEC	149	QKISGGITK	3
139	1	YECKATGSG	158	ADIAGYNIV	4
142	1	KATGSGSDP	180	TVGIKLNVT	1
143	2	ATGSGSDPK	181	VGIKLN	1
151	1	KDVSKDNWE	184	KLNVTEDAA	1
159	3	EECQC	191	AAIYMGAGL	1
160	1	ECQC	193	IYMGAGLNY	1
167	2	AKFPGGKDA	198	GLNYFN	1
168	4	KFPGGKDAL	202	FNGGWSLNG	1
			207	SLNGSNNLK	2

			210	GSNNLKGGH	2
			211	SNNLKGGHD	1
			214	LKGGHDILA	2
			221	LAAAGAGSV	2
			222	AAAGAGSVV	1
			246	VRFRTSGIA	1
			264	RVTDKGHVF	1
			305	IVVGGQIYR	3

**Cuadro 7: Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de *Leptospira* para MHC clase II no considerados tóxicos ni como alérgenos**

<b>LIPL21</b>			<b>OMPL1</b>		
<b>Posición</b>	frecuencia	epítopo	posición	frecuencia	epítopo
<b>2</b>	23	INRLIALSL	59	5	VRSTDTCTV
<b>5</b>	16	LIALSLATM	138	7	YFFWRVAAE
<b>63</b>	17	YYIKFSSRA	141	2	WRVAAEYEQ
<b>65</b>	13	IKFSSRASG	181	2	VGIKLVNTE
<b>100</b>	6	VVKKMVGET	193	2	IYMGAGLNY
<b>104</b>	9	MVGETVESA	246	6	VRFRRTSGIA
<b>124</b>	5	VIVSQSQGV			
<b>133</b>	16	VKGVGVYEC			
<b>139</b>	2	YECKATGSG			

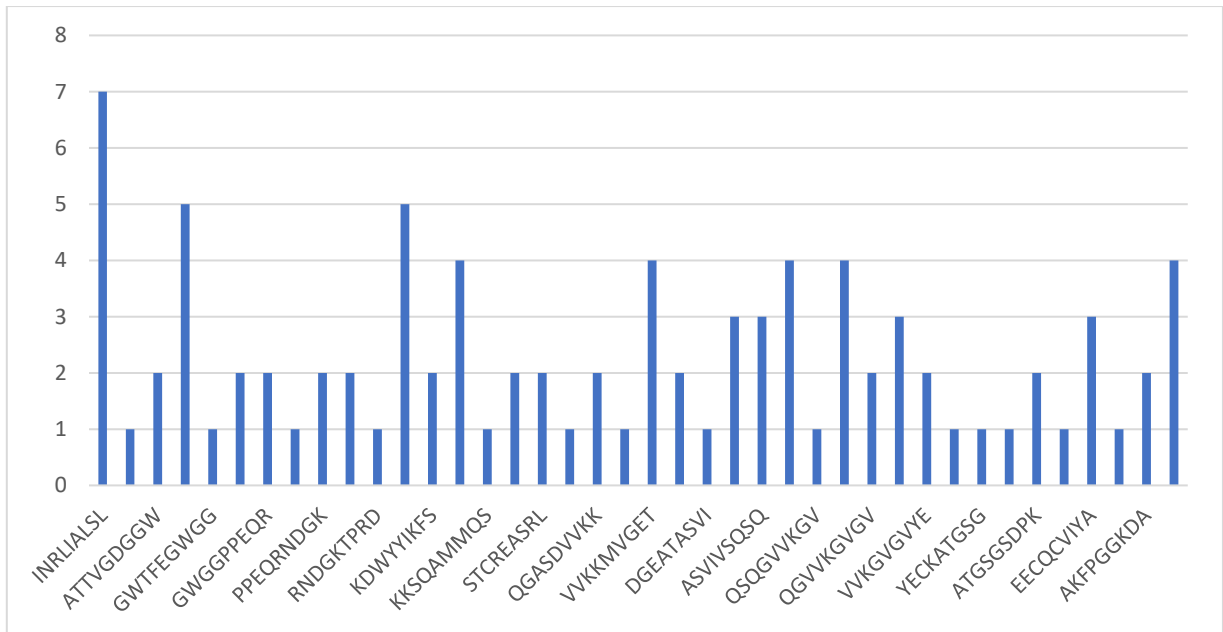
**Cuadro 8: Epítomos de las proteínas LipL21 y OmpL1 de *Leptospira* para células**

**B no considerados tóxicos ni como alérgenos**

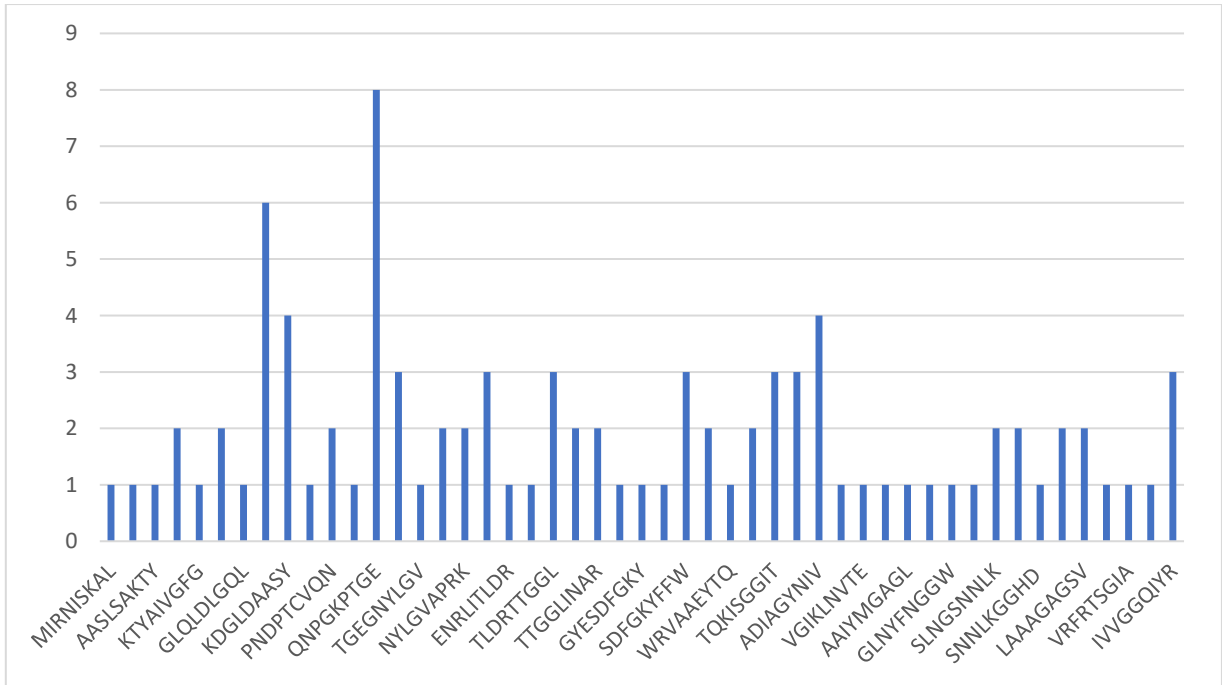
LIPL21				OMPL1			
Ran go	Secuencia	posici ón	scor e	rang o	Secuencia	posici ón	scor e
1	TGQKDATTVGDGG WTF	23	0.9 3	1	NVTEDAAIYMGAG LNY	186	0.9 5
3	KKMVGETVESASG VSD	102	0.9	3	FSSIVIPATVGIKLN V	172	0.9 1
4	TTVGDGGWTFEG WGGP	29	0.8 7	4	GGITKADIAGYNIV DM	153	0.9
4	GVGVEECKATGSG SDP	135	0.8 7	5	GGLINARSTKGAM VGG	110	0.8 9
5	FAACSSTDTGQKD ATT	15	0.8 5	6	AASYYPVVRSTDT CTV	52	0.8 8
6	SRLQGASDVVKKM VGE	92	0.8 4	7	TLDRTTGGLINAR STK	104	0.8 7
8	AMMQSTCREASRL QGA	82	0.8 2	8	PTCVQNPVKPTG EGNY	72	0.8 5
8	QCVIYAKFPGGKD ALV	162	0.8 2	8	LETIMSAAYAVGK TQS	275	0.8 5
9	PGGKDALVAKAQE VSK	170	0.8	9	GGTITKDGLDAAS YYG	42	0.8 3



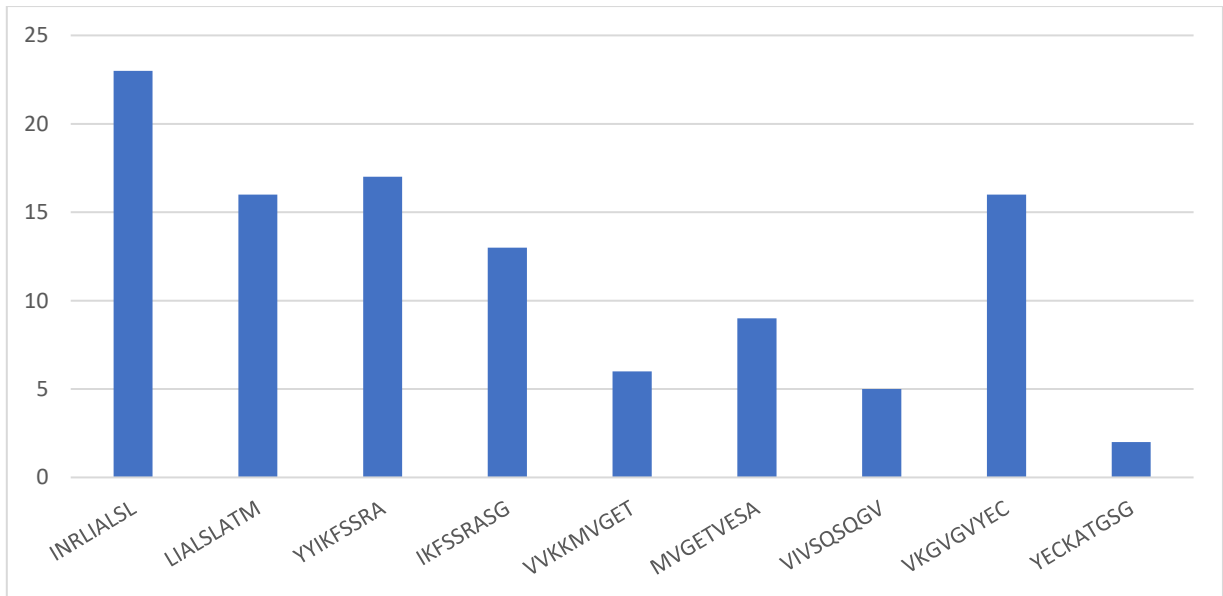
10	KFSSRASGKAVAK KSQ	66	0.7 8	9	PVTTREHVRFRTS GIA	239	0.8 3
11	PEQRNDGKTPRDT NPK	45	0.7 7	10	IADGTDPVTTREH VRF	233	0.8 2
				11	YNIVDMTWGFSSI VIP	163	0.8 1



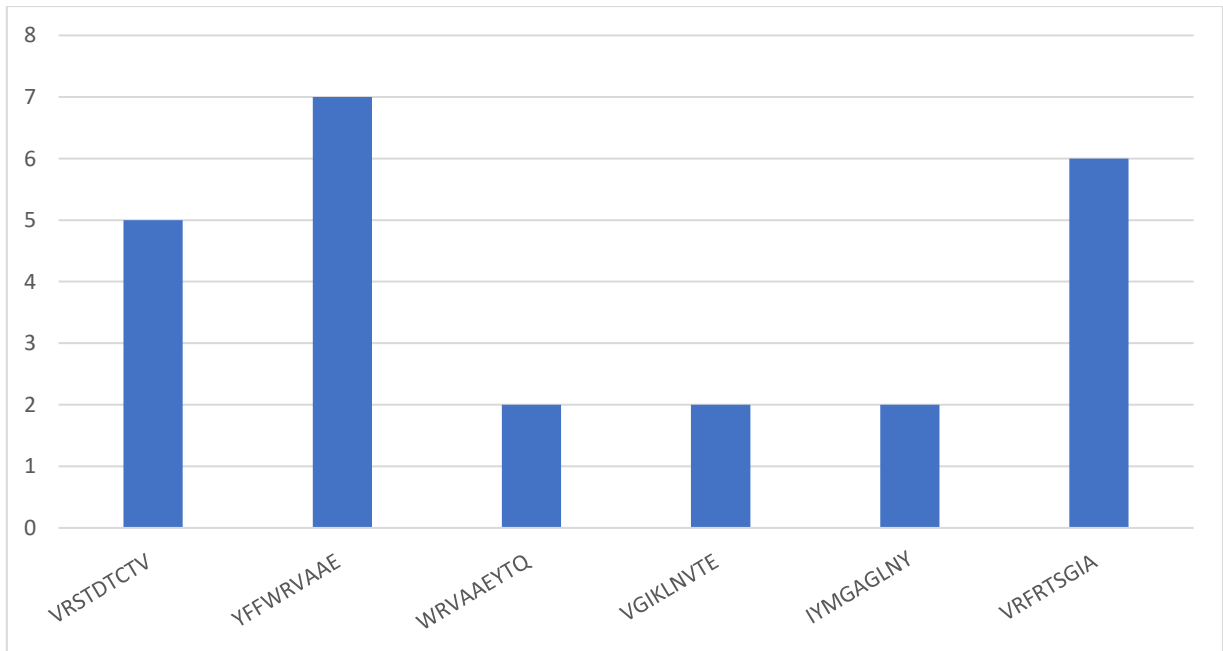
**Figura 21: Cobertura de epítomos de LipL21 en alelos MHC clase I.** se obtuvo 1 epítomo de LipL21 con unión a 7 alelos del MHC clase I, 2 epítomos con unión a 5 alelos, 5 epítomos con unión a 4 alelos, 4 epítomos con unión a 3 alelos, 14 epítomos con unión a 2 alelos y 14 epítomos con unión a 1 alelo.



**Figura 22: Cobertura de epítomos de OmpL1 en alelos MHC clase I.** se obtuvo 1 epítomo de OmpL1 con unión a 8 alelos del MHC clase I, 1 epítomo con unión a 6 alelos, 2 epítomos con unión a 4 alelos, 7 epítomos con unión a 3 alelos, 13 epítomos con unión a 2 alelos y 25 epítomos con unión a 1 alelo.



**Figura 23: Cobertura de epítomos de LipL21 en alelos MHC clase II.** se obtuvo 1 epítomo de LipL21 con unión a 23 alelos del MHC clase II, 1 epítomo con unión a 17 alelos, 2 epítomos con unión a 16 alelos, 1 epítomo con unión a 13 alelos, 1 epítomo con unión a 9 alelos, 1 epítomo con unión a 6 alelos, 1 epítomo con unión a 5 alelos y 1 epítomos con unión a 2 alelos.



**Figura 24: Cobertura de epítomos de OmpL1 en alelos MHC clase II.** se obtuvo 1 epítomo de OmpL1 con unión a 7 alelos del MHC clase II, 1 epítomo con unión a 6 alelos, 1 epítomo con unión a 5 alelos y 3 epítomos con unión a 2 alelos.

## X. DISCUSIÓN

### 10.1 Descripción de la población

En este estudio se incluyeron todas las muestras de pacientes que presentaban un cuadro febril de etiología desconocido con el fin de analizarlas en busca de *Leptospira* como agente causal del padecimiento, ya que este patógeno ha sido reportado en Culiacán Sinaloa (Hernández et al., 2017; Hernández et al, 2020). ; sin embargo, la frecuencia de infección se determinó mediante pruebas serológicas, por lo que este es el primer estudio realizado en Sinaloa mediante el uso de técnicas moleculares. La muestra utilizada en nuestro estudio fue sangre debido a que los pacientes presentaban síntomas al momento de tomar la muestra lo que indicaba una fase de leptospiremia donde el genoma de *Leptospira* puede ser detectado mayormente en este tejido (Cespedes, 2005; Limothai et al., 2021).

### 10.2 Extracción de material genético

Se obtuvo una buena calidad en el ADN de las muestras analizadas ya que se visualizó por electroforesis en geles de agarosa una banda integra en la mayoría de las muestras, y una tenue estela a lo largo del recorrido de la banda de ADN (Banco adn, 2020).

### 10.3 Amplificación del gen $\beta$ -actina

Aunque hubo muestras en las que no fue posible visualizar el ADN recuperado, se realizó la amplificación de un fragmento del gen de la  $\beta$ -actina, por lo que se incluyeron en el estudio para amplificar genoma de *Leptospira*, ya que en ocasiones la concentración de DNA obtenido es baja e insuficiente para ser observado utilizando

el transiluminador; Sin embargo, gracias a la alta sensibilidad de la técnica de PCR el DNA presente en estas muestras puede ser amplificado (Sea-liang et al., 2019)

Con esto también se pudo corroborar la especificidad de los primer diseñados ya que la amplificación del gen mostro únicamente la banda esperada de 822 pb correspondientes al fragmento del gen  $\beta$ -actina y no se mostraron bandas inespecíficas.

#### **10.4 Identificación de *Leptospira* por PCR**

Se demostró a presencia de *Leptospira* en 20 de las 109 muestras humanas analizadas con sintomatología febril, lo que corresponde a 18.35% de positividad en este grupo, cabe mencionar que los pacientes presentaban sintomatología febril de etiología desconocida por lo que los síntomas en las muestras donde no se encontró el genoma de *Leptospira* podría estar siendo causada por algún otro agente etiológico común en la región como: el virus del dengue, bacterias del tipo de las rickettsias, o bórrela, entre otros (Ramírez et al., 2009; López-Castillo et al., 2019; Rodríguez-García et al., 2018).

Los resultados mostrados en los pacientes sin sintomatología nos permiten identificar al grupo de la población que cursa con la enfermedad de manera asintomática, que si bien no es un riesgo para su salud pueden fungir como transmisores de la enfermedad (Ashford et al., 2000). Sin embargo, en este grupo no se debe de descartar una leptospiruria dado que la bacteria se encuentra mayormente en la orina de los pacientes y el resultado mostrado podría vere afectado al analizar este tipo de muestra (Cespedes, 2005). Por lo que es recomendable realizar tanto pruebas

serológicas como moleculares para determinar la fase de la infección y tener certeza en el diagnóstico, con el fin de administrar el tratamiento apropiado.

Comparado los resultados con otros estudios realizados en la región por Hernández y colaboradores en el 2017 donde analizaron muestras de sangre de donadores por serología encontrando una positividad del 3 %, si bien el porcentaje encontrado por Hernández es inferior al encontrado en este trabajo puede deberse al método de diagnóstico utilizado ya que ellos utilizaron un estudio serológico en comparación a la técnica de PCR utilizada en este estudio, la cual se ha reportado una alta sensibilidad inclusive en la etapa inicial de la enfermedad un cuando los anticuerpos son indetectables por las pruebas serológicas además que en nuestro estudio se incluyeron personas con sintomatología febril (Sandoval et al., 2018).

Por otra parte, el 9% de positividad en las muestras caninas reportado en este estudio comparado por lo reportado por Hernández en el 2020 donde el porcentaje de positividad fue del 17% cabe mencionar que su muestreo fue dirigido a las mascotas y colonias de las personas que fueron positivas en su estudio del año 2017 lo que puede explicar el porcentaje de positividad mayor, este comportamiento ya ha sido observado por otros grupos de investigación donde se menciona la coinfección entre personas y sus mascotas. Los perros son considerados uno de los reservorios más importantes en la transmisión de la enfermedad debido al contacto que tienen tanto con animales silvestres, así como con el ser humanos, aunado a que el diagnóstico de leptospirosis canina no es común en la práctica veterinaria facilitan la zoonosis (Azócar-Aedo et al., 2014).



## **10.5 Análisis de las secuencias de las proteínas LipL21, LipL32, LipL41 y OmpL1**

La expresión de las proteínas LipL21 LipL32, LipL41 y OmpL1 están implicadas en la patogénesis de *Leptospira* y han sido blanco para el desarrollo de nuevas técnicas de detección de la bacteria, así como la producción de vacunas (Baquero Parra et al., 2010); sin embargo, aún no se cuenta con una vacuna aprobada para su uso en humanos, por lo que el estudio de estas proteínas podría ayudarnos al desarrollo de una vacuna profiláctica y con ello disminuir la frecuencia de a infección como los casos de muerte.

### **10.6. Potencial inmunogénico de las proteínas *LipL21, LipL32, LipL41* y *OmpL1* de *Leptospira*.**

La utilización de herramientas bioinformáticas como VaxiJen tiene como ventaja la rapidez de analizar una gran numero de proteínas y seleccionar las que tengan mayor probabilidad de funcionar como antígenos potentes (Doytchinova & Flower, 2007). Al analizar las 4 proteínas; *LipL21, LipL32, LipL41* y *OmpL1* fueron seleccionadas LipL21 y OmpL1 por haber presentado mayor score antigénico comparado con LipL32 y LipL41.

#### **10.6.1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas *LipL21, LipL32, LipL41* y *OmpL1* de *Leptospira*.**

Las propiedades fisicoquímicas de una proteína nos ayudan a inferir si esta puede ser un candidato potencial como inmunógeno debido a parámetros establecidos, por ejemplo, aquellas proteínas con peso entre 10 mil y 100 mil Da y un índice de estabilidad menor a 40 son consideradas como inmunógenos potentes

(Viviana Barreto et al., 2012). Siguiendo estos parámetros las proteínas LipI21 con peso de 19661.03 Da y un índice de estabilidad de 34.14, LipI32 de 272 con un peso de 29612.97 Da y un índice de estabilidad de 32.53, LipI41 con un peso de 38952.80 Da y un índice de estabilidad de 25.46 y OmpL1 de 320 con un peso de 33491.11 Da con un índice alifático de 88.78 son candidatos ideales para la búsqueda de epítomos inmunogénicos para el desarrollo de vacunas.

además, nuestros resultados muestran que son proteínas estables y tienen una vida media de 30 hrs lo que facilita su manipulación en condiciones de laboratorio.

El bajo coeficiente de GRAVY mostrado por las 4 proteínas pueden establecer interacciones con el agua y estar altamente hidratadas en este medio indicando su exposición fuera de la membrana de la bacteria (Viviana Barreto et al., 2012).

## XI. CONCLUSIONES

### 11.1. Conclusión general

Este es el primer estudio en Sinaloa donde se busca genoma bacteriano en muestras con cuadro febril de etiología desconocida, lo cual permite identificar la fase leptospirémica de la enfermedad.

El análisis *in silico* de los genes y de las proteínas de membrana de *Leptospira* puede esclarecer el proceso patogénico de *Leptospira*; así como, el análisis *in vivo*, establecer medidas de prevención en contra de la enfermedad ocasionada por esta, como la implementación de vacunas, evitando así cuadros severos de la enfermedad.

### 11.2. Conclusiones específicas

11.2.1 Se obtuvo una frecuencia de positividad del 18.35% en las muestras humanas febriles, 1.8% en las muestras humanas sin sintomatología y 9% en las muestras caninas.

11.2.2 El gen *lipL32* del genoma de *Leptospira*, es un blanco apropiado para establecer el diagnóstico de la leptospirosis humana, así como de la enfermedad en animales.

11.2.3 Se predijeron 40 epítomos de LipL21 y 49 de OmpL1 para el MHC de clase I como candidatos para el desarrollo de vacunas.

11.2.4 se predijeron 9 epítomos de LipL21 y 6 de OmpL1 para el MHC de clase II como candidatos para el desarrollo de vacunas.

11.2.5 Se seleccionaron 11 epítomos de LipL21 y 12 de OmpL1 para células B con potencial uso para el desarrollo de vacunas.

## XII.PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Analizar muestras de sangre y orina de los participantes con el fin de no descartar a los que se encuentren en la fase de leptospiruria o leptospirosis crónica.
2. Buscar las especies circulantes tanto en muestras biológicas y ambientales con el fin de entender el mecanismo de transmisión y patogénico de *Leptospira* en nuestra región.
3. Analizar *in vivo* los epítomos predichos *in silico* para corroborar su potencial inmunogénico y descartar efectos adversos.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M., Pandey, R. K., Khatoon, N., Narula, A., Mishra, A., & Prajapati, V. K. (2017). Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. *Scientific Reports*, 7(1), 9232. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09199-w>
- Anand, R., Biswal, S., Bhatt, R., & Tiwary, B. N. (2020). Computational perspectives revealed prospective vaccine candidates from five structural proteins of novel SARS corona virus 2019 (SARS-CoV-2). *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.9855>
- Ashford, D. A., Kaiser, R. M., Spiegel, R. A., Perkins, B. A., Weyant, R. S., Bragg, S. L., Plikaytis, B., Jarquin, C., De Lose Reyes, J. O., & Amador, J. J. (2000). Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63(5–6), 249–254.
- Azócar-Aedo, L., Smits, H., & Monti, G. (2014). Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(3), 337–348. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300002>
- Ballados-González, G. G., Sánchez-Montes, S., Romero-Salas, D., Colunga Salas, P., Gutiérrez-Molina, R., León-Paniagua, L., Becker, I., Méndez-Ojeda, M. L., Barrientos-Salcedo, C., Serna-Lagunes, R., & Cruz-Romero, A. (2018). Detection of pathogenic *Leptospira* species associated with phyllostomid bats (Mammalia:

Chiroptera) from Veracruz, Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), 773–781. <https://doi.org/10.1111/tbed.12802>

Banco, E. (s/f). *PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN*. [https://cit.ligue-cancer.net/CIT\\_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-](https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-)

Baquero Parra, M., Gómez, A. P., & Hernández Rodríguez, P. (2010). Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, 101–111.

Bhatia, M., Umapathy, B., & Navaneeth, B. (2015). An evaluation of dark field microscopy, culture and commercial serological kits in the diagnosis of leptospirosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(3), 416. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.158570>

Carvalho-Pereira, J., Fernandes, F., Araújo, R., Springer, J., Loeffler, J., Buitrago, M. J., Pais, C., & Sampaio, P. (2020). Multiplex PCR Based Strategy for Detection of Fungal Pathogen DNA in Patients with Suspected Invasive Fungal Infections. *Journal of Fungi*, 6(4), 308. <https://doi.org/10.3390/jof6040308>

Céspedes Chaves, E., Portillo, N., Thomaz-Soccol, V., Gonçalves, A. L., & González Brítez, N. (2017). Estandarización de la técnica de PCR-RFLP de la región ITS1, para la caracterización molecular de *Leishmania* (L) *infantum*, en muestras

caninas. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(3), 24–33. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)24-033](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(03)24-033)

Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: Enfermedades zoonotica reemergente. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 22(4), 290–307.

Céspedes, M., Tapia, R., Balda, L., Gonzalez, D., Peralta, C., & Condori, P. (2007). Estandarización Y validación de una prueba de reacción en cadena polimerasa (PCR) para el diagnostico precoz de leptospirosis humana. *Perú Med Exp Salud Pública*, 24(1), 20–26.

DGE. (2019). *Boletin epidemiologico*, 36(19), 37.

Dietrich, M., Mühldorfer, K., Tortosa, P., & Markotter, W. (2015). Leptospira and Bats: Story of an Emerging Friendship. *PLOS Pathogens*, 11(11), e1005176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005176>

Djadid, N. D., Ganji, Z. F., Gouya, M. M., Rezvani, M., & Zakeri, S. (2009). A simple and rapid nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63(3), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.10.017>

Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>

Evangelista, K. V, & Coburn, J. (2010). *immune responses*. 1413–1425.

Evangelista, K. V., & Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an Emerging Pathogen: A Review of its Biology, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Future Microbiology*, 5(9), 1413–1425. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.102>

Galanis, K. A., Nastou, K. C., Papandreou, N. C., Petichakis, G. N., Pigis, D. G., & Iconomidou, V. A. (2021). Linear B-cell epitope prediction for in silico vaccine design: A performance review of methods available via command-line interface. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 6, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22063210>

Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Burth, P., Silva, A. R., Younes-Ibrahim, M., Castro-Faria-Neto, H. C., & Castro-Faria, M. V. (2012). *Leptospira* and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/317950>

Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Cunha, C. M. C. da, Castro, L. V. G. de, Martins, C. de A., Barnese, M. R. C., Burth, P., & Younes-Ibrahim, M. (2023). Cellular Pathophysiology of Leptospirosis: Role of Na/K-ATPase. *Microorganisms*, 11(7), 1695. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071695>

Guadalupe Ramírez Zepeda, M., de, D., Guadalupe Ramírez-Zepeda, M., Eduardo Velasco-Mondragón, H., Ramos, C., Peñuelas, J. E., Antonio Maradiaga-Ceceña, M., Murillo-Llanes, J., Rivas-Llamas, R., & Chaín-Castro, R. (2009). Investigación original / Original research Forma de citar. En *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* (Vol. 25, Número 1).



- Guerrier, G., & D'Ortenzio, E. (2013). The Jarisch-Herxheimer Reaction in Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 8(3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059266>
- Hernández Ramírez, C. V., Gaxiola Camacho, S. M., Osuna Ramírez, I., Enríquez Verdugo, I., Castro Del Campo, N., & López Moreno, H. S. (2017). Prevalence and risk factors associated with serovars of leptospira in dogs from culiacan, sinaloa. *Veterinaria Mexico*, 4(2). <https://doi.org/10.21753/vmoa.4.2.369>
- Hernández-ramírez Carlos, Gaxiola-camacho Soila, Enríquez-Verdugo Idalia, Rivas-llamas Ramón, Osuna-ramírez Ignacio. (2020). *Leptospira serovars and of contagion risks in humans and dogs from Culiacan City , in Sinaloa , Mexico. December*, 1–16.
- Jorge, S., Kremer, F. S., Oliveira, N. R. de, Navarro, G. de O. S. V., Guimarães, A. M., Sanchez, C. D., Woloski, R. D. dos S., Ridieri, K. F., Campos, V. F., Pinto, L. da S., & Dellagostin, O. A. (2018). Whole-genome sequencing of *Leptospira interrogans* from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(2), 80–86.  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760170130>
- Karkhah, A., Saadi, M., & Nouri, H. R. (2017). In silico analyses of heat shock protein 60 and calreticulin to designing a novel vaccine shifting immune response toward T helper 2 in atherosclerosis. *Computational Biology and Chemistry*, 67, 244–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.01.011>

Kozyk, M., Strubchevska, K., & Nadeau, B. (2022). Leptospirosis: A Rare Cause of Hyperbilirubinemia and Acute Kidney Injury in a Non-endemic Area. *Cureus*.  
<https://doi.org/10.7759/cureus.30963>

*Leptospirosis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.* (s/f).

Recuperado el 8 de diciembre de 2023, de  
<https://www.paho.org/es/temas/leptospirosis>

Limothai, U., Lumlertgul, N., Sirivongrangson, P., Kulvichit, W., Tachaboon, S., Dinhuzen, J., Chaisuriyong, W., Peerapornratana, S., Chirathaworn, C., Praditpornsilpa, K., Eiam-Ong, S., Tungsanga, K., & Srisawat, N. (2021). The role of leptospiremia and specific immune response in severe leptospirosis. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94073-z>

López Robles, G., Córdova Robles, F. N., Sandoval Petris, E., & Montalvo Corral, M. (2021). Leptospirosis at human-animal-environment interfaces in Latin-America: drivers, prevention, and control measures. *Biotecnia*, 23(3).  
<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i3.1442>

López-Castillo, D. C., Vaquera-Aparicio, D., González-Soto, M. A., Martínez-Ramírez, R., Rodríguez-Muñoz, L., Solórzano-Santos, F., López-Castillo, D. C., Vaquera-Aparicio, D., González-Soto, M. A., Martínez-Ramírez, R., Rodríguez-Muñoz, L., & Solórzano-Santos, F. (2019). Fiebre manchada de montañas rocosas: experiencia en 5 años de vigilancia activa en un hospital pediátrico de segundo nivel en el noreste de México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 75(5), 303–308. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000034>

- Malik, A. A., Ojha, S. C., Schaduangrat, N., & Nantasenamat, C. (2022). ABCpred: a webserver for the discovery of acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitors. *Molecular Diversity*, 26(1), 467–487. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10292-6>
- Martin PL, Arauz, S. N. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares : ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. *Analecta Vet*, 35(1), 26–38. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/47889>
- Miraglia, F., Matsuo, M., Morais, Z. M., Dellagostin, O. A., Seixas, F. K., Freitas, J. C., Hartskeerl, R., Moreno, L. Z., Costa, B. L., Souza, G. O., Vasconcellos, S. A., & Moreno, A. M. (2013). Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003>
- Moreno, N., & Agudelo-Flórez, P. (2010). Application of conventional and multiplex PCR assays for identification of isolates of leptospira spp. in Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 27(4), 548–556. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342010000400009>
- Organización Panamericana de la salud / Organización Mundial de la Salud. (2017). Leptospiriosis - Notas Descriptivas. *Organizacion Panamerica de la Salud*, 1, 1–9. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospiriosis&catid=4784%3Aleptospiriosis-contents&Itemid=0&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospiriosis&catid=4784%3Aleptospiriosis-contents&Itemid=0&lang=es)

- Patra, K. P., Choudhury, B., Matthias, M. M., Baga, S., Bandyopadhyaya, K., & Vinetz, J. M. (2015). Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. *BMC Microbiology*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0581-7>
- Perez, J., & Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC microbiology*, *10*, 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325>
- Petakh, P., Isevych, V., Kamyshnyi, A., & Oksenyich, V. (2022). Weil's Disease—Immunopathogenesis, Multiple Organ Failure, and Potential Role of Gut Microbiota. *Biomolecules*, *12*(12), 1830. <https://doi.org/10.3390/biom12121830>
- Piredda, I., Ponti, M. N., Palmas, B., Noworol, M., Pedditzi, A., Rebechesu, L., & Chisu, V. (2021). Molecular typing of pathogenic leptospira species isolated from wild mammal reservoirs in sardinia. *Animals*, *11*(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani11041109>
- Riazi, M., Zainul, F. Z., Bahaman, A. R., Amran, F., & Khalilpour, A. (2014). Role of 72 kDa protein of *Leptospira interrogans* as a diagnostic marker in acute leptospirosis. *Indian Journal of Medical Research*, *139*(FEB), 308–313.
- Rodríguez-García, A., Arroyo-Garza, I., Patiño-Ramirez, B. E., Rodríguez-García, A., Arroyo-Garza, I., & Patiño-Ramirez, B. E. (2018). Uveítis secundaria a Borreliosis de Lyme en México. *Revista Mexicana de Oftalmología*, *94*(1S), 39–45. <https://doi.org/10.24875/RMO.M18000039>

- Romero-Vivas, C. M., & Falconar, A. K. (2016). *Leptospira* spp. and human leptospirosis. *Salud Uninorte*, 32(1), 122–143.  
<https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>
- Salod, Z., & Mahomed, O. (2022). Mapping Potential Vaccine Candidates Predicted by VaxiJen for Different Viral Pathogens between 2017–2021—A Scoping Review. En *Vaccines* (Vol. 10, Número 11). MDPI.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines10111785>
- San Martin, F., Fule, L., Iraola, G., Buschiazzo, A., & Picardeau, M. (2023). Diving into the complexity of the spirochetal endoflagellum. *Trends in Microbiology*, 31(3), 294–307. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.09.010>
- Sánchez-Montes, S., Espinosa-Martínez, D. V., Ríos-Muñoz, C. A., Berzunza-Cruz, M., & Becker, I. (2015). Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and potential distribution of human cases. *PLoS ONE*, 10(7), 1–16.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133720>
- Sandoval Petris, E., Avilés Acosta, M., Montesinos Cisneros, R. Ma., Montalvo Corral, M., & Tejeda Mansir, A. (2018). Estudio comparativo del diagnóstico de leptospirosis mediante PCR y MAT en el noroeste de México. *Acta Universitaria*, 28(4), 50–55. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1625>
- Sea-liang, N., Sereemasapun, A., Patarakul, K., Gaywee, J., Rodkvamtook, W., Srisawat, N., Wacharapulsadee, S., & Hemachudha, T. (2019). Development of multiplex PCR for neglected infectious diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), e0007440. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007440>

Secretaría de Salud, & Dirección General de Epidemiología. (2017).

*Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx.* Boletín Epidemiológico. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades*

*Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

Taheri-Anganeh, M., Savardashtaki, A., Vafadar, A., Movahedpour, A., Shabaninejad,

Z., Maleksabet, A., Amiri, A., Ghasemi, Y., & Irajie, C. (2021). In silico design and evaluation of PRAME+FliC  $\delta$ D2D3 as a new breast cancer vaccine candidate.

*Iranian Journal of Medical Sciences*, 46(1), 52–60.

<https://doi.org/10.30476/ijms.2019.82301.1029>

Taylor, A. J., Paris, D. H., & Newton, P. N. (2015). A Systematic Review of the

Mortality from Untreated Leptospirosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(6),

e0003866. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003866>

Vieira, M. L., Teixeira, A. F., Pidde, G., Ching, A. T. C., Tambourgi, D. V.,

Nascimento, A. L. T. O., & Herwald, H. (2018). *Leptospira interrogans* outer membrane protein lipL21 is a potent inhibitor of neutrophil myeloperoxidase.

*Virulence*, 9(1), 414–425. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1407484>

Viviana Barreto, L., Emílio Barreto, G., Morales, L., Emilio Acevedo, O., & González

Santos, J. (2012). *Proteína LIC10494 de Leptospira interrogans serovar*

*Copenhageni: modelo estructural y regiones funcionales asociadas* (Vol. 17).

[www.javeriana.edu.co/universitas\\_scientiarum](http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum)

Zaheer, T., Waseem, M., Waqar, W., Dar, H. A., Shehroz, M., Naz, K., Ishaq, Z., Ahmad, T., Ullah, N., Bakhtiar, S. M., Muhammad, S. A., & Ali, A. (2020). Anti-COVID-19 multi-epitope vaccine designs employing global viral genome sequences. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.9541>

## XIV. ANEXOS

### 14.1 Documentos complementarios

Anexo 1: Epítomos de LipL21, unión al MHC de clase 1 y predicción de toxicidad y alergenidad

alelo	nive l	Posició n	secuencia	Puntaj e	predicció n	toxicida d	alergenida d
<b>HLA-A1</b> Threshold(3%) = 4.210	1	56	DTNPKDWYY	7.15	binder	NO	SI
	2	55	RDTNPKDWY	6.6	binder	NO	NO
	3	25	QKDATTVGD	5.68	binder	NO	SI
	4	139	YECKATGSG	5.53	binder	NO	NO
<b>HLA-A2</b> Threshold(3%) = 2.190	1	35	GWTFEGWG G	4.18	binder	NO	NO
	2	4	RLIALSLAT	4.09	binder	NO	SI
	3	171	GGKDALVAK	3.2	binder	NO	SI
	4	172	GKDALVAKA	3.06	binder	NO	SI
<b>HLA-A*0201</b> Threshold(3%) = 7.470	1	4	RLIALSLAT	13.19	binder	NO	SI
	2	29	TTVGDGGW T	7.73	binder	NO	SI
	3	58	NPKDWYYIK	6.1	no binder	NO	SI
	4	172	GKDALVAKA	5.98	no binder	NO	SI
<b>HLA-A*0202</b> Threshold(3%) = 9.130	1	134	KGVGVEECK	12.34	binder	NO	SI
	2	29	TTVGDGGW T	11.2	binder	NO	SI
	3	70	RASGKAVAK	11.11	binder	NO	NO
	4	167	AKFPGGKDA	10.9	binder	NO	NO



<b>HLA-A*0203</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 3.790</b>	1	178	AKAQEVSKQ	7.809	binder	NO	SI
	2	175	ALVAKAQEV	5.35	binder	NO	SI
	3	72	SGKAVAKKS	5.11	binder	NO	SI
	4	107	ETVESASGV	5	binder	NO	SI
<b>HLA-A*0206</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 5.200</b>	1	29	TTVGDGGW T	9.52	binder	NO	SI
	2	15	FAACSSTDT	6.42	binder	NO	SI
	3	100	VVKKMVGET	5.76	binder	NO	NO
	4	22	DTGQKDATT	5.58	binder	NO	NO
<b>HLA-A*0205</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 6.600</b>	1	126	VSQSQGVVK	10.93	binder	NO	NO
	2	18	CSSTDTGQK	8.21	binder	NO	SI
	3	153	VSKDNWEEC	7.4	binder	NO	SI
	4	134	KGVGVYECK	6.92	binder	NO	SI
<b>HLA-A*1101</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 5.930</b>	1	73	GKAVAKKSQ	7.38	binder	NO	SI
	2	57	TNPKDWYYI	5.67	no binder	NO	SI
	3	77	AKKSQAMM Q	5.53	no binder	NO	SI
	4	154	SKDNWEEC Q	4.68	no binder	SI	NO
<b>HLA-A11</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 6.470</b>	1	178	AKAQEVSKQ	7.09	binder	NO	SI
	2	157	NWEECQCVI	6.17	no binder	SI	NO
	3	122	ASVIVSQSQ	5.94	no binder	NO	NO

	4	57	TNPKDWYYI	5.71	no binder	NO	SI
<b>HLA-A24 Threshold(3%) = 8.380</b>	1	171	GGKDALVAK	13.56	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	165	IYAKFPGGK	13.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	132	VVKGVGVYE	12.46	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	31	VGDGGWTF E	10.91	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A*2402 Threshold(3%) = 7.050</b>	1	71	ASGKAVAKK	12.82	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	38	FEGWGGPP E	12.05	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	165	IYAKFPGGK	11.02	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	174	DALVAKAQE	10.45	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A3 Threshold(3%) = 7.990</b>	1	178	AKAQEVSKQ	12.09	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	77	AKKSQAMM Q	11.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	6	IALSLATMI	11.18	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	102	KKMVGETVE	11.15	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*3101 Threshold(3%) = -0.916</b>	1	62	WYYIKFSSR	1.281	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	81	QAMMQSTC R	- 0.511	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	52	KTPRDTNPK	- 1.204	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	4	40	GWGGPPEQ R	- 1.609	<b>Non- binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A31 Threshold(3%) = 5.260</b>	1	122	ASVIVSQSQ	12.09	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	120	ATASVIVSQ	9.28	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	178	AKAQEVSKQ	8.08	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	39	EGWGGPPE Q	7.02	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-A*0301</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 6.430</b>	1	4	RLIALSLAT	11.06	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	51	GKTPRDTNP	8.82	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	73	GKAVAKKSQ	8.36	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	169	FPGGKDALV	7.58	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*3302</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.099</b>	1	62	WYYIKFSSR	2.708	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	85	QSTCREASR	2.708	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	40	GWGGPPEQ R	1.099	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	81	QAMMQSTC R	1.099	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A68.1</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 2.197</b>	1	143	ATGSGSDPK	4.094	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	52	KTPRDTNPK	3.401	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	85	QSTCREASR	3.114	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	147	GSDPKDVSK	3.008	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A20</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 3.68</b>	1	101	VKKMVGETV	5.704	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	78	KKSQAMMQ S	4.605	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	133	VKGVGVYEC	4.605	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	167	AKFPGGKDA	4.605	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A2.1</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 9.330</b>	1	171	GGKDALVAK	10.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	136	VGVECKAT	10.01	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	150	PKDVSKDNW	9.61	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	134	KGVGVECK	9.01	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	1	129	SQGVVKGVG	8.67	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>HLA-B14</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 6.650</b>	2	177	VAKAQEVSK	7.53	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	143	ATGSGSDPK	7.04	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	24	GQKDATTVG	5.6	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*2702</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 0.693</b>	1	3	NRLIALSLA	2.996	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	69	SRASGKAVA	2.996	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	92	SRLQGASDV	2.996	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	161	CQCVIYAKF	2.996	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B27</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.010</b>	1	84	MQSTCREAS	4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	61	DWYYIKFSS	1.56	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	161	CQCVIYAKF	1.47	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	24	GQKDATTVG	0.83	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*2705</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 7.130</b>	1	129	SQGVVKGVG	14.21	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	127	SQSQGVVKG	10.12	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	24	GQKDATTVG	9.69	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	58	NPKDWYYIK	8.25	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*3501</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 6.460</b>	1	2	INRLIALSL	11.86	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	31	VGDGGWTF E	8.16	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	177	VAKAQEVSK	7.68	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	52	KTPRDTNPK	7.21	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*3701</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.609</b>	1	60	KDWYYIKFS	2.996	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	55	RDTNPKDWY	2.079	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	116	SDGEATASV	2.079	<b>Binder</b>	NO	NO

	4	6	IALSLATMI	1.609	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*3801</b> Threshold(3%) = 0.693	1	168	KFPGGKDAL	1.386	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	157	NWEECQCVI	1.281	<b>Binder</b>	SI	NO
	3	30	TVGDGGWT F	0.693	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	161	CQCVIYAKF	0.445	<b>Non- binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*3901</b> Threshold(3%) = 1.792	1	92	SRLQGASDV	2.303	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	157	NWEECQCVI	1.792	<b>Binder</b>	SI	NO
	3	107	ETVESASGV	1.386	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	4	156	DNWEECQC V	1.386	<b>Non- binder</b>	SI	NO
<b>HLA-B*3902</b> Threshold(3%) = 0.875	1	161	CQCVIYAKF	1.792	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	86	STCREASRL	0.693	<b>Non- binder</b>	NO	NO
	3	168	KFPGGKDAL	0.693	<b>Non- binder</b>	NO	NO
	4	80	SQAMMQST C	0.182	<b>Non- binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B40</b> Threshold(3%) = 0.000	1	89	REASRLQGA	3.689	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	159	EECQCVIYA	2.996	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	118	GEATASVIV	2.773	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	74	KAVAKKSQA	0.693	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*4403</b> Threshold(3%) = 1.099	1	158	WEECQCVIY	4.787	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	56	DTNPKDWYY	3.296	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	55	RDTNPKDWY	2.708	<b>Binder</b>	NO	NO

	4	89	REASRLQGA	2.485	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*5101</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 9.430</b>	1	79	KSQAMMQS T	10.71	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	45	PEQRNDGKT	6.56	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	3	156	DNWEECQC V	6.48	<b>Non-binder</b>	SI	NO
	4	100	VVKKMVGET	6.36	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*5102</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 9.870</b>	1	168	KFPGGKDAL	9.33	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	2	2	INRLIALSL	8.49	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	3	41	WGGPPEQR N	7.99	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	29	TTVGDGGW T	7.93	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*5103</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 10.110</b>	1	168	KFPGGKDAL	9.33	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	2	31	VGDGGWTF E	8.87	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	3	2	INRLIALSL	8.49	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	38	FEGWGGPP E	8.38	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*5201</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 2.398</b>	1	117	DGEATASVI	4.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	6	IALSLATMI	2.89	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	97	ASDVVKKMV	2.858	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	93	RLQGASDVV	2.803	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-B*5301</b> Threshold(3%) = 6.670	1	95	QGASDVVKK	10.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	156	DNWEECQC V	10.33	<b>Binder</b>	SI	NO
	3	107	ETVESASGV	9.56	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	130	QGVVKGVG	9.15	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*5401</b> Threshold(3%) = 4.530	1	48	RNDGKTPRD	7.01	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	95	QGASDVVKK	5.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	156	DNWEECQC V	5.33	<b>Binder</b>	SI	NO
	4	131	GVVKGVG	5.29	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*51</b> Threshold(3%) = 2.660	1	131	GVVKGVG	7.73	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	100	VVKMVG	6.29	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	132	VVKGVG	6.19	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	177	VAKAQEVSK	6.1	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*5801</b> Threshold(3%) = 0.555	1	28	ATTVGDGG W	4.382	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	79	KSQAMMQS T	2.197	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	56	DTNPKDWYY	1.281	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	128	QSQGVVKG	1.281	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B60</b> Threshold(3%) = 2.079	1	118	GEATASVIV	3.466	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	2	INRLIALSL	2.175	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	89	REASRLQGA	2.079	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	159	EECQCVIYA	2.079	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B61</b> Threshold(3%) = 0.095	1	118	GEATASVIV	4.477	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	89	REASRLQGA	3.784	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	159	EECQCVIYA	2.996	<b>Binder</b>	NO	NO

	4	116	SDGEATASV	1.609	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B62 Threshold(3%) = 1.099</b>	1	161	CQCVIYAKF	5.075	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	7	ALSLATMIF	3.689	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	30	TVGDGGWTF	2.27	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	4	RLIALSLAT	1.569	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B7 Threshold(3%) = 5.210</b>	1	126	VSQSQGVVK	5.67	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	2	INRLIALSL	4.38	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	3	31	VGDGGWTFE	4.31	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	160	ECQCVIYAK	3.5	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*0702 Threshold(3%) = 5.920</b>	1	70	RASGKAVAK	12.88	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	177	VAKAQEVSK	10.74	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	4	RLIALSLAT	10.48	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	126	VSQSQGVVK	9.15	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B8 Threshold(3%) = 6.500</b>	1	126	VSQSQGVVK	12.41	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	177	VAKAQEVSK	9.11	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	91	ASRLQGASD	6.07	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	163	CVIYAKFPG	5.43	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*2706 Threshod(3%) = 5.420</b>	1	130	QGVVKGVG	6	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	152	DVSKDNWEE	5.87	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	161	CQCVIYAKF	5.33	<b>Non-binder</b>	NO	SI



	4	44	PPEQRNDGK	5.07	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B35 Threshold(3%) = 9.030</b>	1	2	INRLIALSL	14.45	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	86	STCREASRL	12.97	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	177	VAKAQEVSK	12.76	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	158	WEECQCVIY	10.93	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B35 Threshold(3%) = 0.000</b>	1	1	MINRLIALS	0	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	INRLIALSL	0	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	3	NRLIALSLA	0	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	4	RLIALSLAT	0	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*0204 Threshold(3%) = 12.800</b>	1	94	LQGASDVVK	12.35	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	2	30	TVGDGGWTF	11.99	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	3	59	PKDWYYIKF	11.79	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	58	NPKDWYYIK	11.63	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*2703 Threshold(3%) = 5.980</b>	1	129	SQGVVKGVG	11.18	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	161	CQCVIYAKF	10.43	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	94	LQGASDVVK	10.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	31	VGDGGWTFE	9.4	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*2704 Threshold(3%) = 9.46</b>	1	129	SQGVVKGVG	14.46	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	70	RASGKAVAK	12.93	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	44	PPEQRNDGK	12.01	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	94	LQGASDVVK	11.69	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-B*2902</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 8.600</b>	1	55	RDTNPKDWY	21.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	151	KDVSKDNWE	12.97	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	142	KATGSGSDP	10.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	60	KDWYYIKFS	8.75	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A*3301</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 4.280</b>	1	178	AKAQEVSKQ	8.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	120	ATASVIVSQ	8.01	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	73	GKAVAKKSQ	5.16	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	88	CREASRLQG	4.9	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B44</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 5.710</b>	1	55	RDTNPKDWY	16.76	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	131	GVVKGVG VY	12.34	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	148	SDPKDVSKD	7.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	98	SDVVKKMVG	7.41	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B44</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 7.750</b>	1	120	ATASVIVSQ	17.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	178	AKAQEVSKQ	13.91	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	122	ASVIVSQSQ	13.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	28	ATTVGDGG W	9.83	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B44</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 5.41</b>	1	100	VVKKMVGET	8.78	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	153	VSKDNWEEC	7.44	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	45	PEQRNDGKT	7.08	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	70	RASGKAVAK	7.01	<b>Binder</b>	NO	NO

**Anexo 2: Epítomos de OmpL1, unión al MHC de clase 1 y predicción de toxicidad y alergenidad**

Alelo	nivel	posición	secuencia	puntaje	predicción	toxicidad	alergenidad
<b>HLA-A1</b> <b>Threshold(3%)= 4.210</b>	1	19	AASLSAKTY	9.43	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	104	TLDRTTGGL	4.85	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	123	VGGNLMVG Y	4.1	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	35	QLDLGQLG G	3.77	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A2</b> <b>Threshold(3%)= 2.190</b>	1	140	FWRVAAEY T	7.11	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	183	IKLNVTEDA	6.22	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	33	GLQLDLGQ L	5.85	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	286	GKTQSAGG A	5.26	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*0201</b> <b>Threshold(3%)= 7.470</b>	1	207	SLNGSNNL K	11.9 1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	111	GLINARSTK	11.4 5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	101	RLITLDRTT	10.8 9	<b>Binder</b>	NO	NO

	4	183	IKLNVTEDA	9.44	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*0202</b> <b>Threshold(3% )= 9.130</b>	1	269	GHVFLELET	17.3 9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	93	RKAIPAENR	15.7 1	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	110	GGLINARST	14.8 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	286	GKTQSAGG A	14.1 2	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*0203</b> <b>Threshold(3% )= 3.790</b>	1	93	RKAIPAENR	7.88	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	279	MSAAYAVG K	7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	17	SSAASLSAK	6.02	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	96	IPAENRLIT	5.7	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A*0206</b> <b>Threshold(3% )= 5.200</b>	1	180	TVGIKLNVT	9.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	65	CTVGPNDP T	8.26	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	161	AGYNIVDMT	8.24	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	269	GHVFLELET	8.24	<b>Binder</b>	NO	SI
	1	210	GSNLKG H	8.1	<b>Binder</b>	NO	NO

HLA-A*0205 Threshold(3%) )= 6.600	2	283	YAVGKTQS A	5.7	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	3	254	APNFLIGTQ	5.19	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	4	279	MSAAYAVG K	4.87	<b>Non- binder</b>	NO	SI
HLA-A*1101 Threshold(3%) )= 5.930	1	297	LSPFPAYPI	10.8 3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	175	IVIPATVGI	8.62	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	105	LDRTTGGLI	7.67	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	157	KADIAGYNI	7.3	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA-A11 Threshold(3%) )= 6.470	1	21	SLSAKTYAI	9.66	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	88	LGVAPRKAI	8.94	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	303	YPIVVGQI	8.82	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	281	AAAYAVGKT Q	8.36	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA-A24 Threshold(3%) )= 8.380	1	181	VGIKLVNTE	16.4 8	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	86	NYLGVAPR K	15.4 9	<b>Binder</b>	NO	NO

	3	162	GYNIVDMT W	14.9 4	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	26	TYAIVGFGL	12.3 8	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A*2402</b> <b>Threshold(3%)= 7.050</b>	1	86	NYLGVAPR K	16.2 2	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	311	IYRFGYKHE	10.7 8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	193	IYMGAGLNY	10.5 7	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	222	AAAGAGSV V	8.66	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A3</b> <b>Threshold(3%)= 7.990</b>	1	147	YTQKISGGI	13.9 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	37	DLGQLGGTI	13.3 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	21	SLSAKTYAI	13.2 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	79	GKPTGEGN Y	13.2 6	<b>Binder</b>	NO	NO
	1	305	IVVGGQIYR	2.07 9	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>HLA-A*3101</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= -0.916</b>	2	108	TTGGLINAR	0.69	<b>Binder</b>	NO	NO
				3			
	3	256	NFLIGTQAR	0.18	<b>Binder</b>	NO	SI
				2			
	4	134	DFGKYFFW	0.07	<b>Binder</b>	NO	SI
			R	7			
<b>HLA-A31</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 5.260</b>	1	27	YAIVGFGLQ	12.4	<b>Binder</b>	NO	SI
				2			
	2	281	AAYAVGKT	10.1	<b>Binder</b>	NO	SI
			Q	3			
	3	303	YPIVVGQI	9.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	141	WRVAAEYT	8.58	<b>Binder</b>	NO	NO
			Q				
<b>HLA-A*0301</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 6.430</b>	1	96	IPAENRLIT	15.6	<b>Binder</b>	NO	SI
				7			
	2	11	ILAVALSSA	10.8	<b>Binder</b>	NO	SI
				3			
	3	274	ELETIMSAA	10.7	<b>Binder</b>	NO	SI
				1			
	4	214	LKGGHDILA	9.45	<b>Binder</b>	NO	NO
	1	305	IVVGGQIYR	2.70	<b>Binder</b>	NO	NO
				8			

<b>HLA-A*3302</b> <b>Threshold(3% )= 1.099</b>	2	99	ENRLITLDR	2.19 7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	134	DFGKYFFW R	2.19 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	235	DGTDPVTT R	2.19 7	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A68.1</b> <b>Threshold(3% )= 2.197</b>	1	305	IVVGGQIYR	5.99 1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	142	RVAAEYEQ K	5.48 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	108	TTGGLINAR	4.60 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	241	TTREHVRQ R	3.91 2	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-A20</b> <b>Threshold(3% )= 3.68</b>	1	93	RKAIPAENR	8.29 4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	149	QKISGGITK	6.90 8	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	24	AKTYAIVGF	6.21 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	79	GKPTGEGN Y	6.21 5	<b>Binder</b>	NO	NO



<b>HLA-A2.1</b> <b>Threshold(3% )= 9.330</b>	1	207	SLNGSNNL K	16.7 8	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	184	KLNVTEDEAA	10.6 3	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	140	FWRVAAEY T	10.5 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	111	GLINARSTK	9.77	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B14</b> <b>Threshold(3% )= 6.650</b>	1	75	VQNP GKPT G	11.3 4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	72	PTCVQNPG K	11	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	39	GQLGGTITK	8.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	309	GQIYRFGYK	7.91	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*2702</b> <b>Threshold(3% )= 0.693</b>	1	312	YRFGYKHE L	5.70 4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	246	VRFR TSGIA	4.60 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	IRNISKALL	4.09 4	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	59	VRSTDTCTV	2.99 6	<b>Binder</b>	NO	NO
	1	309	GQIYRFGYK	5.36	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-B27</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 1.010</b>	2	75	VQNPGKPT G	1.33	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	39	GQLGGTITK	0.65	<b>Non-</b> <b>binder</b>	NO	NO
	4	148	TQKISGGIT	0.17	<b>Non-</b> <b>binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*2705</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 7.130</b>	1	261	TQARVTDK G	12.5 3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	309	GQIYRFGYK	10.8 8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	39	GQLGGTITK	10.4 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	303	YPIVVGGQI	9.56	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*3501</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 6.460</b>	1	76	QNPGKPTG E	13.8 3	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	295	TNLSPFPAY	11.1 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	211	SNNLKGGH D	8.77	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	265	VTDKGHVFL	8.16	<b>Binder</b>	NO	SI
	1	105	LDRTTGGLI	5.29 8	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>HLA-B*3701</b> <b>Threshold(3%)= 1.609</b>	2	133	SDFGKYFF W	2.99 6	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	47	KDGLDAAS Y	2.07 9	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	158	ADIAGYNIV	2.07 9	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*3801</b> <b>Threshold(3%)= 0.693</b>	1	80	KPTGEGNY L	1.56 9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	269	GHVFLLEET	1.36 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	177	IPATVGIKL	1.13 8	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	104	TLDRTTGGL	1.09 9	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*3901</b> <b>Threshold(3%)= 1.792</b>	1	312	YRFGYKHE L	2.70 8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	104	TLDRTTGGL	2.19 7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	265	VTDKGHVFL	2.19 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	2.01 5	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-B*3902</b> <b>Threshold(3%)= 0.875</b>	1	267	DKGHVFLEL	3.178	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	24	AKTYAIVGF	1.609	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	8	ALLILAVAL	0.875	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	26	TYAIVGFGL	0.875	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B40</b> <b>Threshold(3%)= 0.000</b>	1	83	GEGNYLGV A	3.689	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	273	LELETIMSA	3.689	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	133	SDFGKYFF W	2.303	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	218	HDILAAAGA	2.303	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*4403</b> <b>Threshold(3%)= 1.099</b>	1	275	LETIMSAAY	5.193	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	131	YESDFGKY F	4.094	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	48	DGLDAASY Y	3.701	<b>Binder</b>	NO	SI

	4	47	KDGLDAAS Y	3.11 4	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*5101</b> <b>Threshold(3%)= 9.430</b>	1	58	PVRSTDTCT	10.3 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	74	CVQNPGRP T	9.26	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	3	210	GSNNLKGG H	8.75	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	148	TQKISGGIT	8.39	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*5102</b> <b>Threshold(3%)= 9.870</b>	1	56	YGPVRSTD T	11.3 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	208	LNGSNNLK G	10.4 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	69	PNDPTCVQ N	10.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	269	GHVLFLELET	10.1 8	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*5103</b> <b>Threshold(3%)= 10.110</b>	1	56	YGPVRSTD T	11.3 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	76	QNPGRKPTG E	10.5	<b>Binder</b>	NO	NO

	3	208	LNGSNNLK G	10.4 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	69	PNDPTCVQ N	10.3	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*5201</b> <b>Threshold(3%)= 2.398</b>	1	298	SPFPAYPIV	6.10 9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	168	MTWGFSSI V	4.81 8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	158	ADIAGYNIV	3.58 4	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	22	LSAKTYAIV	3.29 6	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*5301</b> <b>Threshold(3%)= 6.670</b>	1	76	QNP GKPTG E	17.5 4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	221	LAAAGAGS V	13.6 7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	113	INARSTKGA	10.3 5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	85	GNYLGVAP R	10.2 6	<b>Binder</b>	NO	NO
	1	76	QNP GKPTG E	12.5 4	<b>Binder</b>	NO	NO

HLA-B*5401 Threshold(3%)= 4.530	2	113	INARSTKGA	10.35	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	85	GNYLGVAP R	10.26	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	199	LNYFNGGW S	9.37	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA-B*51 Threshold(3%)= 2.660	1	221	LAAAGAGS V	8.53	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	142	RVAAEYEQ K	7.73	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	123	VGGNLMVG Y	7.37	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	176	VIPATVGIK	5.16	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA-B*5801 Threshold(3%)= 0.555	1	249	RTSGIAPNF	5.288	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	240	VTTREHVRV	3.784	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	132	ESDFGKYFF	2.676	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	155	ITKADIAGY	2.38	<b>Binder</b>	NO	SI
	1	177	IPATVGIKL	2.963	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-B60</b> <b>Threshold(3% )= 2.079</b>	2	224	AGAGSVVN L	2.77 3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	273	LELETIMSA	2.77 3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	30	VGFGQLQLDL	2.17 5	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B61</b> <b>Threshold(3% )= 0.095</b>	1	273	LELETIMSA	4.38 2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	83	GEGNYLGV A	3.09 1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	158	ADIAGYNIV	2.30 3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	189	EDAAIYMGA	1.60 9	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B62</b> <b>Threshold(3% )= 1.099</b>	1	213	NLKGGHDIL	2.66 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	148	TQKISGGIT	2.48 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	198	GLNYFNNGG W	2.48 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	164	NIVDMTWG F	2.39 8	<b>Binder</b>	NO	SI



<b>HLA-B7</b> <b>Threshold(3%)= 5.210</b>	1	76	QNPGKPTG E	12.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	199	LNYFNGGW S	11.3 4	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	208	LNGSNNLK G	5.31	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	17	SSAASLSAK	4.68	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*0702</b> <b>Threshold(3%)= 5.920</b>	1	76	QNPGKPTG E	14.2 4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	202	FNGGWSLN G	14.1 7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	208	LNGSNNLK G	13.5 9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	163	YNIVDMTW G	9.21	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B8</b> <b>Threshold(3%)= 6.500</b>	1	173	SSIVIPATV	14.8 5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	175	IVIPATVGI	14.7 5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	301	PAYPIVVGG	14.3 8	<b>Binder</b>	NO	SI

	4	191	AAIYMGAGL	12.7 7	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*2706</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 5.420</b>	1	160	IAGYNIVDM	9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	309	GQIYRFGYK	6.67	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	149	QKISGGITK	6	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	165	IVDMTWGF S	6	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B35</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 9.030</b>	1	295	TNLSPFPAY	15.1 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	79	GKPTGEGN Y	13.0 6	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	76	QNP GKPTG E	13	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	265	VTDKGHVFL	11.7 4	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B35</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>)= 0.000</b>	1	1	MIRNISKAL	0	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	2	IRNISKALL	0	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	3	RNISKALLI	0	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	4	NISKALLIL	0	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>HLA-A*0204</b> <b>Threshold(3%)= 12.800</b>	1	149	QKISGGITK	19.5 3	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	214	LKGGHDILA	16.7 9	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	183	IKLNVTEDA	12.6 9	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	39	GQLGGTITK	12.3 5	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*2703</b> <b>Threshold(3%)= 5.980</b>	1	309	GQIYRFGYK	12.0 3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	82	TGEGNYLG V	11.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	130	GYESDFGK Y	11.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	39	GQLGGTITK	10.4 3	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-B*2704</b> <b>Threshold(3%)= 9.46</b>	1	39	GQLGGTITK	13.5 7	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	139	FFWRVAAE Y	12.2 7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	76	QNP GKPTG E	11.9 3	<b>Binder</b>	NO	NO

	4	142	RVAAEYEQ K	11.6 8	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B*2902</b> <b>Threshold(3%)= 8.600</b>	1	133	SDFGKYFF W	14.6 5	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	47	KDGLDAAS Y	11.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	62	TDTCTVGP N	10.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	264	RVTDKGHV F	10.3 7	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-A*3301</b> <b>Threshold(3%)= 4.280</b>	1	179	ATVGIKLV	6.85	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	25	KTYAIVGFG	5.96	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	301	PAYPIVGG	5.94	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	206	WSLNGSNN L	5.76	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B44</b> <b>Threshold(3%)= 5.710</b>	1	47	KDGLDAAS Y	10.9 8	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	139	FFWRVAAE Y	9.75	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	158	ADIAGYNIV	8.38	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	116	RSTKGAMV G	7.83	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>HLA-B44</b> <b>Threshold(3%)= 7.750</b>	1	297	LSPFPAYPI	13.99	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	168	MTWGFSSI V	12.91	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	147	YTQKISGGI	12.62	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	245	HVRFRTSGI	10.79	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-B44</b> <b>Threshold(3%)= 5.41</b>	1	240	VTTREHVRV	10.08	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	227	GSVVNLIAD	8.15	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	286	GKTQSAGG A	7.51	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	103	ITLDRTTGG	6.39	<b>Binder</b>	NO	SI

**Anexo 3: Epítomos de LipL21, unión al MHC de clase II y predicción de toxicidad y alergenidad**

Alelo	nive l	posició n	secuencia	puntaj e	predicció n	Toxicida d	Alergenicida d
<b>HLA- DRB1*0101 Threshold(3%) )= 0.140</b>	1	2	INRLIALSL	2.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	13	MIFAACSST	0.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	64	YIKFSSRAS	0.37	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	101	VKKMVGET V	0.3	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0102 Threshold(3%) )= 0.700</b>	1	2	INRLIALSL	3.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	13	MIFAACSST	1.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	101	VKKMVGET V	1.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	6	IALSLATMI	1.09	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0301 Threshold(3%) )= 2.960</b>	1	65	IKFSSRASG	4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	2.45	<b>Non- binder</b>	NO	NO
	3	1	MINRLIALS	2.4	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	4	5	LIALSLATM	2.4	<b>Non- binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0305 Threshold(3%) )= 1.700</b>	1	65	IKFSSRASG	1.6	<b>Non- binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	1.45	<b>Non- binder</b>	NO	NO

	3	63	YYIKFSSRA	1.37	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	104	MVGETVES A	1.3	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0306 Threshold(3%)= 2.080</b>	1	104	MVGETVES A	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	65	IKFSSRASG	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	84	MQSTCREA S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	1	MINRLIALS	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0307 Threshold(3%)= 2.080</b>	1	104	MVGETVES A	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	65	IKFSSRASG	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	84	MQSTCREA S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	1	MINRLIALS	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0308 Threshold(3%)= 2.080</b>	1	104	MVGETVES A	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	65	IKFSSRASG	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	84	MQSTCREA S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	1	MINRLIALS	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0309 Threshold(3%)= 2.400</b>	1	65	IKFSSRASG	3	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	1.45	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	3	1	MINRLIALS	1.4	<b>Non-binder</b>	NO	SI

	4	5	LIALSLATM	1.4	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0311</b> Threshold(3%)= 2.08	1	104	MVGETVES A	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	65	IKFSSRASG	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	84	MQSTCREA S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	1	MINRLIALS	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0401</b> Threshold(3%)= 1.480	1	104	MVGETVES A	3.9	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	124	VIVSQSQG V	1.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	63	YYIKFSSRA	1.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	2	INRLIALSL	1	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0402</b> Threshold(3%)= 1.800	1	64	YIKFSSRAS	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	1	MINRLIALS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	133	VKGVGVYE C	2.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	63	YYIKFSSRA	2.1	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0404</b> Threshold(3%)= 1.800	1	133	VKGVGVYE C	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	64	YIKFSSRAS	1.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	INRLIALSL	1.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	63	YYIKFSSRA	1.4	<b>Non-binder</b>	NO	NO



<b>HLA-DRB1*0405</b> Threshold(3%)= 2.000	1	64	YIKFSSRAS	2.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	63	YYIKFSSRA	2.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	14	IFAACSSTD	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	INRLIALSL	1.8	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0408</b> Threshold(3%)= 1.200	1	64	YIKFSSRAS	2.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	63	YYIKFSSRA	2.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	133	VKGVGVYE C	1.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	62	WYYIKFSSR	1.2	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0410</b> Threshold(3%)= 2.600	1	14	IFAACSSTD	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	INRLIALSL	2.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	133	VKGVGVYE C	2.5	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	13	MIFAACSST	2.1	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0421</b> Threshold(3%)= 2.300	1	104	MVGETVES A	3.9	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	124	VIVSQSQG V	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	INRLIALSL	1.96	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	62	WYYIKFSSR	1.7	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0423</b>	1	133	VKGVGVYE C	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>Threshold(3%)= 1.680</b>	2	64	YIKFSSRAS	1.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	INRLIALSL	1.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	63	YYIKFSSRA	1.4	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0426 Threshold(3%)= 1.600</b>	1	104	MVGETVES A	3.9	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	124	VIVSQSQG V	1.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	63	YYIKFSSRA	1.5	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	2	INRLIALSL	1	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0701 Threshold(3%)= 4.100</b>	1	6	IALSLATMI	5.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	124	VIVSQSQG V	5.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	INRLIALSL	5.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	133	VKGVGVYE C	3	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0703 Threshold(3%)= 4.000</b>	1	6	IALSLATMI	5.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	124	VIVSQSQG V	5.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	INRLIALSL	5.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	133	VKGVGVYE C	3	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0801</b>	1	1	MINRLIALS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	100	VVKKMVGE T	3.8	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>Threshold(3%) )= 1.800</b>	3	63	YYIKFSSRA	3.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	139	YECKATGS G	3	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0802 Threshold(3%) )= 1.000</b>	1	1	MINRLIALS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	63	YYIKFSSRA	3.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	100	VVKKMVGE T	2.9	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	165	IYAKFPGGK	1.9	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0804 Threshold(3%) )= 1.600</b>	1	1	MINRLIALS	5.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	100	VVKKMVGE T	3.9	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	165	IYAKFPGGK	2.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	176	LVAKAQEV S	2.4	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0806 Threshold(3%) )= 2.400</b>	1	1	MINRLIALS	5.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	100	VVKKMVGE T	4.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	5	LIALSLATM	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	76	VAKKSQAM M	2.7	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0813 Threshold(3%) )= 1.900</b>	1	63	YYIKFSSRA	5.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	1	MINRLIALS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	176	LVAKAQEV S	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI

	4	100	VVKKMOVGE T	2.2	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0817 Threshold(3% )= 2.800</b>	1	1	MINRLIALS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	100	VVKKMOVGE T	3.9	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	63	YYIKFSSRA	3.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	139	YECKATGS G	3.1	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*1101 Threshold(3% )= 1.100</b>	1	2	INRLIALSL	2.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	64	YIKFSSRAS	1.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	133	VKGVGVYE C	1.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	1	MINRLIALS	1.3	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1102 Threshold(3% )= 1.800</b>	1	1	MINRLIALS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	2.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	176	LVAKAQEV S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	83	MMQSTCRE A	1.7	<b>Non- binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1104 Threshold(3% )= 2.000</b>	1	2	INRLIALSL	3.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	1	MINRLIALS	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	5	LIALSLATM	2	<b>Binder</b>	NO	NO

HLA- DRB1*1106 Threshold(3%) )= 2.000	1	2	INRLIALSL	3.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	1	MINRLIALS	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	5	LIALSLATM	2	<b>Binder</b>	NO	NO
HLA- DRB1*1107 Threshold(3%) )= 2.100	1	65	IKFSSRASG	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	2.45	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	104	MVGETVES A	2.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	1	MINRLIALS	2	<b>Non- binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1114 Threshold(3%) )= 1.300	1	64	YIKFSSRAS	3.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	1	MINRLIALS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	63	YYIKFSSRA	2.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	176	LVAKAQEV S	1.3	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1120 Threshold(3%) )= 2.100	1	64	YIKFSSRAS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	1	MINRLIALS	2.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	63	YYIKFSSRA	2.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	5	LIALSLATM	1.8	<b>Non- binder</b>	NO	NO
HLA- DRB1*1121 Threshold(3%) )= 1.800	1	1	MINRLIALS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	2.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	176	LVAKAQEV S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI

	4	83	MMQSTCRE A	1.7	<b>Non- binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1128 Threshold(3% )= 2.150</b>	1	2	INRLIALSL	3.06	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	5	LIALSLATM	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	64	YIKFSSRAS	2.1	<b>Non- binder</b>	NO	SI
	4	1	MINRLIALS	1.7	<b>Non- binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1301 Threshold(3% )= 2.600</b>	1	1	MINRLIALS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	5	LIALSLATM	2.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	65	IKFSSRASG	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*1302 Threshold(3% )= 2.100</b>	1	64	YIKFSSRAS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	1	MINRLIALS	2.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	63	YYIKFSSRA	2.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	5	LIALSLATM	1.8	<b>Non- binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*1304 Threshold(3% )= 2.600</b>	1	1	MINRLIALS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	2.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	65	IKFSSRASG	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	5	LIALSLATM	2.4	<b>Non- binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*1305 Threshold(3% )= 2.200</b>	1	2	INRLIALSL	3.06	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	5	LIALSLATM	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	64	YIKFSSRAS	2.1	<b>Non- binder</b>	NO	SI

	4	1	MINRLIALS	1.7	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*1307</b> Threshold(3%)= 0.600	1	64	YIKFSSRAS	1.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	1	MINRLIALS	1.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	5	LIALSLATM	1	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	133	VKGVGVYE C	0.8	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*1311</b> Threshold(3%)= 2.000	1	2	INRLIALSL	3.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	133	VKGVGVYE C	2.5	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	1	MINRLIALS	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	5	LIALSLATM	2	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*1321</b> Threshold(3%)= 2.200	1	2	INRLIALSL	3.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	5	LIALSLATM	2.1	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	3	64	YIKFSSRAS	1.7	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	65	IKFSSRASG	1.5	<b>Non-binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*1322</b> Threshold(3%)= 1.800	1	1	MINRLIALS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	2.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	176	LVAKAQEV S	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	83	MMQSTCRE A	1.7	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*1323</b>	1	64	YIKFSSRAS	3.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	1	MINRLIALS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	63	YYIKFSSRA	2.2	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>Threshold(3%)= 1.300</b>	4	176	LVAKAQEV S	1.3	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*1327 Threshold(3%)= 2.600</b>	1	1	MINRLIALS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	5	LIALSLATM	2.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	65	IKFSSRASG	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*1328 Threshold(3%)= 2.600</b>	1	1	MINRLIALS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	64	YIKFSSRAS	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	5	LIALSLATM	2.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	65	IKFSSRASG	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*1501 Threshold(3%)= 3.250</b>	1	2	INRLIALSL	4.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	136	VGVECKA T	3	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	3	8	LSLATMIFA	2.3	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	64	YIKFSSRAS	2.3	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*1502 Threshold(3%)= 3.250</b>	1	2	INRLIALSL	3.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	64	YIKFSSRAS	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	63	YYIKFSSRA	2.6	<b>Non-binder</b>	NO	NO
	4	136	VGVECKA T	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*1506</b>	1	2	INRLIALSL	4.4	<b>Binder</b>	NO	NO
	2	136	VGVECKA T	3	<b>Non-binder</b>	NO	SI



<b>Threshold(3%)= 3.100</b>	3	8	LSLATMIFA	2.3	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	64	YIKFSSRAS	2.3	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB5*0101 Threshold(3%)= 2.300</b>	1	62	WYYIKFSSR	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	INRLIALSL	3	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	64	YIKFSSRAS	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	165	IYAKFPGGK	1.7	<b>Non-binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB5*0105 Threshold(3%)= 2.300</b>	1	62	WYYIKFSSR	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	INRLIALSL	3	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	64	YIKFSSRAS	2	<b>Non-binder</b>	NO	SI
	4	165	IYAKFPGGK	1.7	<b>Non-binder</b>	NO	SI

**Anexo 4: Epítomos de OmpL1, unión al MHC de clase II y predicción de toxicidad y alergenidad**

Alelo	nivel	posición	secuencia	puntaje	predicción	toxicidad	alergenidad
<b>HLA-DRB1*0101</b> Threshold(3%) = 0.140	1	10	LILAVALSS	1.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	87	YLGVAPRKA	1.04	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	9	LLILAVALS	1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	175	IVIPATVGI	0.9	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0102</b> Threshold(3%) = 0.700	1	10	LILAVALSS	2.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	9	LLILAVALS	2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	1.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	1.7	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0301</b> Threshold(3%) = 2.960	1	9	LLILAVALS	4.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	122	MVGGNLMV G	4.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	4.46	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	103	ITLDRTTGG	4.4	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0305</b> Threshold(3%) = 1.700	1	9	LLILAVALS	3.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	312	YRFGYKHEL	3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	2.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	175	IVIPATVGI	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI

HLA- DRB1*0306 Threshold(3%) = 2.080	1	9	LLILAVALS	4.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	183	IKLNVTEDA	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0307 Threshold(3%) = 2.080	1	9	LLILAVALS	4.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	183	IKLNVTEDA	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0308 Threshold(3%) = 2.080	1	9	LLILAVALS	4.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	183	IKLNVTEDA	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0309 Threshold(3%) = 2.400	1	312	YRFGYKHEL	3.96	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	9	LLILAVALS	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	122	MVGGNLMV G	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	3.46	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0311 Threshold(3%) = 2.080	1	9	LLILAVALS	4.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	183	IKLNVTEDA	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA-DRB1*0401</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.480</b>	1	183	IKLNVTEDA	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	9	LLILAVALS	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	59	VRSTDTCTV	3.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	272	FLELETIMS	3.28	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0402</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.800</b>	1	175	IVIPATVGI	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	113	INARSTKGA	3.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	9	LLILAVALS	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0404</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.800</b>	1	9	LLILAVALS	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	175	IVIPATVGI	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	59	VRSTDTCTV	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA-DRB1*0405</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 2.000</b>	1	9	LLILAVALS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	138	YFFWRVAAE	3.75	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	272	FLELETIMS	3.48	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	175	IVIPATVGI	3	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA-DRB1*0408</b> <b>Threshold(3%)</b> <b>= 1.200</b>	1	9	LLILAVALS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	272	FLELETIMS	3.48	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	2.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	2.1	<b>Binder</b>	NO	SI

HLA- DRB1*0410 Threshold(3%) = 2.600	1	9	LLILAVALS	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	175	IVIPATVGI	4	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	112	LINARSTKG	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0421 Threshold(3%) = 2.300	1	9	LLILAVALS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	59	VRSTDTCTV	4.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	183	IKLNVTEDEA	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	272	FLELETIMS	3.68	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0423 Threshold(3%) = 1.680	1	9	LLILAVALS	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	175	IVIPATVGI	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	59	VRSTDTCTV	2.7	<b>Binder</b>	NO	NO
HLA- DRB1*0426 Threshold(3%) = 1.600	1	183	IKLNVTEDEA	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	9	LLILAVALS	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	59	VRSTDTCTV	3.3	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	272	FLELETIMS	3.28	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0701 Threshold(3%) = 4.100	1	175	IVIPATVGI	6.32	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	177	IPATVGIKL	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	312	YRFGYKHEL	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*0703 Threshold(3%) = 4.000	1	175	IVIPATVGI	6.32	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	177	IPATVGIKL	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	312	YRFGYKHEL	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>HLA- DRB1*0801 Threshold(3%) = 1.800</b>	1	9	LLILAVALS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	138	YFFWRVAAE	4.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	246	VERFRTSGIA	3.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	2	IRNISKALL	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0802 Threshold(3%) = 1.000</b>	1	9	LLILAVALS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	246	VERFRTSGIA	3.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	IRNISKALL	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	113	INARSTKGA	2.1	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0804 Threshold(3%) = 1.600</b>	1	9	LLILAVALS	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	246	VERFRTSGIA	4.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	IRNISKALL	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	113	INARSTKGA	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0806 Threshold(3%) = 2.400</b>	1	9	LLILAVALS	5.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	246	VERFRTSGIA	4.7	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	IRNISKALL	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	181	VGIKLVNTE	3.9	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*0813 Threshold(3%) = 1.900</b>	1	9	LLILAVALS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	246	VERFRTSGIA	3	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	IRNISKALL	2.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	2.1	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*0817 Threshold(3%) = 2.800</b>	1	9	LLILAVALS	4.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	138	YFFWRVAAE	4.1	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	246	VERFRTSGIA	3.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	181	VGIKLVNTE	3.4	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*1101</b>	1	9	LLILAVALS	4.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	272	FLELETIMS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>Threshold(3%) = 1.100</b>	4	2	IRNISKALL	2.9	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1102 Threshold(3%) = 1.800</b>	1	9	LLILAVALS	4.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	2.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	2.4	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1104 Threshold(3%) = 2.000</b>	1	9	LLILAVALS	5.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	272	FLELETIMS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1106 Threshold(3%) = 2.000</b>	1	9	LLILAVALS	5.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	272	FLELETIMS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1107 Threshold(3%) = 2.100</b>	1	9	LLILAVALS	4.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	122	MVGGNLMV G	3.1	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1114 Threshold(3%) = 1.300</b>	1	9	LLILAVALS	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	312	YRFGYKHEL	2.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	87	YLGVAPRKA	2	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1120</b>	1	9	LLILAVALS	4.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	138	YFFWRVAAE	3.2	<b>Binder</b>	NO	NO

<b>Threshold(3%) = 2.100</b>	3	312	YRFGYKHEL	3.06	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	2.6	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1121 Threshold(3%) = 1.800</b>	1	9	LLILAVALS	4.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	2.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	2.4	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1128 Threshold(3%) = 2.150</b>	1	9	LLILAVALS	4.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.86	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	272	FLELETIMS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1301 Threshold(3%) = 2.600</b>	1	9	LLILAVALS	5.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	3.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	3.36	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1302 Threshold(3%) = 2.100</b>	1	9	LLILAVALS	4.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	138	YFFWRVAAE	3.2	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	312	YRFGYKHEL	3.06	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	2.6	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1304 Threshold(3%) = 2.600</b>	1	9	LLILAVALS	4.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	29	IVGFGLQLD	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	138	YFFWRVAAE	3.8	<b>Binder</b>	NO	NO
	4	2	IRNISKALL	3.4	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1305 Threshold(3%) = 2.200</b>	1	9	LLILAVALS	4.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	3.86	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	10	LILAVALSS	3.7	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	272	FLELETIMS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI



HLA- DRB1*1307 Threshold(3%) = 0.600	1	9	LLILAVALS	4.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	2	IRNISKALL	2.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	272	FLELETIMS	1.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	1.5	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1311 Threshold(3%) = 2.000	1	9	LLILAVALS	5.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	4.3	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	272	FLELETIMS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1321 Threshold(3%) = 2.200	1	9	LLILAVALS	4.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	138	YFFWRVAAE	4	<b>Binder</b>	NO	NO
	3	2	IRNISKALL	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	10	LILAVALSS	3.3	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1322 Threshold(3%) = 1.800	1	9	LLILAVALS	4.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	2.5	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	2.4	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1323 Threshold(3%) = 1.300	1	9	LLILAVALS	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	2.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	312	YRFGYKHEL	2.1	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	87	YLGVAPRKA	2	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1327 Threshold(3%) = 2.600	1	9	LLILAVALS	5.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	3.4	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	2	IRNISKALL	3.36	<b>Binder</b>	NO	SI
HLA- DRB1*1328	1	9	LLILAVALS	5.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	10	LILAVALSS	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	3.4	<b>Binder</b>	NO	SI

<b>Threshold(3%) = 2.600</b>	4	2	IRNISKALL	3.36	<b>Binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1501 Threshold(3%) = 3.250</b>	1	175	IVIPATVGI	4.26	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	199	LN YFN GGW S	4.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	128	MV GY ESDF G	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	193	IYMGAGLNY	3.8	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB1*1502 Threshold(3%) = 3.250</b>	1	312	YRFGYKHEL	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	135	FGKYFFWRV	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	175	IVIPATVGI	3.26	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	199	LN YFN GGW S	3.2	<b>Non- binder</b>	NO	SI
<b>HLA- DRB1*1506 Threshold(3%) = 3.100</b>	1	175	IVIPATVGI	4.26	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	199	LN YFN GGW S	4.2	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	128	MV GY ESDF G	3.9	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	193	IYMGAGLNY	3.8	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB5*0101 Threshold(3%) = 2.300</b>	1	87	YLG VAPRKA	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	303	YPIV VGGQI	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	2.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	141	WRVAAEYT Q	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO
<b>HLA- DRB5*0105 Threshold(3%) = 2.300</b>	1	87	YLG VAPRKA	3.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	2	303	YPIV VGGQI	3.6	<b>Binder</b>	NO	SI
	3	2	IRNISKALL	2.8	<b>Binder</b>	NO	SI
	4	141	WRVAAEYT Q	2.6	<b>Binder</b>	NO	NO

## Anexo 5: Mimetismo entre epítomos de LipL21

Epítopo	Homología	Comentarios
<b>AKFPGGKDA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>ASRLQGASD</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>ASVIVSQSQ</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>ATGSGSDPK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>ATTVGDDGW</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>DGEATASVI</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>DTGQKDATT</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).

<b>ECQCVIYAK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>EEQCVIYA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>FEGWGGPPE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GEATASVIV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GVVKGVG VY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GWGGPPEQR</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GWTFEGWGG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>INRLIALSL</b>	No se encontró ninguna	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que</b>

	secuencia idéntica	<b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KATGSGSDP</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KDVSKDNWE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KDWYYIKFS</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KFPGGKDAL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KKSQAMMQS</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KSQAMMQST</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>PEQRNDGKT</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).

<b>PPEQRNDGK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>QGASDVVKK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>QGVVKG VGV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>QSQGVVKG V</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RASGKAVAK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RDTNPKDWY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RNDGKTPRD</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>SDGEATASV</b>	No se encontró ninguna	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que

	secuencia idéntica	<b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>SDVVKKMVG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>SQGVVKGVG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>STCREASRL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VGDGGWTFE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VKGVGVYEC</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VSQSQGVVK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VKGVGVYE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).

<b>VVKKMVGET</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>WGGPPEQRN</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>YECKATGSG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>INRLIALSL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>LIALSLATM</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>YYIKFSSRA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>IKFSSRASG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que <b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VVKKMVGET</b>	No se encontró ninguna	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna</b> ya que



	secuencia idéntica	<b>no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>MVGETVESA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VIVSQSQGV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VKGVGVYEC</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>YECKATGSG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).

## Anexo 6: Mimetismo entre epítomos de OmpL1

Epítopo	Homología	Comentarios
<b>MIRNISKAL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>NISKALLIL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>AASLSAKTY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>AKTYAIVGF</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KTYAIVGFG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>TYAIVGFGL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GLQLDLGQL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GQLGGTITK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no</b>

		<b>tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KDGLDAASY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VRSTDTCTV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>PNDPTCVQN</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>PTCVQNP GK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>QNP GKPTGE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GKPTGEGNY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>TGEGNYLGV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GNYLGVAPR</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no</b>

		<b>tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>NYLGVAPRK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RKAIPAENR</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>ENRLTLDR</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RLITLDRTT</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>TLDRTTGGL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>LDRTTGGLI</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>TTGGLINAR</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RSTKGAMVG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no</b>

		<b>tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GYESDFGKY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>YESDFGKYF</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>SDFGKYFFW</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>FWRVAAEYT</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>WRVAAEYTK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>YTQKISGGI</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>TQKISGGIT</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>QKISGGITK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no</b>

		<b>tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>ADIAGYNIV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>TVGIKLNVT</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VGIKLNVTE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>KLNVTEDA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>AAIYMGAGL</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>IYMGAGLNY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GLNYFNGGW</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>FNGGWSLNG</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no</b>

		<b>tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>SLNGSNNLK</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>GSNNLKGGH</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>SNNLKGGHD</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>LKGGHDILA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>LAAAGAGSV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>AAAGAGSVV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VRFRTSGIA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>RVTDKGHVF</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no</b>

		<b>tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>IVVGGQIYR</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VRSTDTCTV</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>YFFWRVAE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>WRVAAEYEQ</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VGIKLVTE</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>IYMGAGLNY</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).
<b>VRFRVSGIA</b>	No se encontró ninguna secuencia idéntica	Los aglutinantes previstos pueden ser <b>candidatos potenciales a vacuna ya que no tienen ninguna identidad con el ser humano</b> (un organismo eucariota).



## 14.2 Producción científica.

### Vector-Borne and Zoonotic Diseases

Vector-Borne and Zoonotic Diseases: <http://mc.manuscriptcentral.com/vbz>

#### Frequency of *Leptospira* in the blood of patients with fever of unknown origin in Sinaloa, Mexico

Journal:	<i>Vector-Borne and Zoonotic Diseases</i>
Manuscript ID:	VBZ-2024-0001
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	01-Jan-2024
Complete List of Authors:	Lagarde-Guerrero, Rogelio; Universidad Autonoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Posgrado en Ciencias Biomédicas Navarro-Arias, María; Universidad Autonoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Microbiología Durán-Pérez, Sergio; Universidad Autonoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Microbiología Osuna-Ramírez, Ignacio; Universidad Autonoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Posgrado en Ciencias Biomédicas Osuna-Martínez, Lorenzo; Universidad Autonoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Posgrado en Ciencias Biomédicas González Durán, Elizabeth; Secretaria de Salud de Mexico, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (INDRE) Rendón-Maldonado, José; Universidad Autonoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Quimico Biologicas, Posgrado en Ciencias Biomédicas
Keyword:	Epidemiology, Leptospirosis, PCR, Zoonosis, Diagnosis
Manuscript Keywords (Search Terms):	qPCR, lipL32, <i>Leptospira</i> , Fever of unknown origin
Abstract:	<p>Background: <i>Leptospira</i> is a genus of bacteria that causes the zoonotic disease known as leptospirosis, which mainly affects countries with tropical and subtropical climates. Its prevalence may be underestimated because the initial stage of the infection is characterized by presenting a febrile condition that is easily confused with other diseases, such as dengue. This work reports the frequency of leptospirosis in the blood of patients with febrile symptoms of unknown origin.</p> <p>Materials and Methods: A total of 218 peripheral blood samples were analyzed from volunteer participants from Culiacan Sinaloa in June 2019, one half corresponded to patients with undiagnosed febrile symptoms and the other half to asymptomatic volunteers. Data collected included the age and sex of the participants. <i>Leptospira</i> was detected by qPCR using a fragment of the lipL32 gene from the bacteria's genome as a target. Fisher's exact test was used as a statistical method to estimate the relationship between the infection and the data collected.</p> <p>Results: The study group comprised 134 female and 84 male patients ranging from ages 1 to 92 years, averaging 41 years. In this study, <i>Leptospira</i> infection was identified in the blood of 22/218 participating volunteers (10.09%), of which 20/109 (18.34%) presented febrile</p>

Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

## Frequency of *Leptospira* in the blood of patients with fever of unknown origin in Sinaloa, Mexico.

Lagarde-Guerrero R,<sup>1</sup> Navarro-Arias MJ,<sup>1</sup> Duran-Pérez SA,<sup>1</sup> Osuna-Ramírez I,<sup>1</sup> Osuna-Martínez LU,<sup>1</sup> González-Durán E,<sup>4</sup> Rendon-Maldonado JG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av de las Américas y Blvd Universitarios, Culiacán, Sinaloa, 80020, México

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), Francisco de P Miranda 177, Lomas de Plateros, Álvaro Obregón, 01480, Ciudad de México, México

### ABSTRACT

**Background:** *Leptospira* is a genus of bacteria that causes the zoonotic disease known as leptospirosis, which mainly affects countries with tropical and subtropical climates. Its prevalence may be underestimated because the initial stage of the infection is characterized by presenting a febrile condition that is easily confused with other diseases, such as dengue. This work reports the frequency of leptospirosis in the blood of patients with febrile symptoms of unknown origin.

**Materials and Methods:** A total of 218 peripheral blood samples were analyzed from volunteer participants from Culiacan Sinaloa in June 2019; one half corresponded to patients with undiagnosed febrile symptoms and the other half to asymptomatic volunteers. Data collected included the age and sex of the participants. *Leptospira* was detected by qPCR using a fragment of the *lipL32* gene from the bacteria's genome as a target. Fisher's exact test was used as a statistical method to estimate the relationship between the infection and the data collected.

**Results:** The study group comprised 134 female and 84 male patients ranging from ages 1 to 92 years, averaging 41 years. In this study, *Leptospira* infection was identified in the blood of 22/218 participating volunteers (10.09%), of which 20/109 (18.34%) presented febrile symptoms, while 2/109 (1.83%) were asymptomatic. The most affected participants were women with ages between 27 and 59 years. However, the analysis of the relationship between infection and the variables studied did not show statistical significance.

**Conclusions:** Leptospirosis was detected in blood samples from patients with undiagnosed febrile illness and asymptomatic symptoms in Sinaloa. The *lipL32* gene is useful as a target in identifying *Leptospira* in human blood in the acute phase of the disease.

**Keywords:** qPCR, *Leptospira*, leptospirosis, Sinaloa, Mexico, Zoonosis.

## Introduction

Leptospirosis is a bacterial zoonosis with worldwide distribution that affects humans and other animal species. It is recognized as an emerging disease responsible for epidemic outbreaks worldwide. It is estimated that around one million cases occur annually, with mortality close to 60,000 (Costa et al., 2015); the number of cases may vary according to the methodology used, so that it may be underestimated, mainly in developing countries because the clinical manifestations in the acute phase of the disease are similar to those of other febrile infections, such as influenza, dengue, rickettsiosis, malaria, salmonellosis, among others (Moreno and Agudelo, 2010; Miraglia et al, 2013; Riazi et al, 2014).

Leptospirosis is acquired mainly through direct or indirect contact with water or food contaminated with the urine of infected hosts. After colonization, *Leptospira* rapidly spreads through the blood circulation, staying preferentially in the liver and kidneys of the infected patients. The infection is usually asymptomatic, but mild symptoms such as fever, headache, and myalgia may occur. If not treated on time, it progresses to the severe form known as Weil's disease, characterized by jaundice, hypotension, hemorrhages, acute lung injury, and multiple organ failure that can be fatal. Acute kidney damage and failure have been reported to occur in 87% of the patients and can occur with or without jaundice. Hemorrhages can vary from petechiae to pulmonary hemorrhages or severe leptospirosis with pulmonary hemorrhagic (LSHP), and the latter can reach a mortality of up to 70% (Romero and Falconar, 2016; Vieira et al., 2018).

The infection generally occurs in a biphasic manner, a first phase called leptospiremia or acute phase, where *Leptospira* is in the blood circulation and nonspecific symptoms appear, such as fever, chills, myalgia and headache with a duration between 3 and 9 days, followed by a second stage called the immune phase, where *Leptospira* is mainly concentrated in the kidney and is secreted in the urine (Rajapakse, 2022).

The clinical diagnosis of leptospirosis is difficult due to the similarity of the symptoms with other infectious diseases such as dengue, hepatitis, and scrub typhus (Karpagam and Ganesh, 2020), therefore misdiagnosis is common. Support laboratory techniques, such as cell culture and serological tests (ELISA, MAT) are used. However, these techniques require a long time to perform and false negatives may occur in the acute phase of the disease. Unlike conventional diagnosis, molecular methods such as PCR are completed in less time and offer greater specificity and sensitivity, allowing an effective and timely treatment (Soo et al., 2020). In this sense, for detecting *Leptospira* by PCR, specific bacteria genes such as the *rrs*, *secY*, *flaB*, *lipL32*, *ligA*, *ligB*, and *ligC* have been used as targets.

Additionally, the implementation of real-time PCR increases the sensitivity of the diagnosis (Xu et al., 2014; Ma et al., 2020; Podgoršek et al., 2020). The *rrs* and *lipL32* genes have shown high sensitivity and specificity in diagnosing leptospirosis. However, the *lipL32* gene is specific to pathogenic species and has been successfully used for the detection of leptospirosis; it encodes an abundant membrane protein involved in pathogenicity (Güven Gökmen et al., 2016; Di Azevedo and Lilenbaum, 2021).

In the Americas, the prevalence of leptospirosis is around 28%. Among the countries with the highest number of reported cases are the United States of America (41%), Colombia (29%), Brazil (21%), and Mexico, with a prevalence of 29% (Browne et al., 2023). In Mexico, the first case of leptospirosis was described in 1920 in a patient who had been mistakenly diagnosed with yellow fever. Eighty years later, it was included among the notifiable diseases at the beginning of the registration of cases, where a wide distribution and seasonal behavior have been described with a greater frequency of infection during the rainy season that begins in the second half of the year, with an increase in cases starting in June (Sánchez-Montes et al., 2015). The distribution of cases occurs mainly in the states of Sinaloa, Tabasco, and Veracruz. At least 17% of the confirmed cases of leptospirosis have been reported in Sinaloa (DGE, 2019), where the diagnosis is made by serological tests following the official Mexican standard NOM-029-SSA2-1999 guidelines.

## MATERIALS AND METHODS

### Blood samples

Peripheral blood was collected by venipuncture using 3 mL tubes with EDTA from volunteer participants who attended the health services of a private clinical analysis laboratory in Culiacan Sinaloa and agreed to participate in the study through informed consent. The processing of samples from minors was authorized by one or both parents; the samples were labeled for identification with a consecutive sample number, age, and sex of the patients and were transported to the Lab for processing and analysis. The FCQB-UAS ethics committee approved this study.

### DNA extraction

The DNA was recovered from the samples using the Tissue DNA Preparation-column kit (Jena Bioscience) following the manufacturer's recommendations, with some modifications. A 1 mL aliquot of blood from each patient and 13 mL of erythrocyte lysis solution (1.55 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1 Mm EDTA) were added to a 15 mL conical tube, mixed by inversion and incubated for 20 min at room temperature, then centrifuged at 4500xg for 15 min, the supernatant was discarded and the DNA was recovered with the kit indicated above. The quality and concentration of the DNA were evaluated by spectrophotometry using the NanoDrop one (Thermo Scientific).

## Statistical analysis

A descriptive analysis of the sociodemographic variables was carried out in the samples analyzed, and the frequency of *Leptospira* infection was determined using Fisher's exact test with a 95% confidence interval and a significant "*p*" value of less than 0.05. The GraphPadPrism version 6 program was used (de Miranda et al., 2023).

## RESULTS

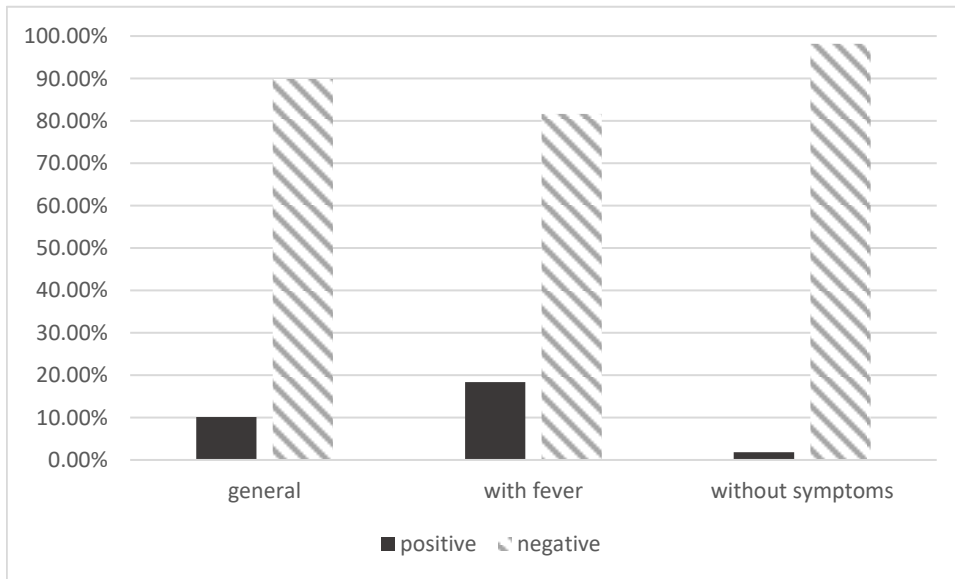
### DNA samples

DNA was obtained from the blood of 218 patients from Sinaloa: 109/218 (50%) of the patients had a fever of unknown origin and the rest were asymptomatic. To corroborate the integrity of the extracted DNA, an 800bp fragment of the beta-actin gene was amplified (data not shown).

The sample of individuals studied was made up of 134 female patients and 84 male patients, with a predominance of the female sex (61.47%). The ages ranged from 1 to 92 years, but the segment between 27 and 59 years old accounted for 53% of the total patients (Table 1). Of the 22 positive samples, 73% belonged to the female gender and 27% to the male gender. Regarding the age groups, 50% of the frequency was found in the range of 27-59 years, 14% in the range of more than 60 years, 9% in the range of 0-5 years, 9% in the range of 6-11 years, 9% in the range of 12-18 years, 9% in the range of 19 to 26 years (Figure 1).

**Table 1:** Distribution of the population by gender and age group and its association with leptospirosis.

Gender	patients	percentage	positive	<i>p</i> * value
Female	134	61.47	16/134	
Male	84	38.53	6/84	0.3559
<b>Age range</b>				
0-5	7	3	2/7	
6-11	12	6	2/11	
12-18	17	8	2/17	
19-26	20	9	2/20	
27-59	116	53	11/116	
60+	46	21	3/46	0.3845



**Figure 1:** Frequency of *Leptospira* in blood samples from patients with fever and without symptoms. The figure shows the frequency of positivity of the leptospirosis in the group with fever and without symptoms. Black bars represent positive samples, and striped bars represent negative samples.

#### qPCR assay

Samples with a ct value less than or equal to 37 were considered positive, and a null ct or higher value than 37 was considered negative (Table 2). The analysis showed positive results in 22 of the 218 samples (10.09%) (Figure 2). Most of the positive cases were found in patients with febrile symptoms (20/109, 18.34%), while only 2/109 (1.83%) were identified in asymptomatic patients (Figure 3).

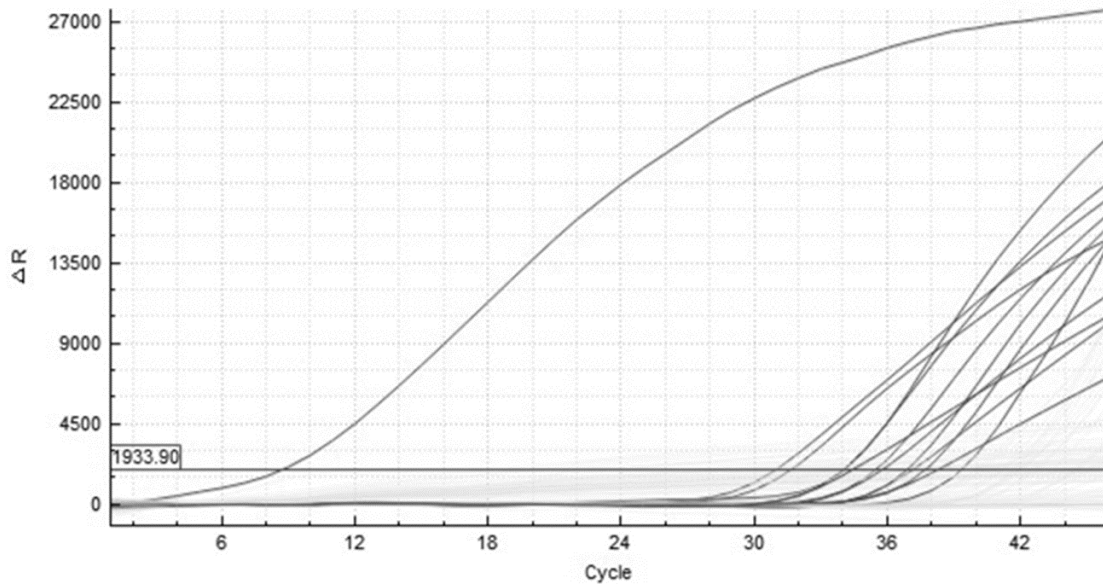
#### Statistical analysis

No statistical significance was observed between age and *Leptospira* infection or infection with gender (Table 1).

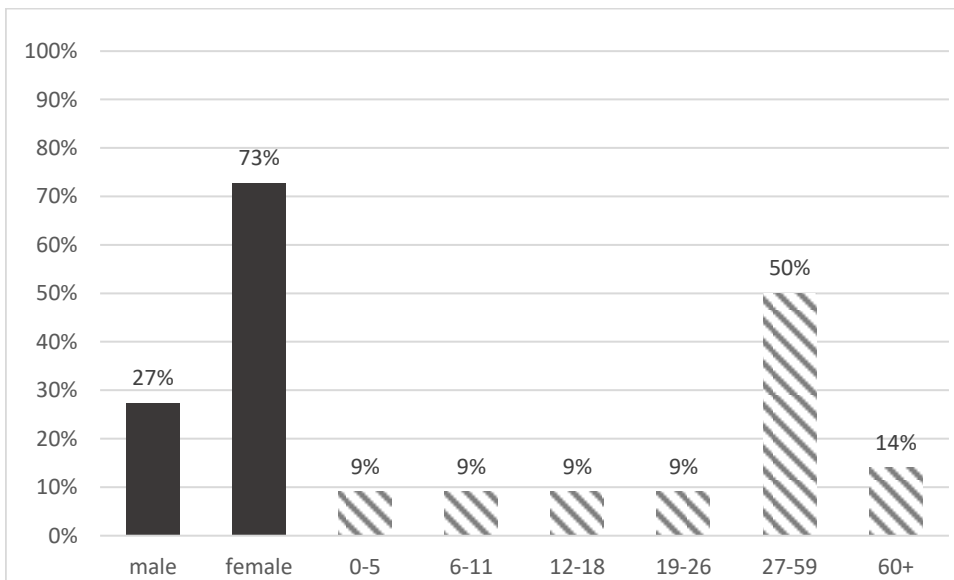
**Table 2:** Representative qPCR results.

SAMPLE	CT	CALL
C-	-	Negative
C+	8.28	Positive
4	36.86	Positive
5	40.23	Negative
6	33.77	Positive
116	-	Negative
117	44.32	Negative
123	31.69	Positive
124	39.74	Negative
125	33.81	Positive
131	44.23	Negative
133	45.91	Negative
140	44.19	Negative
148	30.67	Positive
149	40.96	Negative
150	21.04	Positive
155	35.14	Positive
157	36.51	Positive
163	41.61	Negative
165	31.37	Positive
171	-	Negative
179	18.13	Positive
180	28.57	Positive
195	42.35	Negative
196	42.51	Negative
197	27.06	Positive





**Figure 2: Representative amplification curve of the lipI32 gene by qPCR.** *Leptospira* DNA was detected by amplification of a 242 bp fragment of the *lipL32* gene. Samples with a ct value less than or equal to 37 were considered positive, and a null ct or higher value than 37 was considered negative. The analysis showed positive results in 22 of the 218 samples. A representative graph of the positive samples is shown.



**Figure 3: Percentage distribution of leptospirosis cases by gender and age range.** Black bars represent the positive samples by sex, and striper bars represent the positive samples by age group. The highest number of positive samples were found in female patients (> 70%) and the age group of 27-59.



## DISCUSSION

Leptospirosis is widely distributed in Mexico. Sinaloa has the highest number of cases registered yearly according to the Secretary of Health (DGE, 2019) and the highest mortality rate compared to the rest of the states (Sánchez et al., 2015). Leptospirosis in Mexico occurs every year with the highest incidence registered from June to October (Sánchez et al., 2015; Yescas et al., 2020). Therefore, the samples used in this study were taken in June, which was reported as the beginning of the epidemiological rebound, to demonstrate *Leptospira* infection in patients with fever of unknown origin.

This study included blood samples from patients who presented a febrile condition, which indicated the first phase of the disease, called leptospiremia or acute phase, when *Leptospira* is found in the blood (Le Turnier and Epelboin, 2019; Rajapakse, 2022). In addition, the diagnosis of leptospirosis should be considered in patients with any of these symptoms: fever, headache, myalgia, among others, or belongs to an endemic area for the disease such as Sinaloa (Pan American Health Organization / World Health Organization, 2017).

In the case of patients where acute leptospirosis was suspected due to the presence of symptoms, our data showed a percentage of positivity in febrile samples of 18.34%; however, negative samples could be positive for another endemic agent in the region, such as dengue, zika, and chikungunya (Secretary of Health and General Directorate of Epidemiology, 2017). Our results show a higher number of positives compared to that found by Hernández et al. (2020) who reported 3.23% positivity for *Leptospira* by MAT, which may be due to the fact that the technique used in this study can detect directly *Leptospira* from the beginning of the disease and MAT detects it indirectly through antibodies that are formed in the immune phase from the seventh day onwards, although it has been recorded that the formation of these antibodies in some patients could take months to be detected (Rajapakse, 2022). Therefore, it is advisable to use more sensitive techniques such as PCR, which has been demonstrated to detect leptospirosis in patients where MAT had obtained a negative result (Sandoval et al., 2018). In addition, serological tests such as MAT could be affected due to the high titers of antibodies due to past infections that can produce a false positive. Another disadvantage of MAT is that it is limited to laboratories that can maintain the culture of the strains necessary to carry out this technique (Budihal and Perwez, 2014).

In Sinaloa, this is the first study to detect acute leptospirosis through qPCR in patients with febrile symptoms of unknown origin, which could contribute to a better diagnosis and thus implement a timely diagnosis to reduce the mortality rate in this region.

### Conclusions:

Acute leptospirosis was detected in patients from Sinaloa, México who presented a febrile condition without a confirmed diagnosis for any other agent external to *Leptospira*. Some cases were also detected in patients without a febrile disease. We suggest to extend the sampling period for subsequent studies, allowing for a broader overview of *Leptospira* infection in the region.

## References

- Di Azevedo MIN and Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology* 2021; 72(5); 496–508. Available at: <https://doi.org/10.1111/lam.13442>.
- Browne ES, Pereira M, Barreto A, et al. Prevalence of human leptospirosis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *Pan American Journal of Public Health* 2023; 47(e126); 1–8. Available at: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.126>.
- Budihal SV, Perwez K. Leptospirosis diagnosis: Competency of various laboratory tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014; 8(1); 199–202. Available at: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950>.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9(9); 0–1. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- DGE. *Boletín epidemiológico* 2019. Available at: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/462794/BSEMANAL\\_19.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/462794/BSEMANAL_19.pdf).
- Güven T, Soyal A, Kalayci Y, et al. Comparison of 16s rna-pcr-rflp, lipL32-PCR and ompL1-PCR methods in the diagnosis of leptospirosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2016; 58(1); 2–7. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658064>.
- Hernández C, Gaxiola S, Enríquez I, et al. Leptospira serovars and of contagion risks in humans and dogs from Culiacan City , in Sinaloa , Mexico. *Abanico Veterinario* 2020; 10 ; 1–16. Available at: <https://doi.org/10.21929/abavet2020.40>
- Karpagam KB, Ganesh B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2020; 39(5); 835–846. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03797-4>.
- Ma XJ, Gong XQ, Xiao X, et al. Detection of leptospira interrogans in hedgehogs from central China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2020; 20(6); 427–431. Available at: <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2544>.
- Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of Leptospira interrogans serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 77(3); 195–199. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003>.
- de Miranda LH, Ferreira B, Machado M da S, et al. Analysis of LruC lipoprotein and identification of peptides candidates for vaccine development and diagnosis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2023; 18(2); 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281344>.
- Moreno N, Agudelo P. Application of conventional and multiplex PCR assays for identification of isolates of leptospira spp. in Colombia. *Revista Peruana de Medicina*

*Experimental y Salud Publica* 2010; 27(4); 548–556. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1726-46342010000400009>.

Organización Panamericana de la salud / Organización Mundial de la Salud. Leptospirosis - Notas Descriptivas. *Organizacion Panamerica de la Salud*; 2017; 1–9. Available at: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&Itemid=0&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&Itemid=0&lang=es).

Piredda I, Ponti MN, Palmas B, et al. Molecular typing of pathogenic leptospira species isolated from wild mammal reservoirs in sardinia. *Animals* 2021; 11(4); 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3390/ani11041109>.

Podgoršek D, Ružić E, Logar M, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. *BMC Microbiology* 2020; 20(1); 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>.

Rajapakse S. Leptospirosis: Clinical aspects. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London* 2020; 22(1); 14–17. Available at: <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>.

Riazi M, Zainul FZ , Bahaman AR , et al. Role of 72 kDa protein of Leptospira interrogans as a diagnostic marker in acute leptospirosis. *Indian Journal of Medical Research* 2014; 139; 308–313.

Romero CM, Falconar AK. Leptospira spp. and human leptospirosis. *Salud Uninorte* 2016, 32(1); 122–143. Available at: <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>.

Sánchez S, Espinosa DV, Rios CA, et al. Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and potential distribution of human cases. *PLoS ONE* 2015; 10(7); 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133720>.

Sandoval E, , Avilés M, Montesinos RM, et al. Estudio comparativo del diagnóstico de leptospirosis mediante PCR y MAT en el noroeste de México. *Acta Universitaria* 2018; 28(4); 50–55. Available at: <https://doi.org/10.15174/au.2018.1625>.

Secretaria de Salud and Dirección General de Epidemiología. *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx, Boletín Epidemiológico*; 2017. Available at: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico> (Accessed: 8 December 2023).

Soo ZMP, Khan, NA, Siddiqui R. Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. *Acta Tropica* 2020; 201; 1-9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105183>.

Le Turnier P, Epelboin L. Update on leptospirosis. *Revue de Medecine Interne* 2019; 40(5); 306–312. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.12.003>.

Di Azevedo MIN and Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology* 2021; 72(5); 496–508. Available at: <https://doi.org/10.1111/lam.13442>.

Browne ES, Pereira M, Barreto A, et al. Prevalence of human leptospirosis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *Pan American Journal of Public Health* 2023; 47(e126); 1–8. Available at: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.126>.

Budihal SV, Perwez K. Leptospirosis diagnosis: Competency of various laboratory tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014; 8(1); 199–202. Available at: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950>.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9(9); 0–1. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.

DGE. *Boletín epidemiológico* 2019. Available at: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/462794/BSEMANAL\\_19.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/462794/BSEMANAL_19.pdf).

Güven T, Soyal A, Kalayci Y, et al. Comparison of 16s rna-pcr-rflp, lipL32-PCR and omp11-PCR methods in the diagnosis of leptospirosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2016; 58(1); 2–7. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658064>.

Hernández C, Gaxiola S, Enríquez I, et al. Leptospira serovars and of contagion risks in humans and dogs from Culiacan City, in Sinaloa, Mexico. *Abanico Veterinario* 2020; 10; 1–16. Available at: <https://doi.org/10.21929/abavet2020.40>

Karpagam KB, Ganesh B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2020; 39(5); 835–846. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03797-4>.

Ma XJ, Gong XQ, Xiao X, et al. Detection of leptospira interrogans in hedgehogs from central China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2020; 20(6); 427–431. Available at: <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2544>.

Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of Leptospira interrogans serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 77(3); 195–199. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003>.

de Miranda LH, Ferreira B, Machado M da S, et al. Analysis of LruC lipoprotein and identification of peptides candidates for vaccine development and diagnosis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2023; 18(2); 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281344>.

Moreno N, Agudelo P. Application of conventional and multiplex PCR assays for identification of isolates of leptospira spp. in Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 2010; 27(4); 548–556. Available at:



**BUAP**

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Medicina  
otorga la presente:

# CONSTANCIA

**A: Rogelio Lagarde Guerrero**

Por haber obtenido el **3er Lugar** en la Exposición Oral, en la Modalidad Investigación básica; con el título: **“Implementación de un método basado en PCR-RFLPs para la identificación de especies patógenas de Leptospira”**, en el Marco del 2º Congreso Nacional de Bacteriología y Virología Clínico Molecular  
Realizado del 13 - 15 de noviembre del 2019.

“Pensar bien, para vivir mejor”  
H. Puebla de Z; a 15 de noviembre del 2019

M.C. José Luis Gandara Ramirez  
Director de la Facultad de Medicina

M.C. María Guadalupe Guzmán Coli  
Coordinadora Académica



DFIE/22/E4/068EA/4/Cg&M/61/241022-271022

EL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, LA RED DE BIOTECNOLOGÍA DEL  
IPN, LA UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
Y LA SOCIEDAD ESTUDIANTIL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

Otorgan la presente constancia a:

Rogelio Lagarde Guerrero, María de Jesús Navarro Arias, Sergio Alonso Duran Pérez, José Guadalupe Rendon

Maldonado

Por su participación como **PONENTE** con la presentación en CARTEL de su trabajo titulado:

*"In silico prediction of immunogenic epitopes of Leptospira membrane proteins"*

en el **3<sup>rd</sup> Biotechnology World Symposium** y **4<sup>o</sup> Congreso Estudiantil de Ingeniería Biotecnológica SEIBT.**

Dra. María Guadalupe Sotelo  
Directora de UPBI

Dra. Norma Leyva  
Coordinadora de la Red de Biotecnología

Hannia Sinaí Martínez Sánchez  
Presidenta de la SEIBT

Mazatlán, Sinaloa, México del 24 al 27 de octubre de 2022







FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



SE OTORGA LA PRESENTE

# CONSTANCIA

A:

Lagarde Guerrero Rogelio, Navarro Arias María de Jesús, Durán Pérez Sergio Alonso, Rendon Maldonado José Guadalupe

Por su participación en la presentación del póster científico con el trabajo titulado **"Frecuencia de Leptospira en muestras de sangre de pacientes de Culiacán Sinaloa"** impartida el día 25 de octubre de 2022, en el marco del Simposium Internacional, 80 aniversario de QFB.



ATENTAMENTE  
SURSUM VERSUS  
CULIACÁN, SINALOA, OCTUBRE 2022

*Eusiel Rubio Castro*

DR. EUSIEL RUBIO CASTRO  
DIRECTOR FCQB

14.3 formación de recursos

14.3.1 Tesis de maestría dirigidas



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico-Biológicas**  
**Programa de Posgrado Integral en Biotecnología**  
**Maestría en Ciencias con Orientación en**  
**Biotecnología de Salud**

**Asociación del polimorfismo GA del Codón  
333 y 637 del gen *TAP1* y su participación en  
el desarrollo de lesiones cervicales en  
pacientes sinaloenses VPH positivas**

**T E S I S**

que presenta

**Michelle Meza Vega**

como requisito para obtener  
el grado de

**Maestría en Ciencias con Orientación  
en Biotecnología de Salud**

**Directores de Tesis**

**Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado**  
**MC Rogelio Lagarde Guerrero**

Culiacán, Sinaloa, México

marzo de 2023





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SINALOA

SECRETARÍA GENERAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SINALOA  
SECRETARÍA GENERAL  
Culiacán, Rosales, Sin., Méx

DIRECCIÓN GENERAL DE PROFESIONES:

El C. MED. ESP. GERARDO ALAPIZCO CASTRO, Secretario General de la Universidad Autónoma de Sinaloa CERTIFICA: -----

--- Que en el Libro No. XVI-B de Actas de Exámenes de Posgrado de Maestrías (M-L) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, a foja No. 0026 se encuentra el ACTA DE EXAMEN sustentado por la C. MICHELLE VEGA MEZA, para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA DE SALUD, que a la letra dice:

--- "ACTA DE EXAMEN.- En cumplimiento a los Artículos 71 Fracciones I, II y III; 74 y 75 del Reglamento de Posgrado de la Universidad Autónoma de Sinaloa, siendo las 10:00 horas del día treinta del mes de marzo del año dos mil veintitres, se reunieron en Forma Virtual en la Ciudad de Culiacán, Sinaloa, el(la) ciudadano(a) Lic. Sandra Elena Ibarra Blancas en representación del Secretario General de la Institución así como los miembros del Jurado. Presidente: Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo, Secretario: Dra. Erika Yudit Ríos Iribe, Vocal(es): Dr. Sergio Alonso Durán Pérez nombrados para integrar el Jurado Calificador del Examen de Grado de: MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA DE SALUD a la sustentante: MICHELLE VEGA MEZA quien presentó en defensa un trabajo escrito titulado "ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO GA DEL CODÓN 333 Y 637 DEL GEN TAP1 Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LESIONES CERVICALES EN PACIENTES SINALOENSES VPH POSITIVAS". Siendo Director(es) de Tesis Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado, Mc. Rogelio Lagarde Guerrero. Declarado legalmente constituido el Jurado, se procedió a la presentación, interrogación y réplica del sustentante y al término de ello, el Jurado emite el resultado de: APROBADA POR UNANIMIDAD.- Levantándose para constancia la presente acta que firma el Jurado, el Sustentante y el Secretario General que DA FE.- El Secretario General.- Med. Esp. Gerardo Alapizco Castro.- El Jurado.- Presidente.- Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo.- Secretario.- Dra. Erika Yudit Ríos Iribe.- Vocal.- Dr. Sergio Alonso Durán Pérez.- Sustentante.- MICHELLE VEGA MEZA.- Firmados.- Ilegible.- Ilegible.- Ilegible.- Ilegible.- Rúbricas".

--- Se extiende la presente a solicitud de la interesada para los fines legales que procedan, en la Ciudad de Culiacán Rosales, Estado de Sinaloa, República Mexicana, siendo el día treinta del mes de marzo del año dos mil veintitres.-

REVISÓ:

L.C.P. MARÍA DE LOS ÁNGELES ESPINOZA CAMACHO

**14.3.2 Tesis de licenciatura dirigida**



**Universidad Autónoma de Sinaloa  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas  
Licenciatura en Químico Farmacéutico**

**Identificación de *Leptospira* en muestras de sangre de  
pacientes con cuadro febril**

**TESIS**

**Que presenta**

**Efren Antonio Ruiz Verdugo**

**Como requisito para obtener el título de  
Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo**

**Directores**

**Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado  
MC. Rogelio Lagarde Guerrero**

**Asesores**

**Dr. Sergio Alonso Durán Pérez  
MC. Cristel Samantha Benítez Bueno**

**Culiacán, Sinaloa, México**

**Junio de 2022**

# Acta de Examen

2022/016



Facultad de Ciencias  
Químico Biológicas  
Culiacán, Sinaloa, Méx.  
**DIRECCIÓN**

EXAMEN PRESENTADO  
POR

EFRÉN ANTONIO RUIZ  
VERDUGO

PARA OBTENER EL  
GRADO DE LICENCIADO  
EN QUÍMICO  
FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO

No. DE CUENTA  
1225833-4

RUVE970116HSLZRF03



En cumplimiento del Reglamento Interno de Titulación de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, siendo las **15:30 horas del día 08 del mes de junio del año 2022** se reunieron en el Auditorio QFB Ernesto Camacho Sánchez en la ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el C. Dr. José Giovanni Romero Quintana, Secretario Académico así como los ciudadanos MC. Josefina Sicairos Félix, Dra. María de Jesús Navarro Arias y Dr. Sergio Alonso Durán Pérez nombrados para integrar el Jurado Calificador del Examen Profesional del **C. Efrén Antonio Ruiz Verdugo** quien presentó un trabajo escrito titulado **Identificación molecular de Leptospira en muestras de sangre de pacientes con cuadro febril** ejerciendo como Directores de Tesis Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado y MC. Rogelio Lagarde Guerrero.

Se constituyó el jurado fungiendo como Presidente MC. Josefina Sicairos Félix, como Secretario Dra. María de Jesús Navarro Arias y como Vocal Dr. Sergio Alonso Durán Pérez.

Declarado constituido legalmente el jurado, se procedió a la presentación, interrogación, y réplica del sustentante, y al término de ello, el jurado emite el resultado de: **Aprobado por Unanimidad**

Levantándose para constancia la presente acta que firma el Presidente, el Secretario, el Vocal del Jurado, el Sustentante y el Secretario Académico que DA FÉ.

PRESIDENTE

VOCAL

María Navarro Arias

SECRETARIO

SECRETARIO ACADÉMICO

SUSTENTANTE

## XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

<b>Aa</b>	aminoácido
<b>ABCpred</b>	servidor de predicción de epítomos de células B basado en red neuronal artificial
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>GRAVY</b>	gran promedio del índice de hidrofobicidad
<b>HLApred</b>	identificación y predicción de aglutinantes HLA clase 1 y clase 2
<b>hra</b>	hora
<b>InDre</b>	El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>LipL21</b>	lipoproteína L21
<b>LipL32</b>	lipoproteína L32
<b>LipL41</b>	lipoproteína L41
<b>MHC</b>	complejo principal de histocompatibilidad
<b>min</b>	minutos
<b>OmpL1</b>	Proteína de membrana externa L1
<b>PH</b>	Potencial de hidrógenos

<b>PI</b>	Punto isoeléctrico
<b>seg</b>	segundos
<b>Vaxijen</b>	servidor predictor de antígenos protectores