

RESPOSTA IMUNOPROTETORA E ESTERILIZANTE DA BACTERINA CONTRA LEPTOSPIROSE.

MATHEUS ACEVEDO MONTANO¹; MARCELLE MOURA SILVEIRA²; JÉSSICA DIAS SOUZA²; NEIDA LUCIA CONRAD²; GABRIANNA TIMM²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

¹*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – matheusmontano64@hotmail.com*

²*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – jessi.dias@yahoo.com.br; marcellemsilveira@gmail.com*

³*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

Anualmente ocorrem mais de 873 mil casos severos de leptospirose no mundo, contabilizando 49 mil mortes (PICARDEAU et al., 2014). A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (DENEKE et al., 2014). Humanos podem infectar-se através do contato direto ou indireto com a urina de animais portadores de leptospires patogênicas, sendo que a transmissão de pessoa para pessoa é extremamente rara. Os sintomas vão desde um estado febril moderado, vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais podendo evoluir para uma forma mais grave da doença com uma taxa de mortalidade em torno de 10-15% (KO et al., 1999; MCBRIDE et al., 2005). No Brasil, a síndrome hemorrágica pulmonar severa (SHPS) é a principal causa de morte durante epidemias (GOUVEIA et al., 2008). A principal medida profilática contra a leptospirose é o saneamento básico, pois a falta de limpeza urbana acaba atraindo ratos, um dos principais disseminadores urbanos da doença (ATHANAZIO et al., 2008). A falta de medidas eficazes de controle, como saneamento básico, somado ao fato de que as ferramentas laboratoriais disponíveis para o diagnóstico são operosas, dificultam respostas efetivas à nível de saúde pública (MCBRIDE et al., 2005; REIS et al., 2008), sendo dessa forma o uso de vacina imprescindível para a prevenção e controle da doença.

É de suma importância o desenvolvimento de uma vacina para animais, que são os principais vetores e disseminadores da doença, para contribuir com o enfraquecimento do ciclo infeccioso da *Leptospira* (VERMA; RAMESH et al., 2015). Uma vacina também pode evitar consequências intrínsecas à contaminação bovina, como a baixa taxa de reprodução e uma possível baixa produtividade, unindo interesse econômico e saúde pública.

A imunização com bacterinas é bem documentada e protege animais contra desafio (FAINE, 1999). Vacinas com bacterinas têm induzido proteção contra infecção com *Leptospira*, desenvolvendo uma resposta imune humoral protetora sendo essa, uma proteção sorovar-específica. Estas vacinas são rotineiramente utilizadas na medicina veterinária (ANDRE-FONTAINE et al., 2003) e também foram avaliadas para imunização em massa em alguns países como China e Cuba onde apresentaram eficácia de 75% (YAN et al., 2003) e 97% (MARTINEZ et al., 2004) respectivamente. Têm sido encontrados baixos níveis de DNA leptospiral nos rins de animais vacinados com bacterinas, sugerindo que estas podem não induzir imunidade esterilizante (COUTINHO et al., 2011). Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar se a bacterina induz imunidade esterilizante e proteção cruzada

durante uma infecção ativa em hamsters vacinados com bacterina e desafiados com *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, Fiocruz L1-130.

2. METODOLOGIA

Para o estudo foram feitos 3 experimentos cada um contendo 5 grupos (A até E) com 3 controles negativos cada (F, G, H), com exceção do primeiro experimento que contou apenas com um controle negativo. Cada grupo continha 4 hamsters sírios capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) sendo que a utilização desse modelo animal já foi aprovada como ideal para estudos com leptospirose (HAAKE, 2006). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as regulamentações, políticas e princípios do manual do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel. Os animais estavam saudáveis e foram utilizados com 4-5 semanas de idade (Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil).

2.1 Produção de bacterina

A bacterina foi produzida a partir de cultivo de *L. interrogans*, sendo que foram realizadas três lavagens do cultivo em tampão fosfato-salino (PBS) estéril, e após as etapas de lavagens o pellet de células foi ressuspensionado em 5 mL de PBS e foi realizado a contagem de células bacterianas em câmara de Petroff- Hausser. Uma concentração de 10^8 cel/mL foi inativada a 56 °C por 20 minutos e armazenado à -20 °C até a sua utilização.

2.2 Imunização e desafio

Os hamsters receberam via intramuscular imunizações no dia 0 e outra no dia 14. Três dias antes da primeira imunização e sete dias depois da segunda imunização coletamos amostras de sangue do plexo venoso retro-orbital.

A cepa utilizada para o desafio foi a *interrogans* sorovar Copenhageni, Fiocruz L1-130, cultivada em meio líquido EMJH a 28 °C. Duas semanas após a última imunização (dia 28), os animais foram desafiados com 500 leptospiras via intraperitoneal.

Foram realizadas as eutanásias nos dias: 1, 14, 21, 42, e 56 após o desafio (grupos A-E) respectivamente. O objetivo dessas eutanásias seriadas era poder analisar posteriormente se a vacina é esterilizante de fato. Os animais vacinados com PBS estéril, no caso os controles negativos do segundo e terceiro experimento, grupos F e G, foram eutanasiados 1 e 7 dias após o desafio, respectivamente, já os animais do grupo H foram eutanasiados quando apresentaram sinais de *endpoint*. No primeiro experimento o único controle negativo foi eutanasiado quando os animais desenvolveram sinais de *endpoint*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fizemos culturas de reisolados renais em meio líquido EMJH dos animais eutanasiados e se observou semanalmente a cultura por microscopia de campo escuro durante 4 meses, e o resultado é que não houve crescimento de leptospiras, o que corrobora com o objetivo deste trabalho em confirmar a propriedade esterilizante da bacterina.

No estudo já mencionado realizado em Cuba, de todas as pessoas que foram vacinadas com bacterinas e foi possível fazer uma avaliação clínica depois da segunda vacina, nenhuma delas apresentou efeitos secundários que fosse necessária sua hospitalização (MARTINEZ et al., 2004). O fato de não apresentar

efeitos secundários aliado à alta efetividade da vacina obtida por eles (97%) e sua propriedade esterilizante, confirmada por esse estudo, são resultados promissores e que podem ser mais bem explorados para estabelecer uma vacina animal que englobe sorovares endêmicos.

A bacterina foi capaz de induzir uma resposta imune esterilizante com uma vacina tetravalente em cães (Klaasen et al., 2013). Além disso, uma alta proteção também foi demonstrada em vacina que utilizou bacterina como antígeno em bovinos (Lucas et al., 2014).

A análise do desafio heterólogo encontra-se em andamento. Os hamsters foram imunizados com a cepa L1-130 e duas semanas depois da última dose, desafiados com o sorovar Mozdok.

4. CONCLUSÕES

Por meio deste estudo comprovou-se que a bacterina é esterilizante no modelo hamster.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ-FONTAINE, G.; BRANGER, C.; GRAY, A. W.; KLAASEN, H. L. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. **Veterinary Record**, v.,n., p.165 – 169, 2003.

ATHANAZIO D. A.; SILVA E. F.; SANTOSA C.S., ROCHA M. G.; VANNIER-SANTOS A. M., MCBRIDE A. J., KOA A. I.; REIS MITERMAYER G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**. v.105, n.2, p. 176 – 180, 2008.

COUTINHO, M. L.; CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J. T.; LEWIS, M. S.; ALEIXO, J. A. e HAAKE, D. A. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.12, p. e1422. 2011.

DENEKE, Y.; SABARINATH, T.; GOGIA, N.; LALSIAMTHARA, J.; VISWAS, K. N. e CHAUDHURI, P. Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. **Molecular and Cellular Probes**, v.28, n.4, p. 141-6. 2014.

DEVESON LUCAS, D. S.; LO, M.; QUINSEY, N. S.; MURRAY, G. L.; ALLEN, A. e ADLER, B. Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo subtype Hardjobovis vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.169, n.3-4, p. 163 - 170, 2014.

FAINE S.; ADLER B.; BOLIN C.; PEROLAT P. ***Leptospira* and Leptospirosis**. Austrália: MediSci, 1999.

GOUVEIA, E. L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A. L.; AIRES, T. S.; VILLASBOAS-BISNETO JC; QUEIRROZ A; SANTOS AC; SALGADO K; REIS MG; KO AI. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.14, n.3, p. 505 – 508, 2008.

HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**, v. Chapter 12, p. Unit 12E 2. 2006.

KLAASEN, H. L.; VAN DER VEEN, M.; MOLKENBOER, M. J.; SUTTON, D. A. novel tetravalent *Leptospira* bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs. **The veterinary record**, v.172, n.7, p. 181, 2013.

MARTÍNEZ, R.; ÁLVAREZ, A.; FERNÁNDEZ, C.; RODRÍGUEZ, I.; DÍAZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; OBREGÓN, A. M.; TOLEDO, M. E. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. **Panamerican jornal of Public Health**, v.15, n.4, p. 249 – 255, 2004.

MCBRIDE A. J.; ATHANAZIO D. A.; REIS MITERMAYER G.; KO A.I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v.18, n. 5, p. 376 – 386, 2005.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOLOUDIS, A. N.; DURSKI, K. e HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G. e KO, A. I. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.4, p. e228. 2008.