

## ESTABELECIMENTO DE UMA VIA NATURAL DE INFECÇÃO POR *LEPTOSPIRA INTERROGANS* EM HAMSTERS

JÉSSICA DIAS SOUZA<sup>1</sup>; ANDRÉ ALEX GRASSMANN<sup>2</sup>; NEIDA LUCIA CONRAD<sup>2</sup>; MARCELLE MOURA SILVEIRA<sup>2</sup>; SAMUEL RODRIGUES FÉLIX<sup>2</sup>; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – gsk.souza@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com; neidaconrad@yahoo.com.br; marcellemiliveira@gmail.com; samuelrf@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, possui distribuição mundial e é um problema de saúde pública, com impacto também na produção animal. Esta doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Atualmente é estimado que ocorram cerca de 873 mil casos graves e 49 mil mortes anuais em todo o mundo (PICARDEAU et al., 2014).

A abordagem mais eficiente para o controle e prevenção da leptospirose é o uso de vacinas. As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas, compostas por um ou mais sorovares endêmicos de determinado local e estão disponíveis para cães, suínos, bovinos e para humanos em alguns poucos países (VERMA et al., 2013). Esta estratégia vacinal apresenta uma série de problemas, principalmente reações adversas e imunidade de curta duração restrita aos sorovares inclusos na vacina (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Desta forma, o desenvolvimento de uma nova vacina contra leptospirose permanece um desafio, justificando os esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes.

Ratos e camundongos são os principais reservatórios das leptospiras, albergando-as nos rins e disseminando-as através da urina. Estes animais, os modelos mais utilizados para experimentação animal, não apresentam sinais clínicos da doença, sendo incompatíveis com estudos onde é necessária a observação das consequências da infecção por leptospiras (DELLAGOSTIN et al., 2011). O hamster sírio capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) apresenta sinais de infecção, desenvolvendo leptospirose aguda grave e letal, o que o torna o modelo animal ideal para estudo de vacinas contra leptospirose, bem como para compreender os aspectos imunológicos e patológicos da doença (HAAKE, 2006).

Desde os primeiros trabalhos na investigação do estabelecimento da leptospirose, seja para o desenvolvimento de vacinas ou entendimento da doença, a infecção experimental dos modelos animais é feita por injeção intraperitoneal (IP) das leptospiras virulentas, que a partir daí estabelecem a infecção (DELLAGOSTIN et al., 2011). Esta via clássica, não reproduz a entrada natural das bactérias no hospedeiro, que ocorre principalmente através da pele (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Dessa forma, proteínas leptospirais importantes para a entrada das bactérias no hospedeiro e com potencial para uso como alvo para uma vacina contra leptospirose podem estar sendo subaproveitadas.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de infecção transcutânea (TC) que simule fielmente a infecção natural por leptospiras, compará-lo com a via intraperitoneal e aplicá-la em testes de vacina.

### 2. METODOLOGIA

**2.1 Cultivo:** Foi cultivada *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em meio EMJH (DIFCO/BD). A infecção de hamsters foi realizada com as bactérias em fase exponencial de crescimento e com até 5 passagens *in vitro*.

**2.2 Via transcutânea:** Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com as diretrizes e normas vigentes e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel, sob nº 3783. Previamente à infecção via TC, a pele na região interna da coxa da pata traseira foi levemente raspada com uma lâmina de bisturi, sem ocorrer sangramento. Após a raspagem estes animais foram expostos a uma solução contendo  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  leptospiras/ml em um volume total de 10 ml de solução tampão de fosfato/salina (PBS), dentro de um béquer de 1 L, durante 5 minutos.

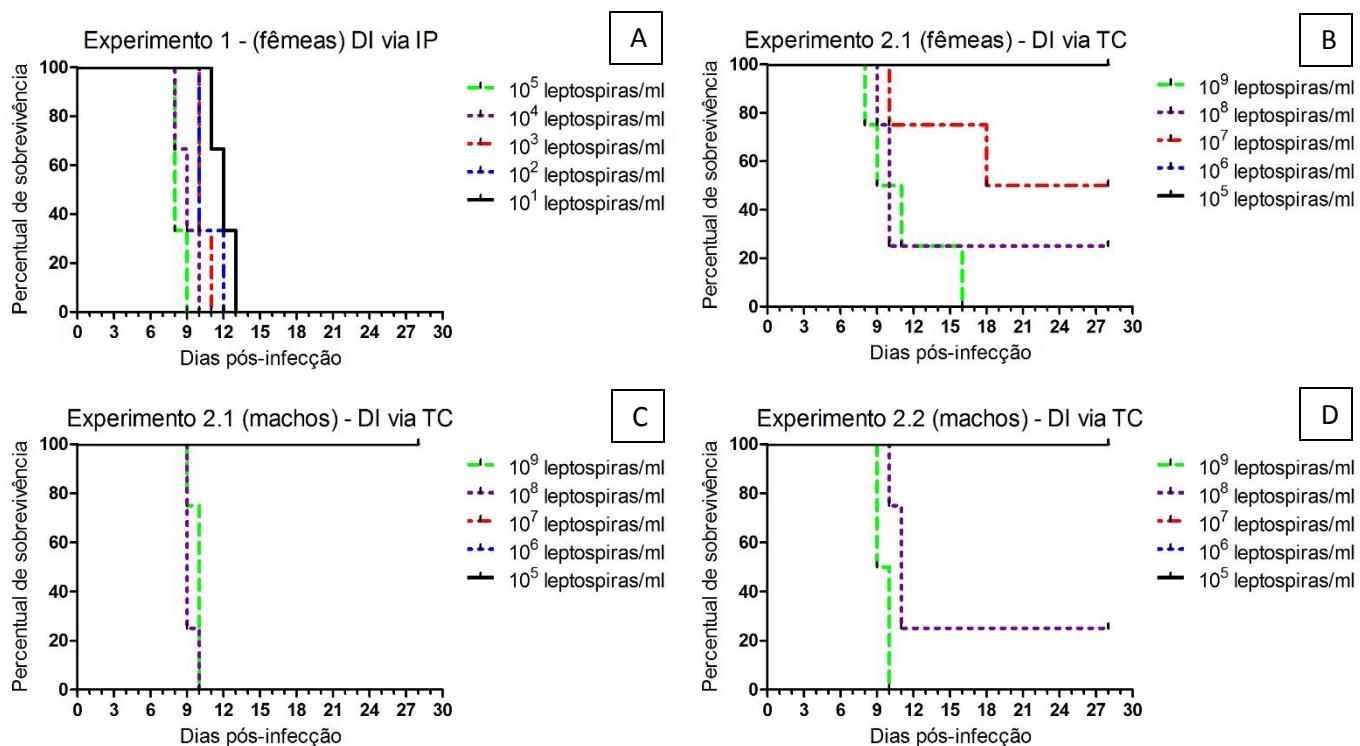
**2.3 Experimentos:** Neste trabalho foram realizados sete experimentos: para avaliar Dose Infectante (DI) via IP (1), para avaliar a DI via TC seguido de uma repetição (2.1 e 2.2), para avaliar a dinâmica de infecção via TC e IP (3) e para avaliar a via associado à vacina contra leptospirose (bacterina), seguido de duas repetições (4.1, 4.2 e 4.3). No experimento 1 de DI via IP foram utilizados 15 hamsters fêmeas, divididas em três animais por grupo e cada grupo com uma concentração diferente:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  leptospiras/ml de PBS. No experimento 2.1 foram utilizados 20 hamsters machos e 20 fêmeas, divididos em oito animais por dose (quatro fêmeas e quatro machos) com as concentrações de  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  leptospiras/ml. No experimento 2.2 foi realizada uma repetição com 20 hamsters machos nas concentrações de  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  leptospiras/ml. No experimento 3 foram utilizados 40 hamsters fêmeas, todos infectados com  $10^9$  leptospiras/ml, mas com diferentes pontos para eutanásia após infecção (dias 1, 3, 5, 7 e 9 pós infecção), quatro hamsters por grupo. Ainda neste experimento, 20 animais foram infectados pela via TC e 20 pela via IP. No experimento 4.1 foram utilizados 10 hamsters machos, para avaliar a utilização da via TC em experimentos com vacinas, sendo assim cinco hamsters foram imunizados com duas doses de bacterina ( $10^8$  bactérias) com intervalos de 14 dias entre cada dose, e cinco hamsters receberam tampão-fosfato-salino (PBS), após 14 dias, foram desafiados com  $10^9$  leptospiras/ml via TC. Nos experimentos 4.2 e 4.3, realizamos repetições de 4.1, com hamsters fêmeas e machos, respectivamente. Os hamsters foram monitorados diariamente para avaliação de sinais clínicos de leptospirose, utilizados como pontos de desfecho para eutanásia, a citar presença de icterícia, apatia, prostração e perda de  $\geq 10\%$  do peso (COUTINHO et al., 2011). Animais que apresentaram pelo menos um destes sinais combinado com a perda de peso foram eutanasiados pela asfixia por CO<sub>2</sub>.

**2.4 Reisolamento:** Foi realizado reisolamento de leptospiras dos experimentos 2.1, 3, 4.1, 4.2 e 4.3, a partir do cultivo de macerado de rim em meio EMJH. Estas culturas foram acompanhadas por até 12 semanas, buscando verificar a presença de leptospiras.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos gráficos abaixo (Fig. 1), podemos observar que a via TC é viável, e em doses mais altas que pela via IP, o que pode ser explicado pelo fato de que as bactérias precisam romper barreiras naturais, como a pele para disseminar no hospedeiro e estabelecer a infecção. A DI encontrada para machos na via TC foi de  $3,16 \times 10^7$  leptospiras/ml de PBS, e  $1,7 \times 10^7$  leptospiras/ml para fêmeas, enquanto a DI IP foi de 3 a 4 (cálculo= 3,16) leptospiras inoculadas IP para fêmeas. A concentração de  $10^9$  leptospiras/ml de PBS foi adotada como padrão para os

demais experimentos, pois levam todos os animais a desenvolver leptospirose letal. A partir das análises de cultivo de macerado de rim, fígado, pulmão e sangue, foi confirmada a presença de leptospires nos diferentes órgãos, em diferentes momentos pós-infecção, conforme a tabela 1.



**Figura 1.** Percentual de hamsters que desenvolveram leptospirose letal durante o tempo de experimentação (em dias), para cada experimento realizado: experimento 1, DI via IP (A), experimento 2.1 – fêmeas (B) e 2.1 – machos, DI via TC (C), experimento 2.2, repetição da DI via TC (D).

**Tabela 1.** Cultivos *in vitro* positivos para leptospires referentes ao experimento 3, considerando diferentes dias para eutanásia, órgão cultivado e via utilizada para infecção.

Via para infecção	Dia da eutanásia	Órgão			
		Rim	Fígado	Pulmão	Sangue
Transcutânea	1	0/4	0/4	0/4	NC
	3	3/4	3/4	1/4	1/4
	5	4/4	4/4	4/4	4/4
	7	4/4	4/4	4/4	4/4
	9	4/4	2/4	3/4	2/3
Intraperitoneal	1	0/4	0/4	0/4	0/4
	3	1/4	1/4	0/4	0/4
	5	4/4	4/4	4/4	4/4
	7	4/4	4/4	4/4	4/4
	9	4/4	4/4	4/4	3/3

Todos os cultivos de macerado de rim dos animais vacinados com bacterina e desafiados pela via TC com  $10^9$  leptospires/ml foram negativos, enquanto os cultivos de rim de animais do grupo controle, inoculado apenas com PBS foram positivos. Estas observações reforçam a viabilidade da aplicação de infecção via TC em experimentos para desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose.

## 4. CONCLUSÕES

A via de infecção transcutânea é viável para experimentos de estudos com leptospirose, podendo ser utilizada em experimentos que visam o desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose simulando a infecção natural. A exposição de hamsters machos e fêmeas a concentração de  $10^9$  leptospiras/ml resulta em leptospirose letal dentro de 8 a 10 dias pós infecção. Esta metodologia poderá contribuir para um melhor entendimento da doença e para o desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis. Veterinary Microbiology*, Londres, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- COUTINHO, M.L.; CHOY, H.A.; KELLEY, M.M.; MATSUNAGA J.; BABBITT, J.T.; LEWIS, M.S. ALEIXO, J.A.G.; HAAKE, D.A. A ligA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 5, p. 1-10, 2011
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FÉLIX, S.R.; SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, Estados Unidos, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.
- HAAKE, D.A. Hamster model of leptospirosis. In: COICO, R. **Current Protocols in Microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 2006. Cap. 12, p. 1-16.
- PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOLOUDIS, A.N.; DURSKI, K.; HARTSKEERL, R.A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. Estados Unidos, v. 78, p. 1–8, 2014.
- VERMA, R.; KHANNA, P.; CHAWLA, S. Whole-cell inactivated leptospirosis vaccine: future prospects. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. Estados Unidos, v.9, n.4, p. 763-5, 2013.