

VACINA INATIVADA ASSOCIADA À PROTEÍNA EXTERNA DE MEMBRANA CONTRA LEPTOSPIROSE

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (DENEKE et al., 2014). Os sintomas vão desde um estado febril moderado, vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais, podendo evoluir para uma das formas mais grave da doença com uma taxa de mortalidade em torno de 10-70% (MCBRIDE et al., 2005), com mais de 1 milhão de casos ao ano e ~60.000 fatalidades (COSTA et al., 2015). A falta de medidas eficazes de controle, como saneamento básico, somado ao fato de que as ferramentas laboratoriais disponíveis para o diagnóstico 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.

Atualmente, as únicas vacinas contra leptospirose encontradas comercialmente são constituídas de bacterina, a bactéria inativada, que por induzir uma resposta timo-independente não gera células T de memória e, portanto não confere proteção de longa duração, sendo necessária a revacinação anual. Além disso, vacinas de bacterina estão relacionadas a reações adversas e são sorovar específica, sendo este, o maior problema da vacina, que embora seja recomendada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) limita-se a 3 espécies; *L. interrogans* (sorovares Bratislava, Canicola e Pomona), *L. borgpetersenii* Hardjo e *L. kirschnerii* Grippotyphosa. No mercado existem algumas empresas que produzem vacinas multivalentes a fim de tentar maximar a proteção, porém estudos mostram que há redução da efetividade da vacina.

A proteína LigB foi identificada como proteína de membrana externa e fator de virulência de cepas patogênicas e sua porção N-terminal é altamente conservada (MCBRIDE et al., 2009). Proteínas recombinantes têm se mostrado bons alvos vacinais, induzindo resposta timo independente. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a proteção da união da bacterina com a LigBrep em desafio homólogo até 2 meses após a última dose da vacina.

2. METODOLOGIA

Para este estudo foram realizados 2 experimentos independentes. Hamsters sírios capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) foram divididos em quatro grupos (controle negativo, rLigB, Bacterina e rLigB associada a Bacterina) cada um contendo 4 animais. 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). Os animais utilizados neste projeto foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Produção da bacterina e rLigBrep

A bacterina foi produzida a partir de cultivo de *L. interrogans*. Primeiramente foram-se realizadas três lavagens do cultivo em tampão fosfato-salino (PBS) estéril, e após as etapas de lavagens o *pellet* de células foi ressuspenso em 5 mL de PBS e em seguida realizada a contagem de células bacterianas em triplicata na 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.

A proteína de interesse foi expressa de forma insolúvel, portanto tivemos que solubilizá-la contra um gradiente de ureia. Depois purificamos por cromatografia de afinidade utilizando o sistema automatizado AKTA Start.

2.2 Imunização e desafio

Os hamsters receberam duas doses de vacinas, via intramuscular no dia 0 e 14. Três dias antes da primeira imunização e sete dias depois da segunda coletamos amostras de sangue - com auxílio de um colírio anestésico - através do plexo venoso retro-orbital.

Cada dose do preparado vacinal correspondia a: Grupo controle, 10 mL de PBS; Grupo rLigB, 50 µg de rLigB; Grupo bacterina, 10^8 leptospiros; Grupo Bacterina associada a rLigB, 10^8 leptospiros e 50 µg de proteína.

A cepa utilizada para o desafio foi a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, Fiocruz L1-130, cultivada em EMJH líquido a 28 °C. No dia 28, (Duas semanas após a última imunização) os animais foram desafiados com 200 leptospiros via intraperitoneal.

2.3 Análises laboratoriais

Para avaliar a ação esterilizante das vacinas, após a eutanásia, amostras de tecido renal foram macerados em meio EMJH e armazenados a 28 °C para observar o crescimento de Leptospiros. As culturas foram observadas semanalmente por microscopia de campo escuro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na repetição I, 50% dos animais vacinados com LigB e desafiados um mês depois sobreviveram. A partir do cultivo renal não se detectou leptospiros, indicando ação esterilizante nos sobreviventes. A vacina de Bacterina e a bacterina associada à proteína obtiveram os mesmos resultados em ambos períodos analisados com 100% de proteção e ação esterilizante.

Na repetição II, os animais desafiados 2 meses após a última dose do grupo Bacterina apresentaram 50% de proteção e ação esterilizante nos sobreviventes, enquanto o grupo LigB apresentou 50% de proteção e não foi esterilizante. O grupo controle apresentou 25% de sobrevivência no experimento II, mês 1, que possivelmente se deve à alguma resistência natural daquele animal (Tabela 1). A associação da Bacterina com a LigB protegeu e

teve ação esterilizante nos dois experimentos até os 2 meses de avaliação, demonstrando através deste modelo animal ser uma vacina eficaz em proteger contra a doença e também evitar que o patógeno se aloje no tecido renal e prossiga o ciclo infeccioso da *Leptospira*.

Tabela 1. Resultados de sobrevivência e cultivo de tecido renal.

	Bacterina			LigB			Bacterina + LigB			PBS (Controle)	
	% de Sobrevivência	Valor de P*	Cultivo Positivo	% de Sobrevivência	Valor de P*	Cultivo Positivo	% de Sobrevivência	Valor de P*	Cultivo Positivo	% de Sobrevivência	Cultivo Positivo
Experimento I mês 1	100% (4/4)	0.0286	0/4	50% (2/4)	0.4286	(2/4)	100% (4/4)	0.0286	0/4	0% (0/4)	4/4
Experimento I mês 2	100% (4/4)	0.0286	0/4	100% (4/4)	0.0286	(4/4)	100% (4/4)	0.0286	0/4	0% (0/4)	3/4
Experimento II mês 1	100% (4/4)	0.0286	0/4	100% (4/4)	0.0286	(4/4)	100% (4/4)	0.0286	0/4	25% (1/4)	2/4
Experimento II mês 2	50% (2/4)	0.4286	2/4	50% (2/4)	0.4286	(2/4)	100% (4/4)	0.0286	0/4	0% (0/4)	4/4

A proteção induzida pela proteína recombinante foi de 50-100% e está de acordo com outro trabalho feito pelo grupo, conferindo proteção de 60-100% (dados ainda não publicados). Faltam ainda análises de histopatológicas do fígado, rim e pulmão, bem como o qPCR com desses órgãos. Faremos ainda os ELISAs com os soros e a fim de obter maiores informações estamos procedendo com um experimento de 12 meses de avaliação.

4. CONCLUSÕES

A associação da Bacterina com a LigB protegeu e teve ação esterilizante nos dois experimentos até os 2 meses de avaliação, demonstrando através deste modelo animal ser uma vacina eficaz em proteger contra a doença e também evitar que o patógeno se aloje no tecido renal e prossiga o ciclo infeccioso da *Leptospira*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.. "Vaccines against leptospirosis". **Current Topical Microbiology Immunology**, Germany, v.387, p. 251-272, 2015.

COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Tropical Disease**, v.9, n.9, p. e0003898. 2015a.

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.

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

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.

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.

MCBRIDE, A. J., et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infect Genet Evol**, v.9, n.2, p. 196-205. 2009.

Faine SB, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne: MediSci 1999