

AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO A LONGO PRAZO DE VACINAS PARA LEPTOSPIROSE

PAMELA SCARAFFUNI CABALLERO¹; MARCELLE MOURA SILVEIRA²; LIANA NUNES BARBOSA²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

¹ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel pamelascaraffuni@gmail.com

² LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel marcellemsilveira@gmail.com; liana.tlo@gmail.com

³ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (DENEKE et al., 2014). Segundo dados do portal da saúde, no Brasil, a doença é considerada endêmica, tornando-se epidêmica quando associada a períodos de chuva intensa, enchentes e saneamento básico precário (MCBRIDE et al., 2005). Ainda segundo o portal da saúde, até setembro de 2017 foram registrados 2003 casos de leptospirose no Brasil (SAUDE, 2017).

A vacinação é a melhor alternativa para o controle da leptospirose (DELLAGOSTIN et al., 2011). As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas, inativadas por calor ou formalina, muito utilizadas na medicina veterinária conferindo proteção. Em países como China e Cuba são feitas imunizações em humanos com eficácia (ADLER, 2015; YAN et al., 2003; MARTINEZ et al., 2004; MCBRIDE et al., 2005). Porém estas vacinas são sorovares específicas e possuem alguns efeitos colaterais, além do seu poder de proteção ser curto (6 a 12 meses), sendo necessário reforçar a dose. A imunidade conferida pela bacterina é dirigida principalmente contra o lipopolissacarídeo (LPS), um antígeno independente de T, que envolve anticorpos IgM e não confere uma resposta de memória. Entretanto, diferentemente da bacterina, as vacinas recombinantes nem sempre estão associadas com uma alta proteção (FAISAL et al., 2009; YAN et al., 2009; CAO et al., 2011).

Foi identificado um novo fator de virulência em leptospiros patogênicas: as proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*) (MATSUNAGA et al., 2003). A LigB é uma proteína de membrana externa e sua porção N-terminal é altamente conservada (MCBRIDE et al., 2009), sendo um bom candidato a alvo vacinal, já que proteínas recombinantes geram respostas timo-dependentes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial protetor da vacina de bacterina quando associada à proteína recombinante LigBrep em modelo animal para a infecção aguda (hamster).

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo da bacterinas

Foi realizado o cultivo de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. As bactérias foram recuperadas por centrifugação e três lavagens do cultivo com solução salina tamponada fosfatada (PBS) estéril foram realizadas. O *pellet* foi ressuspenso em 5ml de PBS e a contagem das bactérias foi realizada em câmara de Petroff-Hausser. Uma concentração de 10⁸ leptospiros/ml foi obtida e as bactérias foram inativadas a 56°C por 20 minutos.

2.2 Expressão da proteína recombinante LigBrep

Cepas competentes de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) foram transformadas

com o plasmídeo pAE/LigBrep por choque térmico. Após a expressão da proteína, a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel utilizando sistema ÄKTA start e a confirmação mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente, a proteína foi dialisada e quantificada pelo Kit BCA Protein Assay (Pierce).

2.3 Produção das vacinas

As vacinas foram preparadas utilizando a bactéria, proteína recombinante LigBrep e PBS 1x. Para a vacina com bactéria, 10^8 leptospiras/ml foram adicionadas a PBS 1x estéril (controle positivo). Para as vacinas com a proteína recombinante LigBrep, foram utilizadas 60µg da proteína recombinante adsorvida em adjuvante hidróxido de alumínio somente ou associada a bactéria. Para controle negativo, as vacinas foram preparadas com PBS 1x adicionado a adjuvante hidróxido de alumínio. As vacinas foram incubadas sob agitação por 4 horas a 4°C. Serão testadas as eficiências das vacinas a longo prazo, para isso, os animais serão desafiados 1 mês, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses e 30 meses após a imunização (Tabela 1).

2.4 Imunização dos animais

Hamsters sírios capa-dourada (*Mesocricetus auratus*) com 4 semanas de idade foram utilizados para avaliar a eficácia da proteção das vacinas testadas. Como modelos animais suscetíveis a infecção aguda, apresentam sinais clínicos característicos da doença e sua utilização é comprovada nos estudos em leptospirose (HAAKE, 2006). Os experimentos foram realizados seguindo o manual do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL. A imunização foi realizada via intramuscular nos dias 0 e 14. Dois dias antes da primeira imunização foi realizada a coleta de sangue dos animais pela veia maxilar. Após a segunda imunização, será realizada a segunda coleta de sangue. O desafio será feito via intraperitoneal com 10 vezes a DV50% da cepa L1-130 (3×10^1 leptospiras/ml). Diariamente os animais serão monitorados quanto os sinais clínicos da doença (Figura 1).

Tabela 1 – Delineamento experimental para avaliar a eficácia das vacinas a longo prazo

| Grupos vacinais | Número de animais por grupo (N) | | | | | |
|--------------------|---------------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 mês | 6 meses | 12 meses | 18 meses | 24 meses | 30 meses |
| Bactéria | 4 | 4 | 8 | 8 | 10 | 10 |
| Bactéria + LigBrep | 4 | 4 | 8 | 8 | 8 | 10 |
| LigBrep | 8 | 8 | 8 | 8 | - | - |
| PBS 1x | 8 | 8 | 8 | 8 | 10 | 10 |

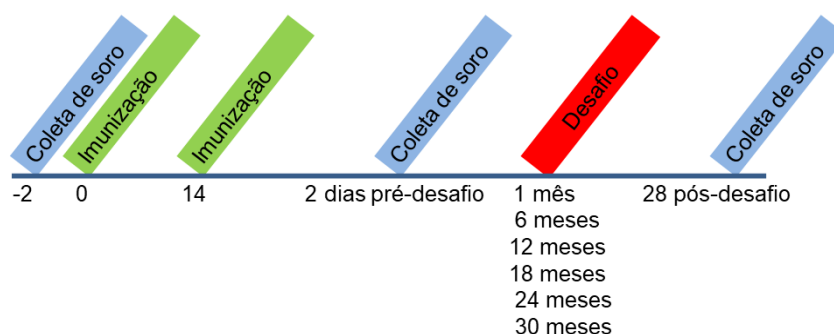


Figura 1 – Esquema das coletas de amostras de sangue e imunizações dos animais

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunização com bacterina é bem documentada e protege animais contra desafio homólogo (ADLER, 2015). Tais vacinas têm induzido proteção contra infecção com *Leptospira*, desenvolvendo uma resposta imune humoral protetora, entretanto, essa proteção é sorovar-específica.

Em estudos realizados previamente em nosso grupo, quando avaliada a resposta induzida pela bacterina, todos os animais vacinados com a bacterina sobreviveram ao desafio e não apresentaram sinais clínicos de leptospirose. Os animais dos grupos controles apresentaram perda de 8 a 22% do seu peso corporal e atingiram os pontos de desfecho para eutanásia entre os dias 9 e 17 após o desafio (dados não publicados). A respeito da proteção conferida pela bacterina, os resultados prévios obtidos por nosso grupo corroboram com estudos que demonstraram a capacidade dessa vacina proteger 100% dos animais em desafio homólogo (SILVA et al., 2007; GRASSMANN et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Recentemente, foi demonstrado por Conrad et al. (2017) que a proteína recombinante LigBrep quando administrada com o hidróxido de alumínio, confere proteção (80-100%) em desafio contra leptospirose letal. Essas informações em conjunto nos levam a crer que quando associada à proteína recombinante, a bacterina tem potencial de conferir proteção de longa duração contra leptospirose letal em modelo animal para infecção aguda. Entretanto, ainda é necessário realizarmos a segunda imunização dos animais e submetê-los ao desafio com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 para confirmar os dados obtidos por nosso grupo anteriormente e para validar a duração da proteção das vacinas com bacterina associada à proteína recombinante LigBrep.

4. CONCLUSÕES

- A bacterina foi preparada e a proteína recombinante LigBrep foi expressa com eficiência.

- Espera-se que os animais imunizados com bacterina após desafio letal apresentem proteção (sendo avaliado o tempo de proteção), que os imunizados com PBS 1x adquiram a doença e expressem os sintomas e venham a ser eutanasiados após perda de 10% do seu peso corporal, os imunizados com proteína LigBrep adquiram imunidade, e os imunizados com bacterina e proteína recombinante LigBrep apresentem proteção de longa duração.

É importante ressaltar que o experimento está em andamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. *Leptospira* and Leptospirosis. Cur Top Microbiol Immunol, Springer, v.387, 2015.

CONRAD, N. L. et al. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, p.1-20, 2016.

CAO, Y.; et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v.29, n.43, p. 7379-86. 2011.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum vaccin**, 7, 1215-24. 2011.

DENEKE, Y.; et al. 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.

FAISAL, S. M.; et al. Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine**, v.27, n.3, p. 378-87. 2009.

GRASSMANN, A. A.; et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Clin Vaccine Immunol**, v.19, n.5, p. 740-5. 2012.

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

MARTINEZ, R.; et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Rev Panam Salud Publica**, v.15, n.4, p. 249-55. 2004.

MATSUNAGA, J., et al. Pathogenic leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol microbiol**, 49, 929- 45. 2003.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p. 376-86. 2005.

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

OLIVEIRA, T. L.; et al Evaluation of the Leptospira interrogans Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. **PLoS One**, v.10, n.11, p. e0142821. 2015.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde- **Situação Epidemiológica / Dados**, Pelotas, 1 outubro 2017. Acessado em 01 out. 2017. Online. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>

SILVA, E. F.; et al The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-86. 2007.

YAN, Y.; et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J Chin Med Assoc**, v.66, n.4, p. 224-30. 2003.