

EFEITO ADJUVANTE DA BACTERINA DE *Leptospira interrogans* CO-ADMINISTRADA A UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *M. hyopneumoniae*

COLONETTI, Karina¹; FELIX, Samuel Rodrigues^{1,2}; DINIZ, Juliana Alcoforado¹; MARCHIORO, Silvana¹; da SILVA, Éverton Fagonde^{1,2}.

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – Cenbiot – UFPel

²Faculdade de Veterinária – UFPel

kcolonetti@gmail.com

DELLAGOSTIN, Odir Antonio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – Cenbiot – UFPel

1 INTRODUÇÃO

O uso de vacinas é um dos mais eficientes métodos de controle de doenças infecciosas, sendo utilizadas contra os mais diversos patógenos, como vírus, bactérias, fungos e parasitas (Guy, 2007). Entretanto, as vacinas de última geração apresentam limitações importantes quando utilizadas com os adjuvantes tradicionais (Leclerc, 2003). Por isso, o desenvolvimento de adjuvantes seguros e eficientes torna-se um desafio e uma necessidade (Guy, 2007).

A leptospirose é uma doença de distribuição mundial, causadora de prejuízos na produção animal, e na saúde humana (Adler & Moctezuma, 2010). É uma das zoonoses de maior impacto no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, situados nas regiões com clima tropical e subtropical (Ko et al., 2009). Em suínos, a leptospirose causa sérios prejuízos, principalmente reprodutivos e na produção, raramente causando doença clínica ou óbitos (Soto, 2008). Assim, a vacinação de suínos para o controle da leptospirose é comumente empregada entre os produtores, principalmente de animais destinados à reprodução (Adler & Moctezuma, 2010).

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é considerado o agente etiológico primário da pneumonia enzoótica suína (PES). Ao colonizar o epitélio respiratório, torna o animal infectado suscetível a infecções secundárias por microorganismos oportunistas (Thacker et al., 1999), ocasionando sérias perdas econômicas (Maes et al., 2008). As vacinas tradicionais, de célula inteira, contra este agente são caras devido à fastidiosidade do *Mycoplasma hyopneumoniae* no crescimento “in vivo”. Estas vacinas não previnem a colonização e não apresentam uma proteção satisfatória. Entretanto, este ainda é o método que apresenta o melhor custo-benefício no controle e prevenção da PES (Maes et al., 2008).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito adjuvante de leptospirosas inativadas por calor (bacterina), co-administrada com um antígeno recombinante de *M. hyopneumoniae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A bactéria usada nesse estudo foi a *Leptospira interrogans*, sorogrupo Canicola, cepa Kito (Silva et al., 2008). As bactérias foram cultivadas à 28 °C em estufa bacteriológica (BOD) em meio EMJH enriquecido com suplemento

comercial (Difco®). Para o preparo da bacterina, as bactérias de um cultivo de sete dias foram contadas em câmara de Petroff-Hausser e a sua concentração ajustada para 10^4 células em 200 μ L.

A proteína recombinante de *M. hyopneumoniae* usada neste estudo foi previamente descrita como imunogênica (dados não publicados) e foi obtida conforme Simionatto e colaboradores (2009), possuindo aproximadamente 42 KDa, sendo denominada de P42. Cada preparação foi composta de 50 μ g da proteína rP42 purificada, adicionado de bacterina (G3), adjuvante incompleto de Freund (G2) ou hidróxido de alumínio 15% (G1), com um volume final de 250 μ L/dose. Grupos de seis camundongos BALB/c receberam duas doses, uma no dia 0 e outra no dia 14, após o início do experimento.

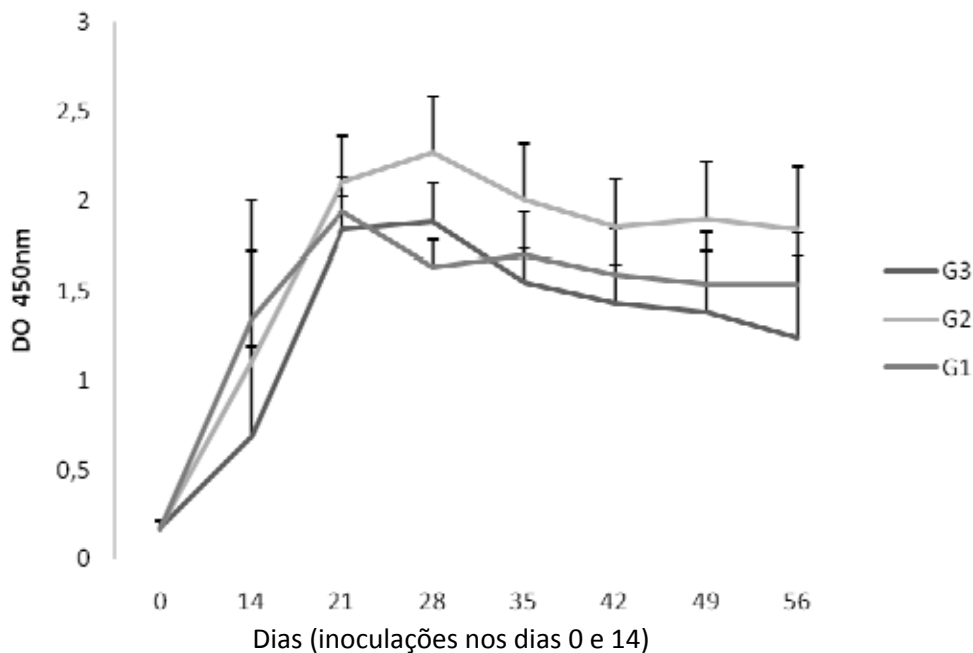
Os animais foram submetidos a coleta de sangue através da punção do plexo peri-orbital semanalmente, a partir do dia zero até o dia 56 (exceto no dia 7). As alíquotas de sangue foram armazenadas à 4 °C por uma hora e posteriormente centrifugadas por 5 minutos à 3000 rpm para separação do soro, o qual foi armazenado em microtubos à -20 °C até o uso.

Para a execução do ELISA, placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 10 ng de rP42, durante a noite à 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com solução à 1% de leite em pó desnatado e incubadas em estufa 37 °C por uma hora. A seguir 100 μ L de cada soro em uma diluição de 1:800 (previamente determinada) foram aplicados em duplicata, seguido de nova incubação. A seguir, 100 μ L de anticorpos anti-camundongo conjugados à peroxidase (Sigma®), foi usado conforme as indicações do fabricante. Após nova etapa de incubação e lavagem, adicionou-se 100 μ L de solução reveladora. As placas foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz e a leitura realizada em espectrofotômetro para microplacas Thermo Plate a 450 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados do ELISA estão expressos na Figura 1. As barras de erro representam duas vezes o desvio padrão para cada ponto, valores dentro deste intervalo foram considerados sem diferença estatística. Os valores obtidos entre os três grupos vacinais não diferiram estatisticamente. Entretanto, os valores para o grupo 2 (rP42+Freund) foram os mais elevados, quando comparados com os outros grupos.

Os estudos com novos adjuvantes e novas alternativas visando aumentar a resposta de vacinas vêm crescendo (Guy, 2007). O uso de componentes bacterianos parece ser promissor, visto que estimulam fatores da imunidade inata que modulam a imunidade adquirida (Leclerc, 2003). Dentre esses componentes, enfatiza-se o LPS, pois tem potencial para ligar-se aos receptores do tipo *toll-like* (TLR). Nesse sentido, o LPS de leptospiras parece ser particularmente promissor, visto que se liga a diferentes tipos de TLR (Nahori et al., 2005). Além disso, o LPS de leptospiras apresenta uma importante vantagem por possuir uma toxicidade até treze vezes menor que o LPS de bactérias gram-negativas (Ko et al., 2009).



* Barras de erros representam duas vezes o desvio padrão

Figura 1. Imunogenicidade com os soros dos animais vacinados com as três diferentes preparações com a proteína rP42.

Embora a bacterina de leptospiros utilizada no experimento como adjuvante tenha estimulado uma resposta humoral semelhante àquela obtida com o hidróxido de alumínio, esse estudo não avaliou a resposta celular, ensaio esse que será conduzido posteriormente; pois autores como Fischer e colaboradores (2006) tem demonstrado que o estímulo de adjuvantes não atua com a mesma intensidade nas respostas imunes celular e humoral. Além disso, combinações de componentes novos aos adjuvantes tradicionais tem tido sucesso (Fischer et al., 2007), fundamentando, assim, a combinação de bacterina com hidróxido de alumínio ou com adjuvante oleoso.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, o uso de uma bacterina de *Leptospira interrogans*, utilizada como adjuvante de uma proteína recombinante de *M. hyopneumoniae*, apresentou imunogenicidade semelhante àquela obtida com hidróxido de alumínio nos camundongos vacinados. Esta combinação de antígeno de *M. hyopneumoniae* com bacterina de *Leptospira* tem o potencial de proteger simultaneamente contra duas importantes doenças que afetam suínos, leptospirose e pneumonia micoplásmica suína.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- FAGAN, P.K., WALKER M., CHIUM J., EAMENS, G. J., DJORDJEVIC, S.P., Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* SL3261 expressing a

- recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial Pathogenesis**, Inglaterra, v.30, n. 2, p. 101–110, 2001.
- FISCHER, G., CLEFF, M. B., DUMMER L. A., PAULINO, N., PAULINO, A. S. VILELA, C. O., CAMPOS, F. S., STORCH, T., VARGAS, G. D., HÜBNER, S. O., VIDOR, T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 116, p. 79–84, 2007.
- FISCHER, G., CONCEIÇÃO, F. R., LEITE, F. P. L., DUMMER, L. A., VARGAS, G. D. HÜBNER, S. O., DELLAGOSTIN, O. A., PAULINO, N., PAULINO, A. S., VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, Guildford, v. 25, p. 1250–1256, 2007.
- GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 5, p. 505-517, 2007.
- KO, A. I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for a emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 7, p. 736-747, 2009.
- LECLERC, C. New approaches in vaccine development. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 26, p. 329-341, 2003.
- MAES, D., SEGALES, J., MEYNS, T., SIBILA, M., PIETERS, M., HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 126, p. 297-309, 2008.
- NAHORI, M. A., AMAZOUZ, E.F., GEWIRTH, N. S. Q., BALLOY, V., CHIGNARD, M., RAETZ, C. R. H., GIRONIS, I. S., WERTZ, C. Diferential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. **The Journal of Immunology**, Estados Unidos, v. 175, p. 6022-6031, 2005.
- SHIMOJI, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., NOSAKA, H., MORI, Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**, Guildford, v. 21, p. 532-537, 2003.
- SILVA, É.F., SANTOS, C.S., ATHANAZIO, D.A., SEYFFERT, N., SEIXAS, F.K., CERQUEIRA, G.M., FAGUNDES, M.Q., BROD, C.S., REIS, M.G., DELLAGOSTIN, O.A., KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, Guildford, v. 26, n. 31, p. 3892-3896, 2008.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S. B., GALLI, V., LUERCE, T. D., HARTWIG, D. D., MOREIRA, A. N., DELLAGOSTIN, O. A. Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 101-105, 2009.
- SOTO, F. R. M., PINHEIRO, S. R., ITO, F. H., MORAES, Z. M.; GONÇALES, A. P., AZEVEDO, S. S., BERNARDI, F., CAMARGO, S. R., VASCONCELLOS, S. R. Evaluation of colostral immunity in swine with commercial anti-leptospira polyvalent whole-bacteria vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 327-335, 2008.
- THACKER, E. L., HALBUR, P. G., ROSS, R. F., THANAWONGNUWECH, R., THACKER, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n. 3, p.620–627, 1999.