



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**O IMPRINT COMO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE**  
***Leptospira* SSP.**

**ADENIZAR DELGADO DAS CHAGAS JÚNIOR**

**Salvador - Bahia – Brasil**

**2009**



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**O IMPRINT COMO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE  
*Leptospira* SSP.**

**ADENIZAR DELGADO DAS CHAGAS JÚNIOR**

**Orientador:** ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE

**Co-orientação:** FLÁVIA WEYKAMP DA CRUZ MCBRIDE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz com objetivo de obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**Salvador - Bahia – Brasil**

**2009**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Chagas-Júnior, Adenizar Delgado das

C433i O *imprint* como método para detecção de *Leptospira* SSP. [manuscrito] /  
Adenizar Delgado das Chagas Júnior. - 2009.

30 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Mestrado (dissertação) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo  
Moniz, 2009.**

Orientador: Prof. Dr. Alan John Alexander McBride, Laboratório de Patologia e  
Biologia Molecular.

1. *Leptospira*.. 2. Leptospirose. 3. Esterilização. 4. Vacina. 5. Hamsters. I.Título.

CDU 616.986.7

*Dedico esta conquista ao meu pai  
Adenizar Delgado das Chagas*

## **AGRADECIMENTOS**

### **A Deus**

Por tudo

### **Ao meu pai Adenizar Chagas**

Você sempre será lembrado em todas as minhas conquistas, pois diretamente ou indiretamente o senhor é o responsável por mais este passo em minha vida. Sua presença mesmo que não seja mais fisicamente, continua me guiando nesta jornada, que agora está mais difícil sem o senhor ao meu lado. Muito obrigado por tudo e fica com Deus.

### **À minha mãe Marineide Chagas**

Por todo incentivo, esforço e amor para que eu estivesse conquistando mais um importante passo em minha vida. Muito obrigado!

### **Aos meus irmãos Catarina, Adriano e Aline**

Vocês fazem parte desta trajetória. Só posso agradecer a Deus pelo companheirismo, carinho, alegrias e vitórias que conquistamos juntos.

### **À Rafaela Martins**

Pelo companheirismo em todos estes anos, compreensão, incentivo, atenção e ao amor por mim.

### **Dr. Alan McBride**

Pela orientação, dedicação, paciência, amizade e principalmente por acreditar e apoiar minhas idéias e sugestões, contribuindo de forma significativa na minha formação profissional. Sinto-me lisonjeado em ser seu aluno e receber sua constante atenção.

### **Dra. Flávia McBride**

Pela co-orientação, oportunidade, confiança, coerência, capacidade e orientações sugeridas para realização deste trabalho.

### **Dr. Mitermayer Reis, Dr. Daniel Athanazio, Dr. Marco Medeiros Dr. Albert Ko e Cláudio Figueira**

Pela contribuição no desenvolvimento deste projeto.

### **Dra. Eliana Reis e Dra. Leila Campos**

Pelo auxílio prestado durante o desenvolvimento deste projeto.

### **Aos colegas da Pós-graduação**

Por nossa convivência, amizade e alguns passeios divertidos.

### **Meus amigos do LPBM**

Lúcio, Wendell, Bruno, Jailton, Hermes, Gisele, Theomira, Júlio, Marcelo, Cleiton, Milena, Paulinha, Paulo e todos os outros pela infinita ajuda, convívio, palavras de conforto e incentivo.

### **Aos colegas do “baba” do CPqGM**

Pelos momentos alegres e descontraídos.

### **Aos alunos de iniciação científica Júlio Macedo e Marcelo Medeiros**

Pelo auxílio durante a realização dos experimentos, respeito e esforço na busca de conhecimentos.

### **Ao pessoal da secretaria do LPBM Hilda Carvalho e Cleiton Carneiro**

Pelo suporte administrativo.

### **Aos professores do curso de Biotecnologia CPqGM-FIOCRUZ/BA**

Que ministraram as disciplinas e contribuíram para o acréscimo de novos conhecimentos.

### **Aos professores da banca**

Que gentilmente aceitaram compor a banca de avaliação deste trabalho.

### **CPqGM-FIOCRUZ/BA**

Pela estrutura e recursos prestados que possibilitaram a realização deste trabalho.

### **BIOTÉRIO do CPqGM – FIOCRUZ/BA**

Pelo suporte na realização dos experimentos.

### **BIBLIOTECA CPqGM – FIOCRUZ/BA**

Pelo suporte na confecção deste trabalho.

## RESUMO

Na determinação da eficácia de novas candidatas à vacina para leptospirose, o marcador primário considerado é a mortalidade, e um marcador secundário importante é a indução de uma imunidade estéril. Entretanto, a avaliação da imunidade estéril é dificultada pelo tempo demandado e pela complexidade de métodos como o isolamento pela cultura. Neste estudo, foi avaliado o uso do método do *imprint* (ou touch preparation) na detecção da presença de leptospiros em tecidos de hamsters infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Comparado com a cultura, o *imprint* demonstrou igual ou melhor detecção de leptospiros em amostras de rim, fígado, pulmão e sangue coletadas após a infecção obtendo uma concordância geral boa ( $\kappa = 0.61$ ). Além disso, na avaliação de hamsters imunizados com uma proteína recombinante de *Leptospira* candidata à vacina e subsequente desafio com leptospiros patogênicas, a concordância entre a cultura e o *imprint* foi alta ( $\kappa = 0.84$ ). Estes achados indicam que o *imprint* é um método rápido para a observação direta de *Leptospira* spp. e que pode ser facilmente aplicado na avaliação de animais infectados experimentalmente com leptospiros e na determinação de imunidade esterilizante durante avaliações de potenciais candidatas à vacina.

## ABSTRACT

In determining the efficacy of new vaccine candidates for leptospirosis the primary endpoint is death and an important secondary endpoint is sterilizing immunity. However, evaluation of this endpoint is often hampered by the time consuming demands and complexity of methods such as culture isolation (CI). In this study, we evaluated the use of an *imprint* (or touch preparation) method (IM) in detecting the presence of leptospires in tissues of hamsters infected with *L. interrogans* serovar Copenhageni. Compared to CI, the IM exhibited equal or improved detection of leptospires in kidney, liver, lung and blood samples collected post-infection and the overall concordance was good ( $\kappa = 0.61$ ). Furthermore, in an evaluation of hamsters immunized with a recombinant *Leptospira* protein-based vaccine candidate and subsequently challenged with leptospires, the agreement between the CI and IM was very good ( $\kappa = 0.84$ ). These findings indicate that the IM is a rapid method for the direct observation of *Leptospira* spp. that can be readily applied to evaluating *Leptospira* infection in experimental animals and determining sterilizing immunity when screening potential vaccine candidates.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>CI</b>	<i>Culture isolation</i>
<b>DAPI</b>	<i>4'-6-diamidine-2-phenylindole</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>FAPESB</b>	<i>Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium</i>
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína / <i>fluorescein isothiocyanate</i>
<b>IF</b>	Imunofluorescência
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gamma</i>
<b>IgG</b>	Imunoglobulina tipo G / <i>Immunoglobulin type G</i>
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i>
<b>IM</b>	<i>Imprint method</i>
<b>L1-130</b>	Cepa de <i>Leptospira</i>
<b>LD<sub>50</sub></b>	<i>Lethal Dose 50%</i>
<b>Lig</b>	<i>Leptospiral immunoglobulin-like</i>
<b>LipL</b>	Lipoproteína de <i>Leptospira</i> / <i>Leptospira lipoprotein</i>
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo / <i>lipopolysaccharide</i>
<b>ND</b>	<i>Not determined</i>
<b>NA</b>	<i>Not applicable</i>
<b>NRS</b>	<i>Normal rabbit antisera (control)</i>
<b>OmpL</b>	Proteína da membrana externa de <i>Leptospira</i> / <i>leptospiral outer membrane protein</i>

<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino / <i>Phosphate buffered saline</i>
<b>pi</b>	<i>Post-infection</i>
<b>RGA</b>	Cepa de <i>Leptospira</i>
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>Th1</b>	<i>Helper T cells type 1</i>
<b>Th2</b>	<i>Helper T cells type 2</i>
<b>TVT</b>	Tumor venéreo transmissível
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>κ</b>	Kappa

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
4. MANUSCRITO	19
<i>An imprint</i> method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis	
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÕES	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
8. ANEXO	29
9. APÊNDICE	30

## 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose foi primeiramente descrita pelo médico alemão Adolf Weil, em 1886, sendo a forma grave da doença em humanos denominada Doença de Weil (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). As espiroquetas isoladas apresentavam forma em ponto de interrogação, sendo por isso denominadas *Spirochaeta interrogans* (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). O primeiro isolado de *Leptospira* patogênica foi feito por Inada e colaboradores (1916) no Japão, onde os pesquisadores realizaram estudos clássicos de infecção experimental, inoculando em cobaia o sangue de um paciente com doença icterica febril. Analisando o tecido hepático dos animais, evidenciaram a presença de um espiroquetídeo, denominando-o *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (INADA, 1916). Noguchi e colaboradores (1918) conseguiram classificar o agente em um novo gênero, *Leptospira* (do grego *leptos*, fino, pequeno delicado e *speira*, espira, novelo) denominando a espécie patogênica de *Leptospira icterohaemorrhagiae* e incluindo também neste gênero, devido a similaridades morfológicas, a *Spirochaeta biflexa* (NOGUCHI, 1918). As leptospirosas foram classificadas previamente em duas espécies, *L. interrogans sensu lato* (com mais de 228 sorovares patogênicos) e *L. biflexa sensu lato* (que contém mais de 60 sorovares saprófitas). Dados de hibridização DNA-DNA sugerem que o gênero *Leptospira* pode ser classificado atualmente em 20 espécies (LEVETT *et al.*, 2001, 2006; MATTHIAS *et al.*, 2008; CERQUEIRA e PICARDEAU *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2009).

Mundialmente a leptospirose tem sido considerada como uma doença emergente e um grande problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais onde a sua distribuição é mais comum devido às condições mais favoráveis para transmissão da doença (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003; BROWN, R. A. *et al.*, 2003). A fonte de infecção em humanos é usualmente através do contato direto ou indireto com a urina de um animal infectado. A infecção ocorre usualmente através da pele que apresenta algum tipo de comprometimento como abrasões ou cortes, pela conjuntiva e até mesmo através da pele intacta após prolongado período imersa na água (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003). Os pequenos mamíferos são os principais hospedeiros e podem transmitir a infecção para animais domésticos e também para os humanos. Diferentes espécies de roedores podem ser reservatórios

dos mais distintos sorovares, sendo o rato geralmente colonizado por sorovares dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). A incidência é significativamente alta em países de clima quente quando comparado com os países de clima temperado, devido principalmente ao longo período de sobrevivência das leptospiros em condições ambientais quentes e úmidas. A doença é sazonal, com picos de incidência ocorrendo no verão ou no outono nos climas temperados, onde a temperatura é um fator limitante na sobrevivência das leptospiros, e durante o período chuvoso nas regiões de clima quente, onde o período seco pode dificultar a sobrevivência das mesmas (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003).

A leptospirose no homem foi historicamente considerada uma doença essencialmente rural e ocupacional (FAINE, 1999). Atualmente a leptospirose emerge como uma doença urbana que acomete os moradores pobres de comunidades carentes (favelas) de países em desenvolvimento (KO *et al.*, 1999; MCBRIDE *et al.*, 2005). Um bilhão de pessoas no mundo residem em favelas, onde a falta de saneamento básico gera condições ecológicas para a proliferação de roedores e possíveis transmissões para humanos (UNITED NATIONS 2003; MCBRIDE *et al.*, 2005). Apenas no Brasil, 10.000 casos de leptospirose grave são notificados anualmente durante epidemias que ocorrem em comunidades carentes em todas as principais cidades do país, sendo a mortalidade entre os casos em torno de 10-15% (KO *et al.*, 1999; MCBRIDE *et al.*, 2005). Na cidade de Salvador, a leptospirose é uma doença endêmica que acomete inúmeras pessoas principalmente no período chuvoso. No surto epidêmico registrado de março a novembro de 1996 foi registrada uma incidência de 12.5 casos para cada 100 000 habitantes (KO *et al.*, 1999). No estudo mais recente em uma favela localizada na cidade de Salvador, 15% dos residentes apresentavam evidências sorológicas de uma infecção prévia por *Leptospira* (REIS *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos 50 anos, um grande número de vacinas contra leptospirose vem sendo desenvolvidas e avaliadas em animais tais como bovinos, suínos, cães, ovinos e equinos (SRIVASTAVA *et al.*, 2006), sendo as vacinas formuladas a partir de bacterina as mais testadas (KOIZUMI e WATANABE, 2005).

Estas vacinas também estão sendo administradas nas populações humanas de alguns países como Cuba (MARTINEZ *et al.*, 2004), Rússia (IKOEV *et al.*, 1999) e China (YAN *et al.*, 2003). Mesmo ocorrendo resposta imune cruzada entre alguns sorovares como Copenhageni e Icterohaemorrhagiae no teste de microaglutinação (FAINE, 1999), já foi demonstrado que a resposta imune protetora na leptospirose é sorovar específica (BRUNNER e MEYER, 1949). Sendo assim, vacinas de bacterina não conferem resposta imune cruzada contra outros sorovares que não estejam presentes na vacina. Um programa de vacinação para ter sucesso requer estudos de vigilância para identificar a incidência de novos sorovares na população (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). Geralmente estas vacinas, tanto de uso humano quanto veterinário, contêm dois ou mais sorovares prevalentes para determinada região e, em todos os casos, revacinações anuais são recomendadas para manter a imunidade, pois a resposta imune é de curta duração (KOIZUMI e WATANABE, 2005; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). Outro fator importante que pode ocorrer com o uso de vacinas de bacterina na veterinária é o surgimento de doenças auto-imunes como uveítes. Com isso, sérios problemas confrontam com o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose em humanos (BHARTI *et al.*, 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2005).

Desta forma, grande esforço tem sido feito para identificar componentes imunogênicos com potencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. O primeiro artigo publicado sobre proteção imune foi a partir de uma combinação de proteínas da membrana externa, OmpL1, e a lipoproteína, LipL41, de *L. interrogans* que demonstrou proteção contra infecção letal em hamsters (HAAKE *et al.*, 1999). Outras proteínas da membrana externa de leptospirosas foram avaliadas com variados graus de sucesso. Por exemplo, a imunização de gerbils com adenovírus recombinante expressando LipL32 demonstrou proteção estatisticamente significativa contra a infecção com leptospirosas do sorovar Autumnalis (BRANGER *et al.*, 2001). Entretanto, a significância biológica destes resultados deve ser ponderada, pois 50% dos animais do grupo controle sobreviveram. As proteínas *Leptospiral immunoglobulin-like (lig)* são altamente conservadas (MCBRIDE *et al.*, 2009) e somente presentes (CERQUEIRA *et al.*, 2009) e expressas na superfície de leptospirosas patogênicas (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2004). Sendo assim, as proteínas *lig* são importantes

candidatas à vacina contra leptospirose, devido a possibilidade de conferirem uma resposta imune cruzada contra diversos sorovares de leptospiras patogênicas (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2005; FAISAL *et al.*, 2008). Koizumi e colaboradores (2004) encontraram proteção em 100% dos camundongos (C3H/HeJ) imunizados com as *lig*, mas sem esterilidade (KOIZUMI e WATANABE, 2004). Um estudo com a vacina de *ligA* em hamsters demonstrou ser eficiente, mas 70% dos animais controles sobreviveram (PALANIAPPAN *et al.*, 2006). Hamsters imunizados com o fragmento C-terminal de LigA com o adjuvante de *Freund's* foi significativamente protetor (67-100%), mas todos os animais sobreviventes apresentaram colonização renal (SILVA *et al.*, 2007).

Já foi demonstrado que a resposta imune predominante contra a leptospirose em humanos e em outras espécies como cães, suínos, porcos da Índia e hamsters é humoral. Estas evidências surgiram de alguns estudos que demonstraram que a imunidade pode ser passivamente transferida por soros convalescentes, anti-soros produzidos experimentalmente, ou por anticorpos monoclonais, tais como os produzidos diretamente contra o lipopolissacarídeo (LPS) de leptospiras (JOST *et al.*, 1986; FAINE, 1999; LEVETT, 2001; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). Porém, os mecanismos da imunidade em bovinos são diferentes. Altos níveis de anticorpos anti-*Leptospira* não protegem animais contra a infecção e a imunidade está correlacionada com a resposta imune do tipo Th1 mediada pela produção de IFN- $\gamma$  (NAIMAN *et al.*, 2001; BROWN, R. A. *et al.*, 2003). Intrigantemente, os anticorpos destes bovinos susceptíveis podem transferir passivamente imunidade para hamsters, evidenciando as divergências de mecanismos de imunidade nas diferentes espécies (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). Outro trabalho demonstra que a proteção contra a leptospirose está associada à combinação da resposta imune celular com a humoral (WERTS *et al.*, 2001). Sendo assim, Faisal e colaboradores (2008) avaliaram uma vacina de DNA (*ligA*) que é capaz de conferir resposta imune Th1 e Th2. Esta vacina foi capaz de conferir 100% de proteção aos hamsters imunizados, porém mais de 50% dos animais do grupo controle também sobreviveram à infecção com a cepa *L. interrogans* sorovar Pomona. A baixa taxa de letalidade do grupo controle pode ser explicada devido à baixa virulência da cepa utilizada neste estudo (FAISAL *et al.*, 2008).

Na leptospirose, o modelo animal mais usado é o hamster (*Mesocricetus auratus*) (ADLER *et al.*, 1982), o qual desenvolve os sinais clínicos e histopatológicos característicos da leptospirose humana como hemorragia pulmonar, icterícia, nefrites intersticiais e alterações hepáticas. Diante do exposto, o hamster é considerado o melhor modelo na avaliação da resposta imune de antígenos candidatos à vacina (FREUDENSTEIN e HEIN, 1991). Neste modelo, a detecção de leptospirosas é feita através da cultura dos órgãos (padrão-ouro) ou pela imunomarcagem de tecidos (SKILBECK e CHAPPEL, 1987; FAINE, 1999; LEVETT, 2001; BROWN, P. D. *et al.*, 2003; ATHANAZIO *et al.*, 2008). A detecção de leptospirosas pela cultura se caracteriza como o diagnóstico definitivo (FAINE, 1999). Entretanto, uma série de fatores pode prejudicar a eficácia e viabilidade da detecção de leptospirosas na cultura, como a baixa taxa de crescimento de algumas cepas, a necessidade de amostras de tecidos frescos, de meios de cultura apropriados, além de possíveis problemas com contaminações e um longo período de incubação que pode variar de oito a 13 semanas a 29 ou 30°C necessitando de avaliações semanais no microscópio de campo escuro até que as culturas possam ser descartadas como negativas (FAINE, 1999; LEVETT, 2001; PALANIAPPAN *et al.*, 2005; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). Outros fatores como vidraria suja, contaminações e variações na temperatura de incubação também devem ser considerados. Por esta razão, a cultura apesar de ser o padrão ouro não é considerada como um teste de rotina para a detecção de leptospirosas (ADLER *et al.*, 1982; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009).

Métodos de marcação vêm sendo aplicados para aumentar a sensibilidade de detecção direta de *Leptospira* spp., dentre estes, a imunofluorescência, imunoperoxidase e *Warthin-Starry* são os mais utilizados na detecção de leptospirosas em tecidos (SKILBECK e CHAPPEL, 1987; LEVETT, 2001; ATHANAZIO *et al.*, 2008). Entretanto, estas técnicas são muito laboriosas com um longo período de processamento das amostras que serão utilizadas nos cortes histológicos e necessitam de diversos equipamentos específicos (BROWN, R. A. *et al.*, 2003).

A detecção qualitativa (MERIEN *et al.*, 1995) e quantitativa de DNA de leptospirosas em ensaios de PCR convencional (PALANIAPPAN *et al.*, 2005) e em tempo-real (LOURDAULT *et al.*, 2009) também vêm sendo utilizadas. A amplificação

de DNA é uma ferramenta potencial para a detecção direta de leptospiras, mas a interpretação dos resultados pode ser dificultada como em alguns estudos em humanos que detectaram DNA de leptospiras após 56 dias do início dos sintomas em amostras de sangue e após um ano na urina (BAL *et al.*, 1994; MERIEN *et al.*, 1995) Como a detecção de DNA não é capaz de distinguir leptospiras viáveis de não-viáveis, isto pode ser uma limitação nas avaliações de imunidade estéril induzida por vacinas.

Alternativamente, a técnica de *imprint* vem sendo usada em diversos estudos como uma forma rápida e segura para estudar alterações histológicas em diversos tecidos e também na detecção de microorganismos. Esta técnica é bem difundida nas avaliações de células cancerígenas em *imprints* de biópsias tumorais de humanos (TRIBE, 1973; VEGA-MEMIJE *et al.*, 2000; FOTOU *et al.*, 2007; LONCAR *et al.*, 2007). Na Medicina Veterinária, a técnica de *imprint* é usada nas avaliações de células do tumor venéreo transmissível (TVT) de cães e tem se mostrado prática, rápida, eficaz e barata (SILVA *et al.*, 2007). A técnica de *imprint* também já vem sendo usada como método para detectar formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras de baço e fígado (DE ANDRADE *et al.*, 2006; COUTINHO e LINARDI, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2007) e também na detecção e quantificação de *Candida albicans* em *imprints* da cavidade oral de crianças (TAPPER-JONES, 1980). Neste estudo, adaptamos e utilizamos a técnica de *imprint* como ferramenta para avaliar a esterilidade imune em amostras de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Diferentes experimentos foram realizados em hamsters vacinados e não vacinados com o objetivo de determinar o desempenho do *imprint* comparando seus resultados com o isolamento pela cultura e com a imunohistoquímica em amostras de tecidos.

## 2. JUSTIFICATIVA

A leptospirose tem sido considerada como uma doença emergente e um grande problema de saúde pública a nível mundial, principalmente nos países tropicais onde a sua distribuição é mais comum devido às condições mais favoráveis para transmissão da doença. Desta forma, grande esforço tem sido feito para identificar componentes imunogênicos com potencial para o desenvolvimento de vacinas. Na leptospirose, o modelo animal mais usado é o hamster (*Mesocricetus auratus*), o qual desenvolve os sinais clínicos e histopatológicos característicos da leptospirose humana como hemorragia pulmonar, icterícia, nefrites intersticiais e alterações hepáticas. Diante do exposto, o hamster é considerado o modelo ideal na avaliação da resposta imune de antígenos vacinais.

Neste modelo, a detecção de leptospiras é feita através da cultura dos órgãos (padrão-ouro) ou pela imunomarcação de tecidos. Entretanto, uma série de fatores pode prejudicar a eficácia e viabilidade da detecção de leptospiras na cultura. Por esta razão, a cultura não é considerada como um teste de rotina para a detecção de leptospiras. Métodos de marcação vêm sendo aplicados para aumentar a sensibilidade de detecção direta de *Leptospira* spp. Dentre estes, a imunofluorescência, imunoperoxidase e Warthin-Starry são os mais utilizados na detecção de leptospiras em tecidos. Entretanto, estas técnicas são muito laboriosas demandando de muito tempo para fazer o processamento das amostras que serão utilizadas nos cortes histológicos e também de diversos equipamentos que são necessários neste processo.

A técnica de *imprint* vem sendo usada em diversos estudos como uma forma rápida e segura para estudar alterações histológicas em diversos tecidos, e também na detecção de microorganismos. Sendo assim, objetivamos adaptar e avaliar a técnica de *imprint* para observação direta de leptospiras em amostras de hamsters experimentalmente infectados, comparando seu desempenho com o isolamento pela cultura e com a imunohistoquímica em amostras de tecidos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

Adaptar e avaliar a técnica de *imprint* para observação direta de leptospiras em amostras de hamsters experimentalmente infectados, comparando seu desempenho com o isolamento pela cultura e com a imunohistoquímica em amostras de tecidos.

#### **Específicos**

- 3.1 Avaliação da concordância e desempenho do *imprint* com a técnica padrão-ouro (cultura) e com a técnica de imunohistoquímica nos tecidos;
- 3.2 Aplicação da técnica de *imprint* nas avaliações de imunidade estéril induzida por candidatas à vacina para leptospirose.

4. MANUSCRITO *in press*

<b>JMM</b> <i>A journal of the Society for General Microbiology</i>	<b>Journal of Medical Microbiology</b>	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>	<b>QUICK SEARCH:</b> <a href="#">[advanced]</a> Author: <input type="text"/> Keyword(s): <input type="text"/> Go <input type="button" value="Go"/> Year: <input type="text"/> Vol: <input type="text"/> Page: <input type="text"/>
	<a href="#">HOME</a> <a href="#">HELP</a> <a href="#">FEEDBACK</a> <a href="#">SUBSCRIPTIONS</a> <a href="#">ARCHIVE</a> <a href="#">SEARCH</a>	Institution: Fundação Oswaldo Cruz	
Published online ahead of print on 13 August 2009 as doi:10.1099/jmm.0.014050-0 J Med Microbiol (2009), DOI: 10.1099/jmm.0.014050-0 © 2009 Society for General Microbiology			
<h2>An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis</h2>			
Adenizar D Chagas-Junior <sup>1</sup> , Alan J A McBride <sup>1</sup> , Daniel A Atkanazio <sup>2</sup> , Claudio P Figueira <sup>1</sup> , Marco A Medeiros <sup>3</sup> , Mitomayer G Reis <sup>1</sup> , Albert I Ko <sup>1</sup> and Flavia C McBride <sup>2,4</sup>			
<sup>1</sup> Fiocruz;			
<sup>2</sup> Federal University of Bahia; Fiocruz;			
<sup>3</sup> Bio-Manguinhos;			
<sup>4</sup> E-mail: <a href="mailto:fmcbride@bahia.fiocruz.br">fmcbride@bahia.fiocruz.br</a>			
Received July 1, 2009 Accepted August 10, 2009			

## 5. DISCUSSÃO

A imunidade estéril é um marcador secundário muito importante em avaliações de candidatas à vacina, sobretudo porque as vacinas comerciais usadas em animais não previnem a leptospiúria (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). O isolamento através da cultura é considerado o padrão-ouro na detecção direta de leptospiras em amostras biológicas (WHO e ILS, 2003). Entretanto, uma série de fatores pode prejudicar a eficácia e viabilidade da detecção de leptospiras na cultura (FAINE, 1999; LEVETT, 2001; PALANIAPPAN *et al.*, 2005; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). O principal objetivo deste estudo foi avaliar e adaptar o método do *imprint* para a detecção direta de leptospiras em amostras biológicas. Após a infecção de hamsters com *L. interrogans*, a presença de leptospiras em diferentes amostras de tecidos foi avaliada. No experimento realizado para avaliar a eficiência de detecção de leptospiras em diferentes amostras biológicas foi possível observar que o *imprint* foi eficiente na detecção de leptospiras no rim, fígado, pulmão e sangue (Figura 1A). Quando são feitas marcações com DAPI, Azul de Evans e FITC foi possível observar claramente a distribuição das leptospiras próximas às células (Figura 1B). Reconhecemos que este é o primeiro relato da aplicação desta técnica no campo da leptospirose.

A técnica de *imprint* apresenta uma limitação importante, pois identifica leptospiras intactas e não é capaz de discriminar leptospiras viáveis de leptospiras não viáveis. Entretanto, o *imprint* só apresentou aumento significativo na detecção de leptospiras, quando foi comparado com a cultura, no estudo de disseminação. Como 100% dos animais foram a óbito podemos pressupor que todas as amostras avaliadas continham leptospiras. Em termos de detecção de leptospiras nas amostras de sangue o *imprint* apresentou-se igual à cultura. Já é conhecido que as leptospiras são eliminadas do sangue nas duas primeiras semanas após a infecção (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). Portanto, se o *imprint* estivesse detectando leptospiras não viáveis ele deveria ter detectado mais amostras positivas no dia nove pós-infecção e isto não aconteceu (Tabela 1). É possível que alvos antigênicos determinantes no *imprint* não sejam facilmente detectados em leptospiras não viáveis, possivelmente devido à perda da membrana externa ou mudanças na conformação ou degradação de antígenos.

O uso das proteínas recombinantes *lig* nas formulações de vacinas já foi bem relatado por nós e por outros grupos (KOIZUMI e WATANABE, 2004; PALANIAPPAN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007). Hamsters imunizados com o fragmento C-terminal de *ligA* com o adjuvante de *Freund's* foram significativamente protegidos (67-100%), mas todos os animais sobreviventes apresentaram colonização renal (SILVA *et al.*, 2007). Adicionalmente, formulações de vacinas com *ligA* já foram capazes de conferir 75-100% de proteção com esterilidade imune variando de 25-90% (PALANIAPPAN *et al.*, 2006; FAISAL *et al.*, 2008; FAISAL *et al.*, 2009). Uma vacina preparada com *ligB* e hidróxido de alumínio induziu proteção significativa em hamster (54-83%), mas não confere imunidade estéril, ou seja, após as avaliações foram encontradas leptospiros nos órgãos (YAN *et al.*, 2009). Camundongos C3H/HeJ imunizados com as proteínas *lig* demonstraram uma proteção significava (100%), mas sem imunidade estéril (KOIZUMI e WATANABE, 2004). Haake e colaboradores demonstraram proteção significativa (71-100%) em hamsters com a combinação das proteínas recombinantes (OmpL1 e LipL41) com imunidade estéril de 100% (HAAKE *et al.*, 1999). Tal variabilidade pode estar associada com a virulência da cepa utilizada no desafio, pois cepas mais virulentas utilizadas em outros desafios foram associadas com colonização renal (SILVA *et al.*, 2007; FAISAL *et al.*, 2008; FAISAL *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2009), porém, nem sempre isso aconteceu (HAAKE *et al.*, 1999). Contudo, outro fator pode estar prejudicando a reprodutibilidade da cultura, destacando a urgente necessidade por um teste mais bem padronizado.

A técnica de *imprint* provou ser um método sensível e robusto para a observação direta de leptospiros intactas no sangue e em amostras de tecidos. Isto é possível porque a técnica de imunofluorescência (IF) é realizada com anticorpos específicos (globulinas anti-*Leptospira* spp.) e permite identificação fácil e específica de leptospiros (FAINE, 1999). A IF em cortes de tecidos, por outro lado, demanda muito tempo e uma série de equipamentos que são necessários para fazer o processamento do material como congelamento, emblocagem em parafina e cortes histológicos para serem utilizados nesta técnica. Apesar da técnica de *imprint* ter sido igual à imunohistoquímica em termos de detecção, o *imprint* apresenta vantagens porque é relativamente simples e apresenta resultados em menor tempo. O *imprint* possibilita resultados em no máximo seis horas, e a partir de uma amostra

(tecido) podem ser feitos vários *imprints* e preparar diversas lâminas que poderão ser guardadas a temperatura ambiente para futuras avaliações. Já a técnica de IF em tecidos leva bem mais tempo, pois as amostras precisam ser congeladas e posteriormente cortadas no criostato para serem utilizadas no procedimento de imunofluorescência. A técnica de *imprint* também pode ser aplicada no exame direto de urina, uma vez que este é tradicionalmente avaliado pela microscopia de campo escuro cujos resultados não são confiáveis (WHO e ILS, 2003). O *imprint* também poderia ser utilizado para a detecção de leptospiros nos reservatórios naturais. O *imprint* mostrou-se eficiente na detecção de leptospiros em alguns experimentos onde avaliamos a colonização renal de ratos *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar* 30 dias após a infecção com  $10^8$  leptospiros via intraperitoneal (dados não apresentados).

## 6. CONCLUSÕES

Descrevemos o sucesso da aplicação da técnica de *imprint* nas avaliações de detecção direta de leptospiros patogênicas no sangue e em amostras de tecidos coletados de animais experimentalmente infectados. Além disso, a técnica foi prontamente utilizada nas avaliações de esterilidade imune em estudos de reposta imune mediados por vacina. Apresentou concordância variando de boa a excelente com a cultura (padrão-ouro). Apesar da técnica de *imprint* ter sido igual à imunohistoquímica em termos de detecção, o *imprint* apresenta vantagens porque é relativamente simples e apresenta resultados em menor tempo. A partir de uma amostra (tecido) podem ser feitos vários *imprints* e preparar diversas lâminas que poderão ser guardadas à temperatura ambiente para futuras avaliações. A técnica de *imprint* pode ser considerada como um método complementar para a detecção de leptospiros no modelo animal de leptospirose. O *imprint* também poderia ser utilizado para a detecção de leptospiros nos reservatórios naturais. Por isso, propomos que a técnica de *imprint* pode ser considerada como um método complementar para a detecção de leptospiros no modelo animal de leptospirose.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B., CHAPPEL, R. J. *et al.* The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]**, v.252, n.3, Jul, p.405-13. 1982.
- ADLER, B. E DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, Mar 13. 2009.
- ATHANAZIO, D. A., SILVA, E. F. *et al.* Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. **Acta Trop**, v.105, n.2, Feb, p.176-80. 2008.
- BAL, A. E., GRAVEKAMP, C. *et al.* (1994). "Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis." **J Clin Microbiol** 32(8): 1894-8.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.12, Dec, p.757-71. 2003.
- BRANGER, C., SONRIER, C. *et al.* Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of Leptospira interrogans by adenovirus-mediated vaccination. **Infect Immun**, v.69, n.11, Nov, p.6831-8. 2001.
- BRENNER, D. J., KAUFMANN, A. F. *et al.* Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. **Int J Syst Bacteriol**, v.49 Pt 2, Apr, p.839-58. 1999.
- BROWN, P. D., CARRINGTON, D. G. *et al.* Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. **Res Microbiol**, v.154, n.8, Oct, p.581-6. 2003.
- BROWN, R. A., BLUMERMAN, S. *et al.* Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo. **Vaccine**, v.21, n.27-30, Oct 1, p.4448-58. 2003.
- BRUNNER, K. T. MEYER, E K. F. Streptomycin in the treatment of Leptospira carriers; experiments with hamsters and dogs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.70, n.3, Mar, p.450-2. 1949.
- CERQUEIRA, G. M., MCBRIDE, A. J. *et al.* Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic Leptospira species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **J Med Microbiol**, v.58, n.Pt 9, Sep, p.1173-81. 2009.
- COUTINHO, M. T. LINARDI , E P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet Parasitol**, v.147, n.3-4, Jul 20, p.320-5. 2007.

DE ANDRADE, H. M., REIS, A. B. *et al.* Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol**, v.140, n.3-4, Sep 10, p.231-8. 2006.

FAINE, S. *Leptospira* and Leptospirosis. v.Second Edition. 1999.

FAISAL, S. M., YAN, W. *et al.* Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v.26, n.2, Jan 10, p.277-87. 2008.

FAISAL, S. M., YAN, W. *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, Jan 14, p.378-87. 2009.

FOTOU, M., OIKONOMOU, V. *et al.* Imprint cytology on microcalcifications excised by Vacuum-Assisted Breast Biopsy: A rapid preliminary diagnosis. **World J Surg Oncol**, v.5, p.40. 2007.

FREUDENSTEIN, H. E HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.14, n.3, p.229-34. 1991.

HAAKE, D. A., MAZEL, M. K. *et al.* Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun**, v.67, n.12, Dec, p.6572-82. 1999.

IKOEV, V. N., GORBUNOV, M. A. *et al.* The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, n.4, Jul-Aug, p.39-43. 1999.

INADA, R. Y. I., HOKI, R.; KANEKO, R.; e ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease. (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **Journal of Experimental Medicine**., v.23, p.377-402. 1916.

JOST, B. H., ADLER, B.*et al.* A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J Med Microbiol**, v.22, n.3, Nov, p.269-75. 1986.

KO, A. I., GALVAO REIS, M. *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v.354, n.9181, Sep 4, p.820-5. 1999.

KOIZUMI, N. e WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v.22, n.11-12, Mar 29, p.1545-52. 2004.

KOIZUMI, N. e WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J Postgrad Med**, v.51, n.3, Jul-Sep, p.210-4. 2005.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, Apr, p.296-326. 2001.

LEVETT, P. N., MOREY, R. E. *et al.* *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.56, n.Pt 3, Mar, p.671-3. 2006.

LONCAR, B., PAJTLER, M. *et al.* Imprint cytology in laryngeal and pharyngeal tumours. **Cytopathology**, v.18, n.1, Feb, p.40-3. 2007.

LOURDAULT, K., AVIAT, F. *et al.* (2009). "Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis." **J Med Microbiol** 58(Pt 5): 648-55.

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

MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M. A. *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol Microbiol**, v.49, n.4, Aug, p.929-45. 2003.

MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A. *et al.* Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, Oct, p.376-86. 2005.

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

MATTHIAS, M. A., RICALDI, J. N. *et al.* Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p.e213. 2008.

MERIEN, F., BARANTON, G. e PEROLAT, P. (1995). Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J Infect Dis** 172, 281-285.

NAIMAN, B. M., ALT, D. *et al.* Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. **Infect Immun**, v.69, n.12, Dec, p.7550-8. 2001.

NOGUCHI, H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). **Journal of Experimental Medicine**, v.27, p.575-592. 1918.

PALANIAPPAN, R. U., CHANG, Y. F. *et al.* Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Mol Cell Probes**, v.19, n.2, Apr, p.111-7. 2005.

PALANIAPPAN RU, CHANG YF, *et al.* Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infect Immun**, v.70, n.11, Nov, p.5924-30. 2002.

- PALANIAPPAN, R. U., MCDONOUGH, S. P. *et al.* Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect Immun**, v.74, n.3, Mar, p.1745-50. 2006.
- REIS, R. B., RIBEIRO, G. S. *et al.* Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p.e228. 2008.
- SILVA. Epidemiologic, diagnostic and therapy evaluation of transmissible venereal tumor (TVT) in the canine population attended by Veterinary Hospital of UFERSA. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.1, p.28-32. 2007.
- SILVA, E. F., MEDEIROS, M. A. *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, Aug 14, p.6277-86. 2007.
- SKILBECK, N. W. e CHAPPEL. R. J. Immunogold silver staining for visualization of leptospire in histologic sections. **J Clin Microbiol**, v.25, n.1, Jan, p.85-6. 1987.
- SLACK, A. T., KHAIRANI-BEJO, S. *et al.* *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.59, n.Pt 4, Apr, p.705-8. 2009.
- SRIVASTAVA, S. K., CHAUDHURI, P. *et al.* Evaluation of recombinant *Leptospira interrogans* serovar canicola outer membrane proteins as diagnostic antigen. **Indian J Med Microbiol**, v.24, n.4, Oct, p.346-8. 2006.
- TAPPER-JONES. Prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in Sjogren's syndrome. **J Clin Pathol**, v.33, p.282-287. 1980.
- TEIXEIRA, A. C., PAES, M. G. *et al.* Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.49, n.4, Jul-Aug, p.235-8. 2007.
- TRIBE, C. R. A comparison of rapid methods including imprint cytodiagnosis for the diagnosis of breast tumours. **J Clin Pathol**, v.26, n.4, Apr, p.273-7. 1973.
- UNITED NATIONS. The challenge of slums: global report on human settlements. **Nairobi: UN-Habitat**; 2003.
- VEGA-MEMIJE, E., DE LARIOS, N. M. *et al.* Cytodiagnosis of cutaneous basal and squamous cell carcinoma. **Int J Dermatol**, v.39, n.2, Feb, p.116-20. 2000.
- WERTS, C., TAPPING, R. I. *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat Immunol**, v.2, n.4, Apr, p.346-52. 2001.
- WHO e ILS. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: **World Health Organization**. 2003.

YAN, W., FAISAL, S. M. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect**, v.11, n.2, Feb, p.230-7. 2009.

YAN, Y., CHEN, 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, Apr, p.224-30. 2003.

## 8. ANEXO

## APROVAÇÃO DO CEUA



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

## CERTIFICADO

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

**" Avaliação de resposta imune contra leptospirose em modelos animais. "**

número P-445/07, proposto por Alan John Alexander McBride, foi licenciado pelo N° L-055/08.

Sua licença de N° L-055/08 autoriza o uso anual de :

- |                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| - 396 <i>Mesocricetus auratus</i> | - 100 <i>Rattus norvegicus</i> |
| - 10 <i>Oryctolagus cuniculus</i> | - 80 <i>Mus musculus</i>       |

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de julho de 2012 .

Rio de Janeiro, 24/09/2008

  
Dra. Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ

## 9. APÊNDICES

### ARTIGO SENDO REVISADO PARA PUBLICAÇÃO

#### ***Leptospira interrogans* Lig subunit vaccine confers sterilizing immunity in hamster model**

**Running head:** *Leptospira* subunit vaccine protects hamsters

Flávia W. C. McBride<sup>1,2</sup>, Marco A. Medeiros<sup>3</sup>, Alan J. McBride<sup>2</sup>, Cláudio P. Figueira<sup>2</sup>,  
Gabriela S. Esteves<sup>3</sup>, Adenizar D. Chagas-Junior<sup>2</sup>, Cleiton S. Santos<sup>2</sup>, Akira Homma<sup>3</sup>,  
Ricardo Galler<sup>3</sup>, Mitermayer G. Reis<sup>2</sup>, Albert I. Ko<sup>2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>2</sup>Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil;

<sup>3</sup>Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>4</sup>Division of International Medicine and Infectious Disease, Weill Medical College of Cornell University, NY, USA

\*Corresponding author: Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 40296-710, Bahia, Brazil. Tel: +55 71 3176 2301, fax: +55 71 3176 2281; E-mail: aik2001@med.cornell.edu.

**Abbreviations:** Lig – Leptospiral immunoglobulin-like; ELISA – enzyme linked immunosorbent assay; alhydrogel – aluminum hydroxide adjuvant

**FIGURA DO ARTIGO SELECIONA PARA SER A CAPA DA EDIÇÃO DE  
DEZEMBRO DE 2009 DO Journal of Medical Microbiology**

