Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

Vacina inativada associada à proteína de membrana externa contra leptospirose

Inactivated vaccine associated with the outer membrane protein against leptospirosis

Recebimento dos originais: 28/08/2018
Aceitação para publicação: 28/09/2018

Marcelle Moura Silveira
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Campus Universitário s/n, Pelotas- RS, Brasil
E-mail: marcellemsilveira@gmail.com

Matheus Acevedo Montano
Graduando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Campus Universitário s/n, Pelotas- RS, Brasil
E-mail: matheusmontano64@hotmail.com

Neida Lucia Conrad
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Campus Universitário s/n, Pelotas- RS, Brasil
E-mail: neidaconrad@yahoo.com.br

Jéssica Dias Souza
Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Campus Universitário s/n, Pelotas- RS, Brasil
E-mail: gsk.souza@gmail.com

André Alex Grassmann
Doutor em Ciências pela Universidade federal de Pelotas
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Campus Universitário s/n, Pelotas- RS, Brasil
E-mail: grassmann.aa@gmail.com

Alan John Alexander McBride
Pós-Doutor pela The Queens UniversityOf Belfast, QUB, Irlanda do Norte
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas
Endereço: Campus Universitário s/n, Pelotas- RS, Brasil
E-mail: alan.mcbride@ufpel.edu.br

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

RESUMO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espiroquetas patogênicas do gênero Leptospira, com complicações em humanos e animais. Essa doença é transmitida através do contato direto com animal infectado ou com ambiente contaminado com a urina destes animais. Roedores podem carrear leptospiras nos túbulos renais e são considerados a fonte mais importante para novas infecções. Em hospedeiros suscetíveis, as leptospiras patogênicas se espalham no organismo resultando em uma doença severa, potencialmente fatal, com falência de múltiplos órgãos. Em medicina veterinária a vacinação é a abordagem profilática mais efetiva contra a leptospirose. As bacterinas, são as únicas vacinas atualmente disponíveis, que induzem uma imunidade de curta duração, sendo esta, sorovar-específica. Esforços para desenvolver uma vacina recombinante, como possível solução para esses problemas, obtiveram limitado sucesso e o desenvolvimento de vacinas capazes de substituir as bacterinas permanece um desafio. Neste estudo, nós relatamos pela primeira vez, a avaliação da bacterina, da bacterina associada à proteína recombinante LigBrep e da proteína recombinante LigBrep, como antígenos vacinais. A vacina de subunidade que utilizou como antígeno a proteína LigBrep conferiu de 50-100% de proteção. Além disso, as vacinas que utilizaram como antígenos a bacterina e a bacterina associada à proteína recombinante LigBrep conferiram 100% de proteção.

Palavras-chaves: Leptospira; Bacterina; LigBrep; Vacina.

ABSTRACT

Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic spirochetes of the Leptospira genus, with complications in humans and animals. This disease is transmitted via direct contact with an infected animal or with an environment contaminated with their urine. Rodents can carry leptospires in their renal tubules and are considered the main source of leptospires for new infections. In susceptible hosts, pathogenic leptospires spread throughout the body, resulting in a potentially fatal, severe disease with multiple organ failure. In veterinary medicine, vaccination is the most effective approach for leptospirosis prophylaxis. The bacterins, the only currently available vaccines, induce only a short-term immune response that is serovar-specific. Efforts to develop a new recombinant vaccine as a possible solution to these problems have achieved limited success and the development of vaccines to replace bacterins, remains a challenge. In this study, we report for the first time the evaluation of bacterin, bacterin co-administered with recombinant protein LigBrep and recombinant protein LigBrep as vaccine antigens. The subunit vaccine preparation, based on LigBrep conferred 50-100% protection against mortality in vaccinated hamsters. Furthermore, Bacterin and bacterin co-administered with recombinant protein LigBrep as antigens conferred 100% of protection.

Keywords: Leptospira; Bacterin; LigBrep; Vaccine.

1 INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma doença infecciosa de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*(Nabity et al., 2018, Vernel-Pauillac and Werts, 2018). Estima-se que anualmente ocorram mais de 1 milhão de casos severos em humanos e aproximadamente 59.000 mortes (Costa et al., 2015). A doença é um problema de saúde pública, principalmente em

países em desenvolvimento, onde à falta de saneamento básico e a presença de roedores favorecem a transmissão da doença (Jorge et al., 2017, Thibeaux et al., 2018, Lee et al., 2018). Em países desenvolvidos, a leptospirose está associada a atividades ocupacionais e recreacionais(Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Além de representar um problema de saúde pública, a leptospirose também é considerada uma importante complicação veterinária, associada a grandes perdas produtivas e reprodutivas nos animais (Dellagostin et al., 2017).

Ratos e outros roedores são os principais disseminadores da leptospirose, pois são capazes de albergar a bactéria nos rins de forma crônica e assintomática. Entretanto, muitos outros animais podem estar envolvidos na transmissão, pois é uma doença comum entre animais silvestres e domésticos (Thibeaux et al., 2018). A transmissão da doença ocorre pelo contato direto do hospedeiro com animais infectados ou indireto, através de água ou solo contaminado com a urina desses animais (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Os sintomas podem ser leves, como dor de cabeça, dores musculares e vômitos, ou ainda, progredir para sintomas graves como a síndrome de Weil, caracterizada por insuficiência renal e hepática, ou a síndrome hemorrágica pulmonar severa associada à leptospirose (LPHS), a qual apresenta taxas de mortalidade superiores a 50% (Dellagostin et al., 2017).

A vacinação é a medida profilática mais eficaz para o controle da leptospirose em medicina veterinária. Entretanto, as vacinas atualmente disponíveis para leptospirose são bacterinas, que consistem na célula inteira da bactéria inativada por calor ou formalina. Tais vacinas conferem proteção em animais e também se mostraram eficazes em poucos países onde foram utilizados para imunização em humanos (McBride et al., 2005). Entretanto, essas vacinas induzem proteção sorovar específica e de curta duração, sendo necessário repetir a vacinação para manutenção da proteção (Silveira et al., 2017).

Considerando as limitações observadas na imunização com bacterinas, diferentes vacinas de DNA, prime-boost, subunidade e vetorizadas têm sido avaliadas com diversos antígenos em vacinas contra leptospirose. Entretanto, diferentemente da bacterina as vacinas recombinantes nem sempre estão associadas a uma alta proteção (Dellagostin et al., 2011). Entre os antígenos avaliados em vacinas recombinantes os mais promissores são as proteínas da família Lig (*Leptospiralimmunoglobulin-like*) (Conrad et al., 2017, Silva et al., 2007). Tais proteínas estão envolvidas no mecanismo de patogenicidade de bactéria. Além disso, a proteína recombinante LigBrep (rLigBrep), que corresponde ao fragmento N-terminal da proteína LigB, é altamente conservada e está exposta na superfície de *Leptospira* spp. patogênica (Silva et al., 2007, Grassmann et al., 2017). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da bacterina associada à proteína rLigBrep induzir proteção em hamsters.

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

2 MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e condições de cultivo

L. interrogans sorogrupo IcterohaemorrhagiaesorovarCopenhageni cepa Fiocruz L1-130, foram cultivadas em meio Ellinghausen–McCullough–Johnson– Harris (EMJH) enriquecido com 8% de albumina bovina a 28 ºC.

Preparo das vacinas

A bacterina foi produzida a partir de cultivo de *L. interrogans* como descrito previamente (Oliveira et al., 2015). Brevemente, as bactérias foram coletadas através de centrifugação (15 min; 8.000 × *g*; 4 ºC), seguida de três lavagens do cultivo em solução salina tamponada fosfatada (PBS) e o *pellet* foi ressuspendido novamente em PBS. A contagem de leptospiras foi realizada em câmara de Petroff-Hausser, e em seguida uma concentração de $1x10^8$cel./ml foi inativada a 56 ºC por 20 min e armazenada a -20 ºC até a sua utilização.

Expressão da proteína rLigBrep em *E. coli*

A clonagem e a expressão da proteína rLigBrep foram realizadas conforme descrito por Silva e colaboradores (Silva et al., 2007). Brevemente, cepas competentes de *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen, São Paulo, Brazil) 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 o sistema ÄKTAPrime e confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A proteína foi submetida à diálise em tampão PBS contendo concentrações decrescentes de ureia (8- 0M) a 4 °C. A quantificação foi feita pelo Kit BCA ProteinAssay (Thermo, USA).

Para preparação da vacina de subunidade, 50 µg da proteína rLigBrep foram adicionados a solução de 2 mg de Alhydrogel (InvivoGen, USA). Para o preparo das vacinas contendo bacterina associada à proteína rLigBrep foram combinadas $1x10^8$leptospiras a 50 µg da proteína rLigBrep e homogeneizadas em solução de 2 mg de Alhydrogel (Hidróxido de alumínio). Para a adsorção no adjuvante, as vacinas foram incubadas por 16 h sob agitação a 4 °C.

Ensaios de proteção em modelo animal

Todos os experimentos foram realizados seguindo as normas internacionais estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (registro nº 2682) da Universidade Federal de Pelotas. Critérios como perda de >10% do peso corporal e alterações comportamentais como apatia e prostração foram utilizados como pontos de desfecho para eutanásia.

Avaliação da resposta imune induzida pela bacterina associada à proteína rLigBrep

Para avaliar a proteção de ambas vacinas, hamsters com 4 a 6 semanas de idade foram vacinados ou receberam somente PBS (grupo controle) no dia 1 e receberam uma dose de reforço no dia 14. Após 1 e 2 meses, da última dose da vacina, os animais foram desafiados pela via intraperitoneal com 5X a Dose Infectante (DI) 50%, equivalente a 1-2 x 10^2leptospiras por dose. Para esse estudo foram realizados 3 experimentos independentes.

No experimento I, os hamsters foram divididos nos grupos bacterina ($1x10^8$leptospiras) e controle (PBS) compostos com 4 e 3 animais, respectivamente. Nos experimentos II e III, os animais foram divididos em 4 grupos e vacinados com: Bacterina ($1x10^8$leptospiras), Proteína rLigBrep (50 µg), Bacterina associada a proteína rLigBrep ($1x10^8$leptospiras com 50 µg da proteína) e o grupo controle (PBS). Cada grupo continha 4 animais. Os hamsters foram pesados e observados diariamente para sinais clínicos de leptospirose após o desafio.

Cultura bacteriológica

A imunidade esterilizante foi verificada através de reisolamento de leptospiras em meio EMJH. Brevemente, após a eutanásia dos animais foi realizada a necropsia onde o rim foi assepticamente coletado e macerado com auxílio de uma seringa de 20 ml em 4,5 ml de meio EMJH líquido. Após 1 hora de incubação 0,5 ml deste cultivo foi transferido para outro tubo contendo 4,5 ml de meio EMJH líquido. Este cultivo foi armazenado a 28 °C por 12 semanas e observado semanalmente para verificação de crescimento bacteriano.

Análise estatística

O teste Exato de Fisher foi utilizado nos ensaios de proteção para avaliar proteção contra mortalidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vacina confere proteção contra desafio homologo em hamsters

O desenvolvimento de vacinas contra leptospirose, que sejam capazes de induzir proteção cruzada, de longa duração e sem efeitos colaterais, permanece sendo um desafio. Devido à sua

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

localização na superfície da bactéria e a participação na interação com o hospedeiro, proteínas de membrana externa e lipoproteínas têm sido amplamente estudadas como potenciais alvos vacinais. (Dellagostin et al., 2017, Grassmann et al., 2017).

Nesse estudo, nós avaliamos a capacidade da bacterina associada à rLigBrep induzir imunidade esterilizante e proteção de longa duração, utilizando hamster como modelo animal suscetível para leptospirose. A proteína rLigBrep utilizada nas vacinas foi obtida principalmente na forma insolúvel, sendo solubilizada com agente desnaturante (8 M ureia). A expressão da rLigBrep foi confirmada através de SDS-PAGE 12% e *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina conjugado com peroxidase, Figura 1.

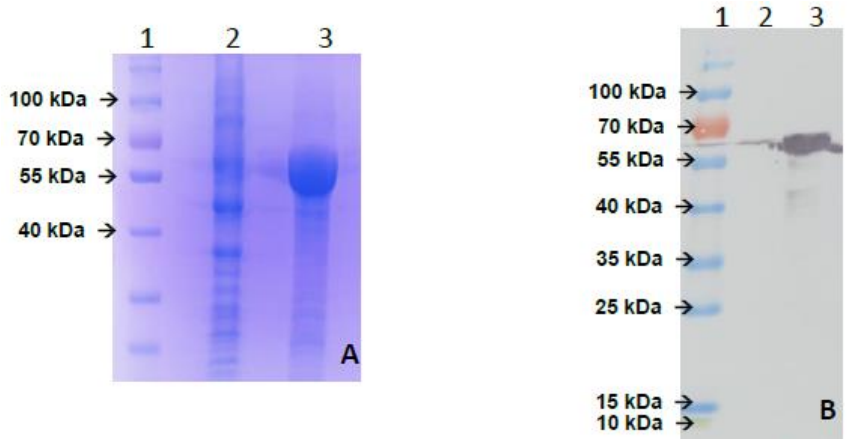


Figura 1. Expressão da proteína rLigBrep. A: SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue (1) Marcador de massa molecular; (2) Proteína Solúvel; (3) Proteína Insolúvel. B: *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-histidina conjugado com peroxidase. (1) Marcador de massa molecular; (2) Proteína Solúvel; (3) Proteína Insolúvel. SDS-PAGE 12%.

As proteínas da família Lig, dentre elas a LigA e a LigB, estão envolvidas na patogenicidade de *Leptospiraspp*, porém, somente o gene *ligB*é encontrado em todas *as Leptospira spp*. patogênicas(Dellagostin et al., 2011). Ambas proteínas LigA e LigB possuem uma região em comum (aminoácidos 102-630) chamada LigBrep, a qual tem sido avaliada como antígeno em vacinas de subunidade e de DNA para leptospirose (Forster et al., 2015, Faisal et al., 2009, Conrad et al., 2017).

A imunização com bacterina é bem documentada e protege animais contra desafio homologo (Oliveira et al., 2015, Grassmann et al., 2012). Na área de medicina veterinária preparações mono e polivalentes encontram-se disponíveis comercialmente. Tais vacinas conferem proteção contra infecção com *Leptospira*, desenvolvendo uma resposta imune humoral

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

protetora, entretanto, essa proteção é de curta duração (Silveira et al., 2017, Dellagostin et al., 2011).

Em nosso estudo avaliamos o potencial protetor da proteína rLigBrep associada à vacina padrão de bacterina, a fim de promover uma resposta imune protetora e de longa duração. Nos experimentos I e II os hamsters vacinados somente com a bacterina sobreviveram ao desafio e não apresentaram sinais clínicos de leptospirose (Figura 2), esses resultados corroboram com prévios estudos que demonstraram a capacidade dessa vacina proteger 100% dos animais em desafio homólogo (Silva et al., 2007, Oliveira et al., 2015, Grassmann et al., 2012). Entretanto, no experimento III a bacterina não foi capaz de conferir proteção total quando testada a longo prazo (Tabela 1).

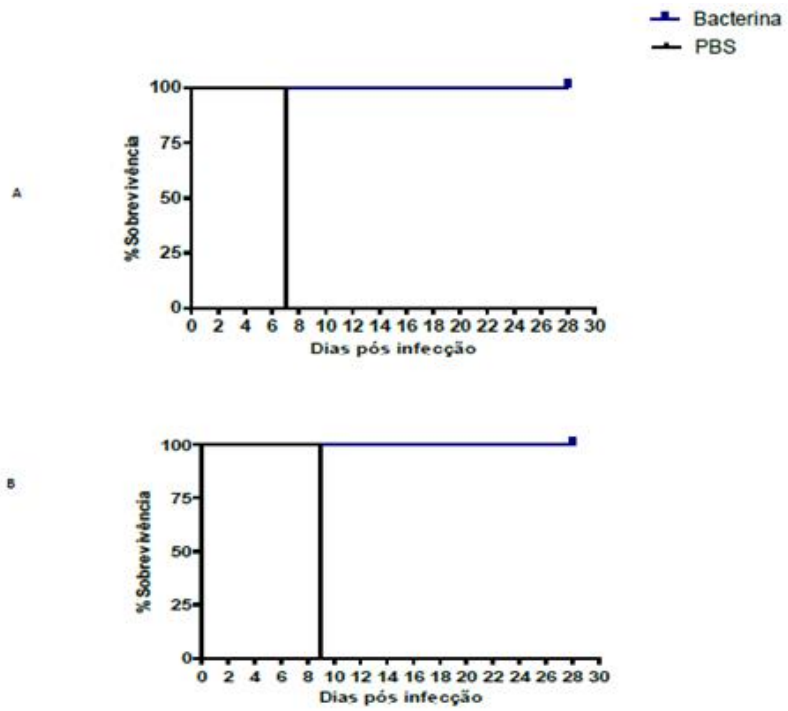


Figura 2. Sobrevivência dos hamsters vacinados com Bacterina e desafiados com *L. interrogans* no experimento longa duração I. Sobrevivência dos animais após desafio com leptospiras letais em hamsters que foram imunizados nos dias 1 e 14 com bacterina (10^8 leptospiras) ou PBS (grupo controle) e desafiados **A**- 1 mês após a última dose da vacina; **B**- 2 meses após a última dose da vacina.

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

Tabela 1. Avaliação da sobrevivência de hamsters após o desafio com leptospiras letais.

Experimento[a]	Desafio	Bacterina			Bacterina + rLigBrep			rLigBrep			Controle (PBS)	
	(Meses)	%Proteção[b]	Valor de P[c]	Cultivo positivo	%Proteção	Valor de P	Cultivo Positivo	%Proteção	Valor de P	Cultivo positivo	%Proteção	Cultivo Positivo
I	1	100 (4/4)	0,02	0/4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0/3	3/3
	2	100(4/4)	0,02	0/4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0/3	2/3
II	1	100(4/4)	0,02	0/4	100(4/4)	0,02	0/4	50,(2/4)	0,42	2/4	0/4	4/4
	2	100(4/4)	0,02	0/4	100(4/4)	0,02	0/4	100(4/4)	0,02	0/4	0/4	3/4
III	1	100(4/4)	0,02	0/4	100(4/4)	0,02	0/4	100(4/4)	0,02	1/4	1/4	2/4
	2	50 (2/4)	0,42	2/4	100(4/4)	0,02	0/4	50,(2/4)	0,42	0/4	0/4	4/4

[a](três experimentos individuais); [b](Nº de sobreviventes/total); [c]Teste Exato de Fisher; NA= Não avaliado

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a rLigBrep,quando administrada com o hidróxido de alumínio, confere proteção (80-100%) em desafio contra leptospiras letais (Conrad et al., 2017). Um estudo realizado por Silva e colaboradores utilizando a rLigANI (região da proteína LigA que não é idêntica na proteína LigB) e o adjuvante deFreund, também resultou em proteção (63-100%) contra mortalidade, entretanto,não induziu imunidade esterilizante (Silva et al., 2007). Neste estudo, a proteína rLigBrep conferiu de 50-100% de proteção nos hamsteres desafiados 1 e 2 meses após a última dose da vacina (Figuras 3 e 4). Além disso, as vacinas que utilizaram como antígenos a bacterina associada à proteína rLigBrep conferiram 100% de proteção nos experimentos realizados (Figuras 3 e 4).

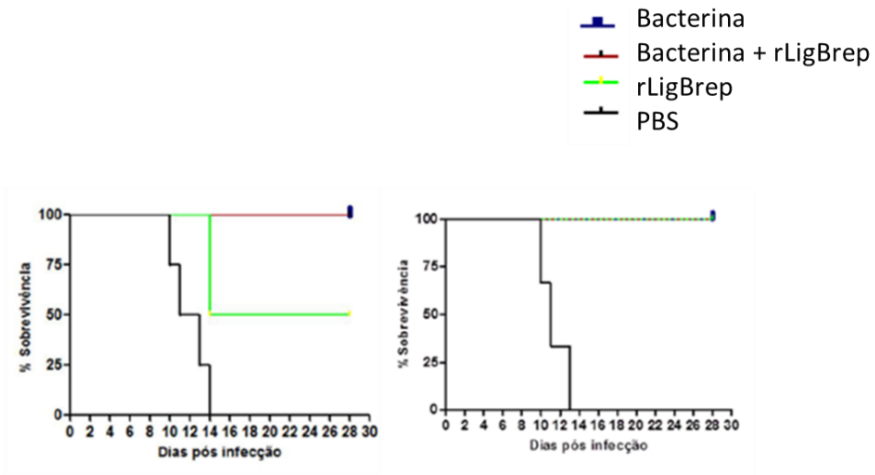


Figura 3. Sobrevivência dos hamsters desafiados com leptospiras letais no experimento longa duração II.Efeito protetor conferido pela Bacterina (1x10^{8}leptospiras), rLigBrep (50 µg) e Bacterina associada a rLigBrep após imunizações nos dias 1 e 14 e desafios **A-** 1 mês após a vacinação; **B-** 2 meses após a vacinação.

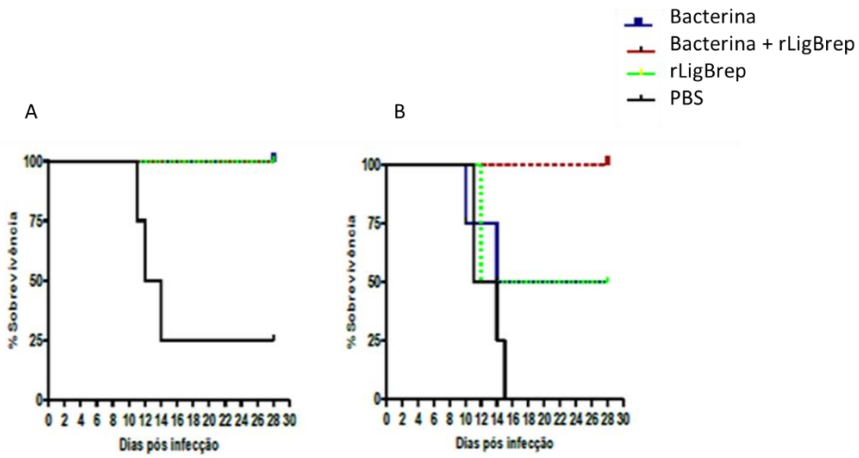


Figura 4. Experimento longa duração III, sobrevivência dos hamsters após desafio com leptospiras letais.Efeito protetor conferido pela Bacterina ($1x10^8$leptospiras), rLigBrep (50 μg) e Bacterina associada a rLigBrep após imunizações nos dias 1 e 14 e desafios **A-** 1 mês após a vacinação; **B-** 2 meses após a vacinação.

No experimento I, 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 6 e 10 após o desafio (Figura S1). Nos experimentos II e III, animais dos grupos controle apresentaram sinais de leptospirose entre 7 e 14 dias após o desafio (Figuras S2 e S3).

Além dos antígenos, os adjuvantes desempenham importante papel nas formulações vacinais. Adjuvantes são substâncias que atuam de modo a acelerar, prolongar, e/ ou aprimorar as respostas imunes específicas de um antígeno. Por aumentarem a resposta imune específica de um antígeno, o adjuvante é capaz de modular a resposta imune reduzindo a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessária (Silveira et al., 2017). Nesse estudo, nós utilizamos como adjuvante o Hidróxido de alumínio que induz uma resposta imune humoral de longa duração após a imunização primária. Através da sua adsorção ao antígeno o hidróxido de alumínio retarda a eliminação deste, além de induzir eosinofilia e ativação de complemento, assim como uma intensa degranulação de mastócitos no local da injeção. A inflamação no local "estimula" a drenagem linfática da região e facilita o transporte do antígeno para os linfonodos (Apostolico Jde et al., 2016). Além disso, o hidróxido de alumínio tem sido avaliado como adjuvante com diferentes antígenos em formulações vacinais contra leptospirose (Silveira et al., 2017, Oliveira et al., 2015, Dellagostin et al., 2011).

Vacina promove proteção contra colonização e infecção letal de leptospiras em hamsters

A capacidade da bacterina induzir imunidade esterilizante foi avaliada através dos cultivos de macerado renal que foram observados, sob microscopia de campo escuro por um período de 12 semanas. A presença de leptospiras foi detectada no cultivo renal de dois animais (50%) desafiados dois meses após a vacinação com bacterina no experimento III, assim como mostrado por outros pesquisadores (Oliveira et al., 2015). Além disso, baixos níveis de DNA leptospiral foram encontrados por PCR quantitativo em tempo real, demonstrando que a bacterina não induz imunidade esterilizante (Coutinho et al., 2011). No

entanto, as vacinas que continham a bacterina associada à proteína rLigBrep, apresentaram cultivos negativos nos três experimentos realizados (Tabela 1).

Nesse estudo, nós relatamos capacidade da bacterina associada à rLigBrep conferir proteção de longa duração. Além disso, nossos resultados sugerem que essa formulação associada pode ser capaz de induzir imunidade esterilizante. Entretanto, ainda é necessária a realização de mais experimentos a fim de validar a proteção conferida por esta nova estratégia vacinal, como avaliar a presença de DNA de leptospiras nos rins dos animais vacinados através de PCR quantitativo em tempo real, bem como a proteção conferida pela bacterina e pela bacterina associada à proteína rLigBrep em experimentos com um período de duração superior a 2 meses.

REFERÊNCIAS

ADLER, B. & DE LA PENA MOCTEZUMA, A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol,* 140**,** 287-96.

APOSTOLICO JDE, S., BOSCARDIN, S. B., YAMAMOTO, M. M., DE OLIVEIRA-FILHO, J. N., KALIL, J., CUNHA-NETO, E. & ROSA, D. S. 2016. HIV Envelope Trimer Specific Immune Response Is Influenced by Different Adjuvant Formulations and Heterologous Prime-Boost. *PLoS One,* 11**,** e0145637.

CONRAD, N. L., CRUZ MCBRIDE, F. W., SOUZA, J. D., SILVEIRA, M. M., FELIX, S., MENDONCA, K. S., SANTOS, C. S., ATHANAZIO, D. A., MEDEIROS, M. A., REIS, M. G., DELLAGOSTIN, O. A. & MCBRIDE, A. J. 2017. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis,* 11**,** e0005441.

COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON, P., MARTINEZ-SILVEIRA, M. S., STEIN, C., ABELA-RIDDER, B. & KO, A. I. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis,* 9**,** e0003898.

COUTINHO, M. L., CHOY, H. A., KELLEY, M. M., MATSUNAGA, J., BABBITT, J. T., LEWIS, M. S., ALEIXO, J. A. & HAAKE, D. A. 2011. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by Leptospira interrogans. *PLoS Negl Trop Dis,* 5**,** e1422.

DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANN, A. A., HARTWIG, D. D., FELIX, S. R., DA SILVA, E. F. & MCBRIDE, A. J. 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin,* 7**,** 1215-24.

DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANN, A. A., RIZZI, C., SCHUCH, R. A., JORGE, S., OLIVEIRA, T. L., MCBRIDE, A. J. & HARTWIG, D. D. 2017. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci,* 18.

FAISAL, S. M., YAN, W., MCDONOUGH, S. P. & CHANG, Y. F. 2009. Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine,* 27**,** 378-87.

FORSTER, K. M., HARTWIG, D. D., OLIVEIRA, T. L., BACELO, K. L., SCHUCH, R., AMARAL, M. G. & DELLAGOSTIN, O. A. 2015. DNA prime-protein boost based vaccination with a conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins enhances protection against leptospirosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 110**,** 989-95.

GRASSMANN, A. A., FELIX, S. R., DOS SANTOS, C. X., AMARAL, M. G., SEIXAS NETO, A. C., FAGUNDES, M. Q., SEIXAS, F. K., DA SILVA, E. F., CONCEICAO, F. R. & DELLAGOSTIN, O. A. 2012. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol,* 19**,** 740-5.

GRASSMANN, A. A., SOUZA, J. D. & MCBRIDE, A. J. 2017. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol,* 8**,** 256.

JORGE, S., SCHUCH, R. A., DE OLIVEIRA, N. R., DA CUNHA, C. E. P., GOMES, C. K., OLIVEIRA, T. L., RIZZI, C., QADAN, A. F., PACCE, V. D., COELHO RECUERO, A. L., SOARES BROD, C. & DELLAGOSTIN, O. A. 2017. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel Med Infect Dis*.

LEE, M. J., BYERS, K. A., DONOVAN, C. M., BIDULKA, J. J., STEPHEN, C., PATRICK, D. M. & HIMSWORTH, C. G. 2018. Effects of Culling on Leptospira interrogans Carriage by Rats. *Emerg Infect Dis,* 24**,** 356-360.

MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2005. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis,* 18**,** 376-86.

NABITY, S. A., HAGAN, J. E., ARAUJO, G., DAMIAO, A. O., CRUZ, J. S., NERY, N., WUNDER, E. A., JR., REIS, M. G., KO, A. I. & RIBEIRO, G. S. 2018. Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the Dual Path Platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized patients. *PLoS Negl Trop Dis,* 12**,** e0006285.

OLIVEIRA, T. L., GRASSMANN, A. A., SCHUCH, R. A., SEIXAS NETO, A. C., MENDONCA, M., HARTWIG, D. D., MCBRIDE, A. J. & DELLAGOSTIN, O. A. 2015. Evaluation of the Leptospira interrogans Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. *PLoS One,* 10**,** e0142821.

SILVA, E. F., MEDEIROS, M. A., MCBRIDE, A. J., MATSUNAGA, J., ESTEVES, G. S., RAMOS, J. G., SANTOS, C. S., CRODA, J., HOMMA, A., DELLAGOSTIN, O. A., HAAKE, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2007. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine,* 25**,** 6277-86.

SILVEIRA, M. M., OLIVEIRA, T. L., SCHUCH, R. A., MCBRIDE, A. J. A., DELLAGOSTIN, O. A. & HARTWIG, D. D. 2017. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. *Vaccine,* 35**,** 5559-5567.

THIBEAUX, R., IRAOLA, G., FERRES, I., BIERQUE, E., GIRAULT, D., SOUPE-GILBERT, M. E., PICARDEAU, M. & GOARANT, C. 2018. Deciphering the unexplored Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom,* 4.

VERNEL-PAUILLAC, F. & WERTS, C. 2018. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. *Microbes Infect*.

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

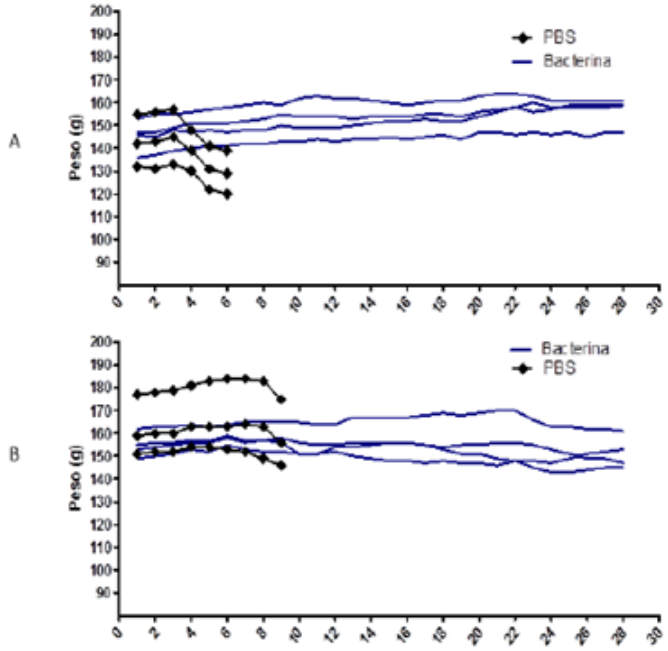


Figura S1. Avaliação do peso dos animais do experimento I após desafio com leptospiras letais. A- 1 mês após desafio; B- 2 meses após desafio.

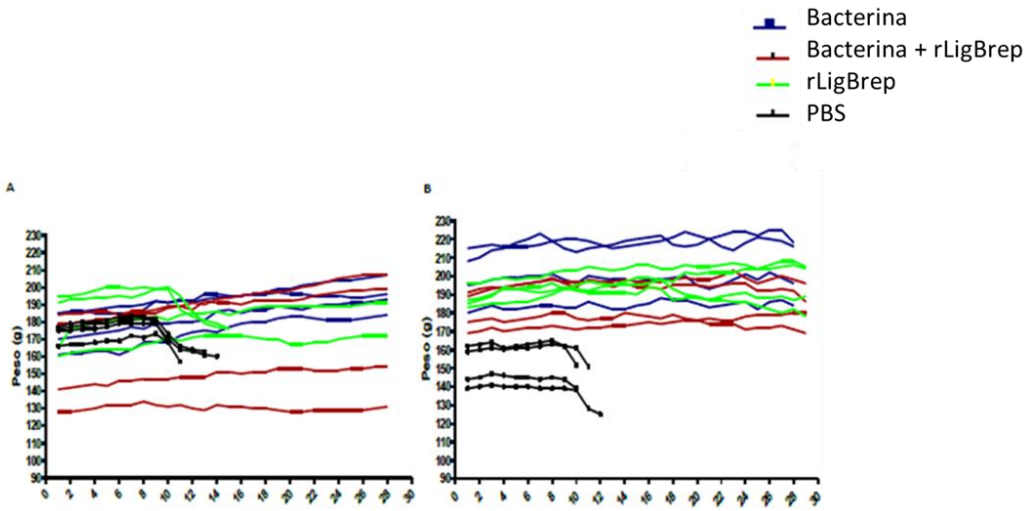


Figura S2: Avaliação do peso dos animais do experimento II após desafio com leptospiras letais. **A-** Animais desafiados 1 mês após a vacinação; **B**- animais desafiados 2 meses após a vacinação. Os animais foram pesados e monitorados diariamente por 28 dias após a infecção. Cada linha representa o peso individual de cada animal.

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

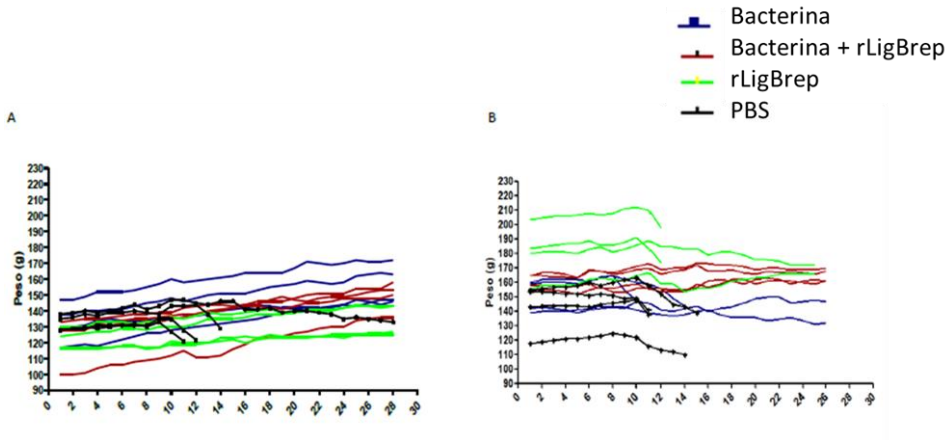


Figura S3. Experimento III, peso dos animais desafiados com *Leptospirainterrogans*. **A-** animais desafiados 1 mês após a vacinação; **B-** animais desafiados 2 meses após a vacinação. Os animais foram pesados e monitorados diariamente por 28 dias após a infecção. Cada linha representa o peso individual de cada animal.