

LEPTOSPIROSE BOVINA: ISOLAMENTO DO AGENTE ETIOLÓGICO EM BOVINOS ABATIDOS EM UM FRIGORÍFICO DE PELOTAS/RS

**FERNANDA ENDLER VALIATI¹; AMILTON SEIXAS²; KARINA COLONETTI²;
IVANIA DELIBERALLI; NAJARA BITENDCURT²; ÉVERTON FAGONDE DA
SILVA³**

¹Universidade Federal de Pelotas – f.e.valiati@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença emergente negligenciada especialmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Chagas-Junior et al. 2012). É uma zoonose cosmopolita causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira ssp.* e encontrada mais comumente em áreas tropicais e sub-tropicais, onde as condições ambientais e sócio-econômicas favorecem a sua transmissão. Tem sido identificada nos últimos anos como um problema global de saúde pública, pois aumenta as taxas de mortalidade e de morbidade (Ganoza et al. 2010).

A transmissão da leptospirose em humanos e animais domésticos ocorre incidentalmente pela exposição à água ou solo contaminados pela urina de animais infectados ou por contato direto com tecidos e órgãos desses animais (Koizumi et al. 2012). Quando disseminada dentro do hospedeiro a leptospira patogênica pode causar desde sintomas como febre, náuseas, dores musculares, até manifestações mais severas, podendo levar à morte (Lourdault et al. 2011).

Devido às perdas econômicas causadas pela doença e os prejuízos em termos de saúde pública se faz necessário o uso de vacinas em humanos e animais. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose é indispensável (Faine et al. 1999).

Em Pelotas, nosso grupo de pesquisa já relatou nos últimos dez anos o isolamento de mais de uma dezena de cepas, oriundas principalmente de humanos, caninos e roedores sinantrópicos (Silva et al.). Com estes isolamentos, podemos evidenciar uma ampla variedade de espécies e sorogrupos que circulam em nossa região do estado e que podem causar desde quadros clínicos leves e inaparentes até casos que culminam com a morte do paciente. A partir disso, o objetivo desse estudo foi isolar leptospirosas presentes em frigoríficos da Região de Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

A coleta das amostras foi realizada em três frigoríficos da cidade de Pelotas. Após, as amostras foram semeadas no meio de cultura EMJH (Difco), o qual é amplamente utilizado para o cultivo de leptospirosas, na apresentação líquida e semi-sólida. Posteriormente, ao processo de coleta, o material foi transportado imediatamente ao laboratório de biologia molecular do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) onde foi processado.

Para o teste de virulência, utilizou-se o protocolo de SILVA (2008) com pequenas modificações e a primeira técnica para a caracterização molecular realizada foi a PCR. Primeiro realizamos uma PCR com oligonucleotídeos que amplificam o gene LipL32, o qual está presente apenas em leptospiros patogênicas. Depois realizamos uma segunda PCR para a amplificação do gene 16S RNA, o qual é amplamente utilizado na tipificação de leptospiros. Procedeu-se a inoculação, através da via Intrapertoneal, do volume de 1 mL do cultivo em dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), avaliando-se os sinais clínicos e patológicos encontrados no teste.

Para o estudo da estrutura populacional bacteriana e para a caracterização de isolados de *L. interrogans*, a espécie patogênica de maior importância em saúde pública, à análise do número variável de repetições em tandem (VNTR) tem-se provado ser um método altamente discriminatório. A habilidade de VNTRs em detectar micro-organismos tem sido aumentada pela disponibilidade das sequências de genomas completos e softwares que procuram por lócus VNTR a partir destas sequências, segundo Benson, 1999.

Uma vez identificados os polimorfismos, primers que flanqueiem estes podem ser desenhados para amplificar estas regiões com tamanhos variados e com isso possibilitar a diferenciação do número de cópias baseado no tamanho do amplicon. Além disso, quando VNTR aplicada a múltiplos loci é aliada em um sistema de eletroforese capilar automatizado, pode ser feita uma estimativa precisa do tamanho dos amplicons e em menor tempo quando comparado à análise em gel de agarose, resultando em um grande poder de discriminação.

Com isso, utilizou-se a técnica de VNTR para caracterizar isolados de *L. interrogans* obtidos de diferentes espécies, utilizando um sistema de eletroforese capilar automatizado para análise dos amplicons. Foram utilizados os primers 4, 7, 9, 10, 11, 19 e 23. Brevemente, a amplificação foi feita com o kit PCR Mix, utilizando um ciclo de desnaturação (94°C por 5min), seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30s), anelamento (55°C por 30s) e extensão (72°C por 1min 30s) e uma etapa final de extensão de 10min a 72°C. Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese com gel de agarose 1,5% e seu tamanho foi estimado por comparação com um marcador de 100pb produzido pelo nosso laboratório.

Este trabalho faz parte de um projeto cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 5.00.00.019 e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 23110.004657/2010-84, cadastro nº CEEA 4657. Os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, o laboratório de Biologia Molecular (CDTec) possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nº0081/98.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do teste de virulência revelou que duas cepas (BOV 3 e BOV 15) foram capazes de reproduzir experimentalmente os achados clínicos da leptospirose, como prostração, isolamento, desidratação, perda de peso e óbito, em 100% dos animais infectados, a partir do 5º dia pós-infecção até o óbito. Porém, a cepa BOV 14 não foi capaz de causar a enfermidade clínica nem o óbito no grupo de animais. Em todos os animais doentes e que morreram (cepas BOV 3 e BOV 15), alterações macroscópicas, descritas como típicas da leptospirose humana e animal, como a icterícia, a congestão de órgãos e hemorragias, foram

encontradas durante a necropsia. Para os animais sobreviventes (cepa BOV 14), após a eutanásia, não foram evidenciadas alterações macroscópicas nos órgãos (Figura 1). O reisolamento das três cepas foi obtido com sucesso a partir do cultivo do tecido renal de todos os 6 animais.

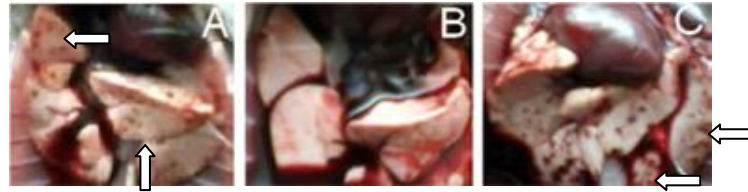


Fig. 1) Análise macroscópica representativa da necropsia realizada com hamsters inoculados no experimento. (A) Hamster inoculado com BOV 3; (B) Hamster inoculado com BOV 14; (C) Hamster inoculado com BOV 15. As setas brancas indicam presença de hemorragia pulmonar em (A) e (C).

Quando o cultivo das três cepas apresentou um crescimento de 10^8 .ml⁻¹, foi procedida a extração de DNA genômico e realizadas as PCR's. Este resultado confirmou que as três cepas são patogênicas, já que o gene LipL32 está presente apenas em cepas patogênicas e está presente demonstrando um resultado positivo. As PCR para a amplificação dos genes 16S DNA e rpoB foram realizadas com sucesso (Figura 2).

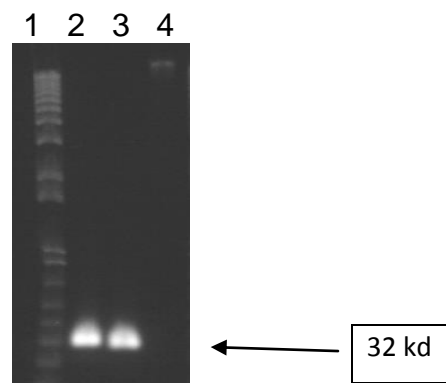


Fig. 2) Imagem representativa com o DNA genômico e a amplificação do gene LipL32 da cepa BOV3, onde: (1) marcador de peso molecular 1 kB; (2,3) gene LipL32; (4) DNA genômico do isolado.

A análise do sequenciamento dos genes 16S DNA e rpoB, utilizando-se o programa BLAST, classificou as cepas de acordo com a homologia com as sequências depositadas no GenBank. As lesões macroscópicas encontradas revelaram alterações típicas encontradas na leptospirose humana e animal, como a hemorragia pulmonar (Figura 3).



Fig. 3) Hemorragia pulmonar em um animal inoculado com a cepa Bov 3. As setas indicam petéquias distribuídas pelos pulmões.

Duas cepas isoladas causam a leptospirose experimental, com manifestações clínicas e patológicas semelhantes as que são descritas em humanos e animais doentes. Dessa forma, os isolados BOV 3 e BOV 15 serão empregados em ensaios para a determinação da dose letal 50% (DL50), e posteriormente, em experimentos que para avaliar a imunoproteção homóloga e heteróloga conferida por vacinas produzidas em nosso grupo. Já a cepa BOV 14, no formato de ensaio utilizado, não é capaz de reproduzir a enfermidade. De acordo com os resultados obtidos na caracterização molecular preliminar dos três isolados, conclui-se que as cepas são patogênicas, através da PCR LipL32.

Embora os resultados do sequenciamento do gene 16S DNA tenha apresentado homologia de 100% com dados depositados no GenBank para as espécies apresentadas, este resultado pode ser considerado inconclusivo, já que observou-se homologia de 100% com outras sequências pertencentes a espécies, sorogrupos e sorovares distintos. Isso também pôde ser observado com a cepa BOV15, a qual também possui homologia de 95% com outras sequências depositadas.

4. CONCLUSÕES

As cepas BOV 3 e BOV 15 são capazes de reproduzir a leptospirose experimental em hamster. Além disso, as duas cepas causam o óbito e manifestações clínicas e patológicas nos hamsters, semelhantes às descritas nas formas graves da leptospirose humana e animal;

As cepas BOV 3 e BOV 15 são candidatas aos ensaios de DL50 e ao teste de vacinas contra a leptospirose animal;

A cepa BOV 14, no formato de ensaio utilizado, não é capaz de reproduzir a enfermidade em hamster.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAGAS-JUNIOR, Adenizar D.; SILVA, Caroline L.R.; SOARES, Luciane Marieta; SANTOS, Cleiton S.; SILVA, Carlos D.C.M.; ATHANAZIO, Daniel A.; REIS, Mitermayer G.; MCBRIDE, Flávia W. Cruz; MCBRIDE, Alan J.A. Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. **PLoS ONE**, Brasil, v.7, 2012.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, p.272, 1999.
- GANOZA, Christian.; MATTHIAS, Michael A.; SAITO, Mayuko.; CESPEDES, Manuel.; GOTUZZO, Eduardo.; VINETZ, Joseph M. Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Peru, v.4, 2010.
- KOIZUMI, Nobuo.; NAKAJIMA, Chie.; HARUNARI, Tsunehito.; TANIKAWA, Tsutomu.; TOKIWA, Toshihiro.; UCHIMURA, Eriko.; FURUYA, Tokujiro.; MINGALA, Claro Niegos.; VILLANUEVA, Marvin Ardeza.; OHNISHI, Makoto.; SUZUKI, Yasuhiko. A New Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid, Simple, and Sensitive Detection of *Leptospira spp.* in Urine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.2072–2074, 2012.
- LOURDAULT, Kristel.; CERQUEIRA, Gustavo M.; WUNDER JR., Esio A.; PICARDEAU, Mathieu. Inactivation of *clpB* in the Pathogen *Leptospira interrogans* Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions. **Infection and Immunity**, v.79, p.3711–3717, 2011.
- SILVA ÉF, BROD CS, CERQUEIRA GM, BOURSCHEIDT D, SEYFFERT N, QUEIROZ A, et. al. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Vet Microbiol.** v.121, p.144-149, 2007.