

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Leptospira kirschneri* DE CASO CLÍNICO HUMANO

CARLOS EDUARDO POUHEY DA CUNHA¹; AISHA BAKRY²,AMILTON SEIXAS NETO², LEONARDO GARCIA MONTE², ALAN JOHN ALEXANDER McBRIDE²; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN³

¹Universidade Federal de Pelotas – cpouey@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – aishefarid@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada difundida mundialmente causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (WHO, 2011), que se divide em 6 espécies saprofíticas, 5 intermediárias e 10 patogênicas, subdivididas em mais de 260 sorovares (BOURHY et al., 2014). *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* são as espécies mais comumente associadas com a doença em humanos (BOONSILP et al., 2013), sendo estimados de 873.000 casos de leptospirose humana por ano, dos quais 49.000 resultam em morte (PICARDEAU, 2014).

A leptospirose se dá indiretamente pelo contato com material contaminado ou diretamente por contato com urina de animais infectados. Além de colonizarem os rins, *Leptospira* spp. patogênicas podem danificar outros órgãos, como fígado e pulmões (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A leptospirose pode ocorrer desde uma forma assintomática, passando por um quadro clínico similar a um quadro gripal até sua forma mais grave, apresentando hemorragia pulmonar difusa e falência dos rins e fígado (KO et al., 2009). Na primeira fase, onde há bactеремia, a doença apresenta febre e dores musculares e de cabeça entre outros sintomas. Posteriormente, caso não tratada, a leptospirose pode desenvolver-se em sua forma mais severa, que pode ser fatal e apresenta, além dos sintomas supracitados, falência renal, hepática e hemorragia pulmonar (FAINE et al., 1999).

A cidade de Pelotas apresenta um índice elevado de infecções por *Leptospira* spp. patogênicas: 50 casos por 100 mil habitantes em 2001 (BARCELLOS et al., 2003). A vacinação é o método mais indicado para a prevenção da doença em populações em áreas de risco. Entretanto, as vacinas humanas atuais (bacterinas) estão restritas a poucos países (Cuba, França, Japão e China), são reatogênicas e conferem proteção de curto prazo restrita aos sorovares nelas contidos. A realização de um levantamento dos sorovares prevalentes em áreas endêmicas, bem como o isolamento desses microrganismos, é de extrema importância e desempenha um papel chave para o desenvolvimento de uma vacina que proporcione proteção cruzada contra os sorovares endêmicos a determinada região. Além disso, tal estudo pode também dar grande contribuição ao aprimoramento de testes rápidos para o diagnóstico de leptospirose.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar uma cepa de *Leptospira* sp. isolada de um caso clínico de leptospirose humana na zona rural de Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento e cultivo da bactéria

Amostra de sangue de um paciente com quadro clínico compatível com a fase aguda de leptospirose foi coletada por punção venosa e inoculada em meio

EMJH seguido de incubação a 30°C por até 3 meses. Microscopia em campo escuro foi usada para detectar crescimento.

2.2 Caracterização molecular

DNA genômico foi extraído de com o kit illustra bacteria genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi usado para determinar espécie, sorogrupo e sorovar do isolado por MLST (BOONSILP et al., 2013). Brevemente, as sequências de 7 loci foram determinadas e alinhadas a um banco de dados e, de acordo com o perfil de alelos, foi designado um *sequence type* (ST) para o isolado. O software MEGA (TAMURA et al., 2013) foi usado para construção da árvore filogenética relacionando o isolado deste trabalho com demais isolados de Pelotas.

2.3 Imunofluorescência indireta para detecção de fatores de virulência

Aproximadamente 15 µL do cultivo em fase log de crescimento (10^8 células por mililitro) do isolado foram secos em lâminas para imunofluorescência. A membrana das bactérias foi permeabilizada pela incubação com metanol a -20 °C por 20 minutos. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado através da incubação com PBST + 10% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora a 30 °C. Anticorpos policlonais de coelho anti-LipL32, anti-LigAni e anti-LigBni foram diluídos 1:200 em PBST + 1% de BSA e incubados na lâmina por 1 hora em 30 °C. Anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com FITC diluído 1:200 foi incubado pelo mesmo período. O DNA foi marcado com Hoestch 33342 por 30 min a 30 °C. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência a 492 nm para FITC e 350 nm para Hoestch 33342.

2.4 Caracterização da virulência em modelo animal

Um cultivo do isolado com 5 passagens *in vitro* foi utilizado para inoculação intraperitoneal de aproximadamente 10^8 células bacterianas em hamsters sírios fêmeas (*Mesocricetus auratus*) com 8 semanas de idade. Foram usados 3 animais no grupo inoculado com o isolado e 2 no grupo controle, inoculado com PBS estéril. Os animais foram observados por 21 dias e eutanasiados quando moribundos.

Um dos rins foi removido assepticamente, macerado e homogeneizado em meio EMJH suplementado para reisolamento patógeno. Amostras de rim, fígado e pulmão foram coletadas para analisar a presença de *Leptospira* sp. nesses órgãos pela técnica de *imprint* (CHAGAS-JÚNIOR et al., 2009) e avaliação de danos histopatológicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após aproximadamente 3 meses de incubação, foi possível verificar a presença de espiroquetas no cultivo, que foi então repicado para extração de DNA, congelamento e testes de virulência. O isolado foi denominado 61H. Alinhamento dos loci de MLST foi realizado com sequências já caracterizadas disponíveis em <http://leptospira.mlst.net/>. O isolado teve 100% de identidade com o *sequence type* 117 (ST 117), que corresponde a *L. kirschneri* sorogrupo Pomona sorovar Mozdok. O dendrograma gerado com este isolado e outros isolados de Pelotas está representado na Figura 1.

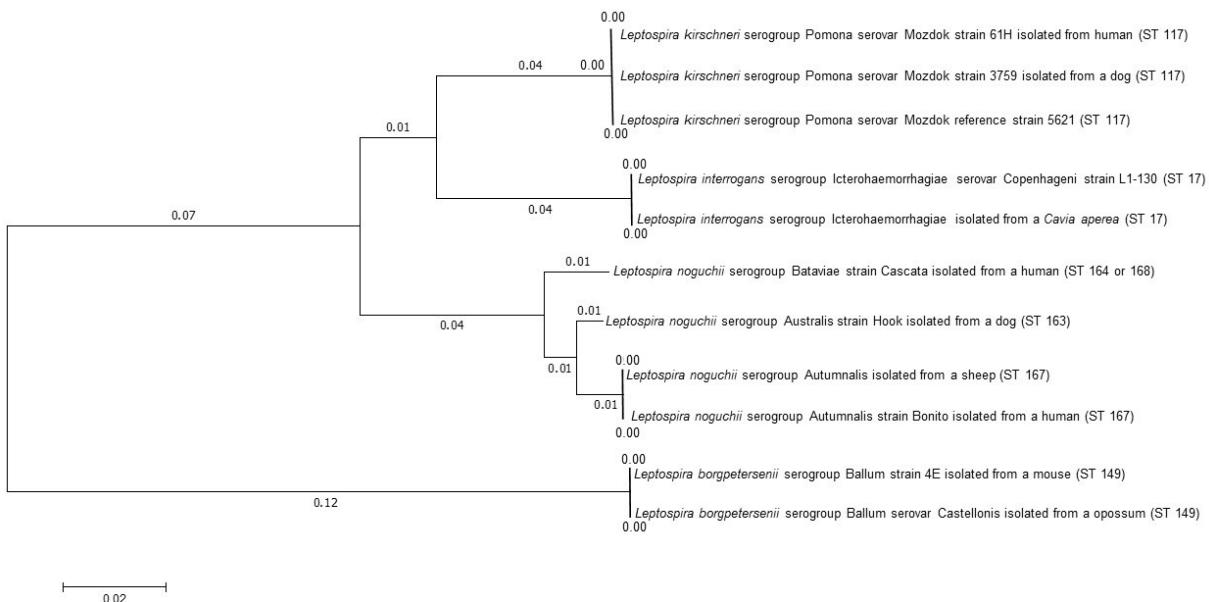


Figura 1: Análise filogenética mostrando proximidade do nosso isolado com cepas isoladas na região de Pelotas/RS, Brasil.

Ainda não foram descritos casos de infecção em humanos com esse sorovar no Hemisfério Sul. A única referência na literatura pesquisada indica infecção humana pelo sorovar Mozdok somente em Cuba, embora não seja um relato de caso (OBREGÓN et al., 2007).

A técnica de imunofluorescência indireta detectou a presença das proteínas LipL32 e as adesinas LigA e LigB, fatores de virulência de *Leptospira* (HAAKE et al, 2000; MATSUNAGA et al, 2003). Na experimentação animal, um animal foi a óbito 5 dias após a infecção experimental e os outros 2 animais, 7 dias após a infecção. Análise histopatológica dos rins revelou congestão, hemorragia, infiltrado de células mononucleares, degeneração e necrose tubular, cilindros hialinos acometendo túbulos, glomérulos com conteúdo eosinófilo e hemácias e hemossiderina. O fígado apresentou degeneração difusa, hepatócitos fora do padrão de cordões e infiltrado de leucócitos. Os pulmões apresentavam edemas, congestão e hemorragia elevados, enfisema, presença de fibrina nos alvéolos e hemossiderina. A técnica de *imprint* confirmou a presença de *Leptospira* nos rins, fígado e pulmão dos animais eutanasiados, sustentando que os danos histopatológicos sejam decorrentes de leptospirose.

4. CONCLUSÕES

O isolado pertence a um sorovar ainda não descrito no Hemisfério Sul, assim não se agrupando com demais isolados de Pelotas. Este é o primeiro relato de infecção em humanos por *Leptospira kirschneri* sorovar Mozdok no Hemisfério Sul. O isolado é altamente virulento para hamsters, animal comumente utilizado como modelo de infecção experimental para leptospirose.

A importância desse achado reside em seu significado epidemiológico para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos, devendo o sorovar ser incluído em futuras formulações vacinais contra leptospirose e usado em novos testes diagnósticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis. Veterinary microbiology*, Amsterdam, v. 140, n.3-4, p. 287–296, 2010.

BARCELLOS, C.; LAMMERHIRT, C.B.; ALMEIDA, M.A.; SANTOS, E. Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 1283–1292, 2003.

BOONSILP, S.; THAIPADUNG PANIT, J.; AMORNCHAI, P.; WUTHIEKANUN, V.; BAILEY, M.S.; HOLDEN, M.T.G.; ZHANG, C.; JIANG, X.; KOIZUMI, N.; TAYLOR, K.; GALLOWAY, R.; HOFFMASTER, A.R.; CRAIG, S.; SMYTHE, L.D.; HARTSKEERL, R.A.; DAY, N.P.; CHANTRATITA, N.; FEIL, E.J.; AANENSEN, D.M.; SPRATT, B.G.; PEACOCK, S.J. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. E1954, 2013.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 33, p. 4061–7, 2014.

CHAGAS-JUNIOR, A.D.; MCBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; FIGUEIRA, C.P.; MEDEIROS, M.A.; REIS, M.G.; KO, A.I.; MCBRIDE, F.W.C. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of medical microbiology**, Reading, v. 58, p. 1632–7, 2009.

FAINE, S.B.; ADLER, B.; BOLIN, C.A.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis 2nd ed**, Melbourne: MediSci, 1999.

HAAKE, D.A.; CHAO, G.; AUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNETT, D. The *Leptospira* major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 2276–2285, 2000.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, Londres, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, A.; KO, A.I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 49, n. 4, p. 929–945, 2003.

OBREGÓN, A.M.; FERNÁNDEZ, C.; RODRÍGUEZ, I.; RODRÍGUEZ, J. The application of monoclonal antibody methodology as a tool for serotyping leptospira isolates in Cuba. **Revista cubana de medicina tropical**, Havana, v. 59, n. 1, p. 68–70, 2007.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULoudis, A. N.; DURSKI, K.; HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, Nova Iorque, v. 71, p. 1–8, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular biology and evolution**, Oxford, v. 30, p. 2725–9, 2013.

WHO. Leptospirosis an emerging public health problem. **Weekly Epidemiological Records**, Genève, v. 86, p. 45–50, 2001.