

ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS EM UM RATO CAPTURADO EM UMA RESIDÊNCIA DE PELOTAS/RS

MAIRANA VENZO¹; TANISE PACHECO FORTES²; GILMAR BATISTA MACHADO²; CAROLINE DEWES²; EVERTON FAGONDE DA SILVA³;AMILTON CLAIR SEIXAS NETO⁴

¹Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da UFPel – mairana-venzo@hotmail.com

²Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – tanisefortes@gmail.com; gilmar.machado84@hotmail.com; caroldewesvet@hotmail.com

³Professor da Faculdade de Veterinária da UFPel – fagondee@gmail.com

⁴PNPD do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – amiltonseixas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*. A enfermidade possui distribuição mundial, podendo afetar humanos e animais. A leptospirose é classificada como uma doença negligenciada no mundo, causando mais de 500 mil casos por ano (WHO, 2011).

Os humanos são considerados hospedeiros acidentais na cadeia epidemiológica da leptospirose, e comumente são infectados através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, particularmente durante enchentes e inundações (KO et al., 2009).

Uma ampla variedade de animais pode ser potenciais reservatórios da leptospirose. Leptospiras patogênicas podem infectar diferentes espécies de mamíferos, sendo os ratos (*Rattus sp.*) considerados como reservatórios crônicos assintomáticos e também são importantes fontes de infecção para humanos no ambiente urbano (BHARTI et al., 2003). No entanto, a importância relativa dada a um reservatório dependerá do ambiente, da densidade populacional, tipo de residência e da ocupação dos residentes (REIS et al., 2008).

O isolamento e a caracterização de leptospiras patogênicas são importantes para o desenvolvimento de novas vacinas e para aprimorar o diagnóstico da doença. Neste contexto, nosso trabalho objetivou investigar a presença de roedores em uma residência no bairro Laranjal em Pelotas/RS, proceder a captura de roedores e a tentativa de isolamento de leptospiras.

2. METODOLOGIA

2.1. Investigação

No mês de maio de 2015 realizou-se uma visita em uma residência localizada no bairro Laranjal em Pelotas/RS com o objetivo de investigar a presença de roedores na propriedade. Após a constatação de indícios da presença desses animais dentro do pátio do domicílio, foram instaladas armadilhas em locais estratégicos a fim de proceder a captura dos roedores. Um animal foi capturado e conduzido até a Faculdade de Veterinária (GEDTA/UFPel) para eutanásia. Os rins foram coletados assepticamente, macerados e inoculados diretamente em Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) semi sólido (Difco Laboratories, USA) enriquecido a 10% com suplemento Difco® e incubados em estufa bacteriológica a 29°C (SILVA et al., 2008).

2.2. Isolamento e PCR

As culturas positivas foram utilizadas para extração do DNA genômico através de kit comercial (*illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* – GE Healthcare®). A caracterização molecular foi realizada a partir de PCR (SAMBROOK et al., 2013), utilizando como molde o DNA genômico extraído e oligonucleotídeos que amplificam os genes LipL32, LigB e rpoB. LipL32 e LigB são genes presentes apenas em leptospiras patogênicas (SEIXAS et al., 2007), enquanto rpoB é utilizado adicionalmente para a tipificação de leptospiras (RENESTO et al., 2000). Cada reação foi realizada em um volume final de 25 µl, 12,5 µl de mix “PCR Master Mix da Promega”, 9,5 µl de água ultrapura, 1 µl de cada oligonucleotídeo e 1 µl de DNA genômico. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (55°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Após os 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Para avaliação do resultado, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas à eletroforese em cuba horizontal (BioRad) a 120 volts por 30 minutos. O gel foi visualizado sob luz UV utilizando um fotodocumentador para gel de eletroforese “L-PIX loccus”. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (Invitrogen®). As amostras foram armazenadas a -20°C.

2.3. Caracterização da virulência e reisolamento

Paralelamente, as cepas foram testadas em grupos de dois hamsters machos, com 4 semanas de idade, através de desafio intraperitoneal com a inoculação de 10^8 leptospiras (SILVA et al., 2008). Os animais com doença clínica foram eutanasiados e os rins usados para inoculação do meio EMJH semi sólido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os roedores atuam como reservatórios de leptospiras, albergando a bactéria nos túbulos renais antes de excretá-la na urina, contaminando o ambiente (MIRAGLIA et al., 2013). As leptospiras penetram no organismo através de pequenos cortes ou abrasões na mucosa e se disseminam pela corrente sanguínea, atingindo órgãos específicos como fígado, pulmão e rins, onde podem sobreviver por meses (FERNANDES et al., 2016). O animal capturado na residência visitada parecia saudável no momento da captura e foi conduzido até o laboratório do GEDTA da Faculdade de Veterinária (UFPel). Após a eutanásia do animal, os rins foram coletados assepticamente e o macerado destes foi inoculado diretamente em meio de cultura EMJH enriquecido com suplemento comercial. As culturas negativas foram mantidas por um período de 49 dias em estufa bacteriológica a 29°C, enquanto as culturas positivas foram repicadas semanalmente nas mesmas condições.

Uma cepa foi isolada a partir da cultura renal do rato capturado. Todos os hamsters inoculados com as cepas isoladas foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos, evidenciando alterações macroscópicas descritas como típicas da leptospirose experimental, como presença de icterícia nas mucosas, congestão de órgãos e hemorragias petequiais pulmonares, quando submetidos a eutanásia e necropsia (Figura 1). A recuperação da cepa através de cultura renal foi realizada com êxito. A cepa do isolamento original e as reisoladas dos animais testados foram identificadas e congeladas, sendo armazenadas a -70°C em nitrogênio líquido.

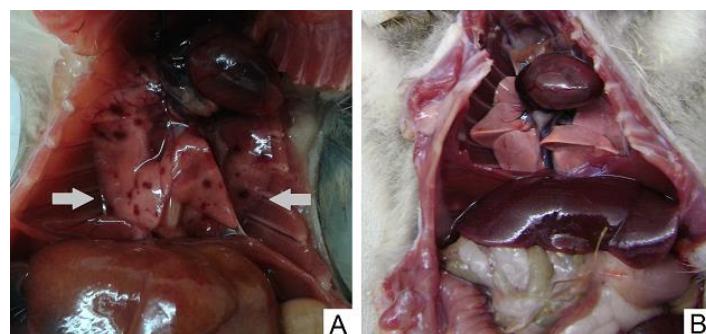


Figura 1. Análise macroscópica dos pulmões, realizada com hamsters inoculados no teste de virulência. (A) Hamster inoculado com a cepa Rato. As setas indicam a presença de hemorragia pulmonar petequial; (B) Hamster não inoculado.

Quando o cultivo da cepa apresentou um crescimento de 10^8 ml^{-1} , foi realizada a extração do DNA genômico e PCR. A amplificação de *lipL32*, *ligB* e *rpoB* (Figura 2) e confirma a patogenicidade da cepa isolada do rato, uma vez que *LipL32* e *LigB* estão presentes apenas em cepas patogênicas. Os amplicons dos três alvos serão submetidos ao sequenciamento de DNA e à completa caracterização molecular.

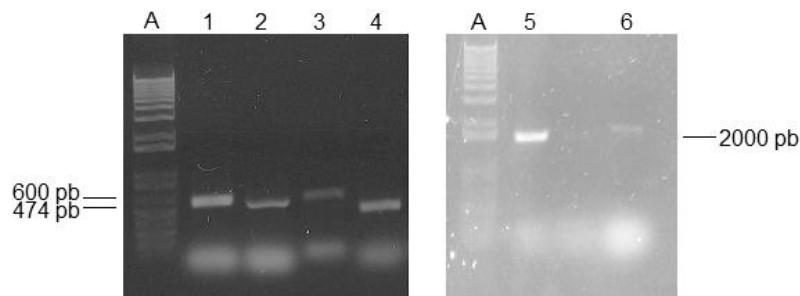


Figura 2. Amplificação dos genes *rpoB*, *LipL32* e *LigB* na cepa Rato e Fiocruz L1-130. (A) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); (1) amplificação de *rpoB* e de (2) *lipl32* na cepa rato; (3) amplificação de *rpoB* e de (4) *lipl32* na cepa Fiocruz L1-130; amplificação de *LigB* na (5) cepa Rato e (6) Fiocruz L1-130.

O isolamento de cepas de *Leptospira* é uma ferramenta essencial para o entendimento da epidemiologia da leptospirose (BOURHY et al., 2010). Neste estudo, foi obtido um isolado a partir da cultura renal de um rato capturado em uma residência do bairro Laranjal em Pelotas/RS. Nossa grupo recentemente realizou a padronização de cepas virulentas em hamsters como modelo animal suscetível a leptospirose, pertencentes às espécies *L. interrogans* e *L. noguchii* (SILVA et al., 2008). A análise patológica realizada durante a necropsia dos hamsters, revelou lesões macroscópicas nos pulmões dos animais infectados semelhantes às lesões encontradas em outros estudos (SILVA et al., 2008), evidenciando a capacidade da cepa isolada em reproduzir experimentalmente a enfermidade. Estas cepas serão utilizadas em experimentos futuros de padronização da dose letal 50%, patogênese e desafio heterólogo de vacinas recombinantes.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, relatamos o isolamento, a caracterização da virulência e uma caracterização molecular preliminar de uma cepa de leptospira isolada durante

uma investigação em uma residência do bairro Laranjal em Pelotas/RS. A cepa patogênica e virulenta será utilizada em experimentos para avaliar a proteção conferida por candidatos recombinantes a uma vacina contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LOVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis.**, v.3, p.757-771, 2003.
- BOURHY, P.; COLLET, L.; CLEMENT, S.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRY, C.; PETTINELLI, F.; PICARDEAU, M. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). **PLoS Negl Trop Dis.**, v.4, e724, 2010.
- FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEIREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. cO. *Leptospira* spp.: novel insights into host-pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.176, p.50-57, 2016.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol.**, v.7, p.736-747, 2009.
- MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; SEIXAS, F. K.; FREITAS, J. C.; HARTSKEERL, R.; MORENO, L. Z.; COSTA, B. L.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira* interrogans serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.77, p.195-199, 2013
- RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLOU, K.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. RpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema* and *Leptospira*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2200-2203, 2000.
- REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D. M.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X. T. O.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.2, e228, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 2013. 3 ed.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n.4, p.472-479, 2007.
- SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ATHANAZIO, D. A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; FAGUNDES, M. Q.; BROD, C. S.; REIS, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A.; KO, A. I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, p.3892-3896, 2008.
- WHO. Leptospirosis: an emerging public health problem. **Wkly Epidemiol Rec.**, v.86, p.45-50, 2011.