



SOROLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira spp* ISOLADA DE GAMBÁS-DE-ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*)

JORGE, S.¹; STARK, C. B.¹; RECUERO, A. L. C.¹; HENTGES, A.¹; MINELLO, L. F.²; SEIXAS, F. K.³; DELLAGOSTIN, O. A.³; FERNANDES, C. P. H.¹; BROD, C. S.¹

¹Faculdade de Veterinária – Centro de Controle de Zoonoses – UFPEL – (53) 3275-7424

²Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre – NURFS/CETAS-UFPEL – (53) 3275-7227

³Centro de Biotecnologia – Laboratório de Biologia Molecular -UFPEL – (53) 3275-7587

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira* ocasionando sério problema em saúde pública (Acha & Szyfres, 1986). A manutenção de *Leptospira* em regiões rurais e urbanas é favorecida pelo clima tropical associado à elevada população de roedores, acúmulo de lixo, excesso de cães errantes e crescimento desordenado dos centros urbanos com aumento das favelas e construções precárias nas periferias, muitas vezes sem nenhum saneamento básico (Ko *et al.*, 1999). É conhecida uma grande variedade de *L. interrogans sensu lato*, demonstradas por seus 223 sorovares classificados por critérios sorológicos (Pereira *et al.*, 2000). Em meados da década de 80, 10 espécies de *Leptospira* isoladas de humanos e animais foram caracterizadas com base nos estudos de hibridização do DNA-DNA e denominadas *L. interrogans sensu stricto*, *L. kirshneri*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. inadai*, *L. fainei* and *L. alexanderi* (Yasuda *et al.*, 1987). Anticorpos anti *Leptospira interrogans* sorovar *balcanica* foram identificados em marsupial silvestre (*Trichosurus vulpecula*), e a transmissão entre indivíduos da mesma espécie parece estar relacionada ao comportamento sexual na estação reprodutiva, tendo sido descrita a baixa patogenicidade para esta espécie (Day *et al.*, 1998). No estado da Califórnia, Estados Unidos, testes sorológicos realizados em ordens distintas de animais silvestres – Carnívora, Rodentia, Lagomorfa e Artiodactyla – identificou anticorpos anti *Leptospira* em 75% das amostras e, em algumas espécies de carnívoros a prevalência foi de 100% (Cirone *et al.*, 1978). O isolamento de *Leptospira* de marsupiais silvestres habitando seu ambiente natural foi realizado no Peru, identificando seis novos sorovares no gênero *Didelphis* e a sugestão da importância destes animais como fontes de infecção para a leptospirose humana e de animais domésticos devido a sua característica sinantrópica (Hidalgo & Sulzer, 1984).

O isolamento de *Leptospira* e sua inclusão no diagnóstico sorológico podem melhorar a sensibilidade do teste de aglutinação microscópica (MAT) devido à variedade antigênica da bactéria (Levett, 2001). O isolamento de *Leptospira* de gambás-de-orelha-branca, a caracterização molecular, sua inclusão no diagnóstico

sorológico e os respectivos resultados são o objeto de estudo desta pesquisa e os resultados parciais estão descritos neste trabalho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Captura dos animais e coleta das amostras

Foram capturados 21 gambás-de-orelha-branca, no campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e arredores utilizando armadilhas de madeira com porta tipo guilhotina (Autorização SISBIO 13755-1). Foram utilizadas como iscas frutas envolvidas em malha metálica. Em caso de captura os animais sofreram contenção física, colocados em caixa de transporte e encaminhados ao Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS/CETAS-UFPel). Outros 11 animais, da mesma espécie, foram recebidos diretamente no NURFS/CETAS-UFPel, trazidos pela polícia ambiental. Todos foram submetidos à contenção física e química e administração de diurético de alça para possibilitar a realização das coletas. As amostras de sangue foram realizadas através de punção cardíaca e as de urina através de cistocentese. Após este procedimento os animais permaneceram em observação até o completo retorno anestésico e, posteriormente, alojados em gaiolas por mais 3 dias, para observação, onde receberam alimentação e água. Após a constatação da ausência de alterações nos sinais vitais e comportamentais, os animais capturados foram soltos no mesmo local de captura e os recebidos no NURFS/CETAS-UFPel foram encaminhados para regiões próximas a sua origem.

2.2 Processamento das amostras/Pesquisa direta de espiroquetas no soro e urina

Imediatamente após as coletas, as amostras foram enviadas ao Centro de Controle de Zoonoses – UFPel, para a realização da pesquisa direta de espiroquetas em soro (BDFM) e urina (UDFM) conforme protocolo diagnóstico (Faine, 1999). As amostras de soro foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para as amostras de urina, primeiramente foram inoculadas 0,5 mL em meio de cultura EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium) enriquecido com 10 % de suplemento Difco®. Para cada amostra utilizou-se 3 tubos com 5 mL cada, de forma que as diluições seriadas atingidas foram 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , respectivamente. As amostras foram incubadas a 30°C e observadas macroscopicamente diariamente e microscopicamente semanalmente. As amostras de urina restantes foram submetidas UDFM. Tanto para as amostras de sangue como de urina, considerou-se positiva a amostra que apresentasse uma ou mais espiroquetas com movimentação e morfologia características.

2.3 Microaglutinação com antígenos vivos (MAT)

Para verificar a presença de aglutininas anti *Leptospira* no soro do o animal cuja amostra de urina originou o isolado, foi realizada técnica de soroaglutinação microscópica (Faine, 1999). A diluição inicial do soro foi de 1: 25 para reação com o isolado obtido, tendo como título final a diluição máxima onde ocorreu a aglutinação de 50% ou mais da *Leptospira* isolada. A maior diluição testada foi de 1:400.

2.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)/Variable-number tandem repeats (VNTR)

A extração do DNA seguiu protocolo recomendado (Sambrook and Russel 2001). A técnica de PCR foi utilizada para identificação do gênero bacteriano, através da amplificação do gene 16S rDNA, e patogenicidade, pela amplificação do gene *lipI32* (Haake et al., 2000). Para caracterização da espécie genômica *L. interrogans* foi utilizada a técnica de análise por PCR do variable-number tandem repeats (VNTR) descrita por Majed, et al, 2005.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 32 amostras de urina inoculadas, somente de uma foi obtido crescimento bacteriano, na diluição 10^{-1} . Novas diluições seriadas foram realizadas até obter-se a cultura pura com densidade de 10^8 bactérias por mL. Mediante este resultado, foi realizado a técnica de PCR, utilizando os primers específicos para o 16S rDNA de *Leptospira*, proteína de membrana externa, LipL32, exclusiva de leptospiros patogênicas (Haake et al., 2000) e VNTR. Houve amplificação do gene 16S rDNA (fig.1), confirmando que a bactéria isolada pertence ao gênero *Leptospira* (Majed, et al, 2005) e amplificação do gene *lipI32* (fig.1) o qual codifica para a lipoproteína presente na membrana externa de *Leptospiras* patogênicas. Portanto, a bactéria isolada a partir da urina de uma gambá-de-orelha-branca trata-se de uma *Leptospira* patogênica. Ao se utilizar a técnica de VNTR, não houve amplificação, portanto, a *Leptospira* isolada não pertence a espécie *L. interrogans*.

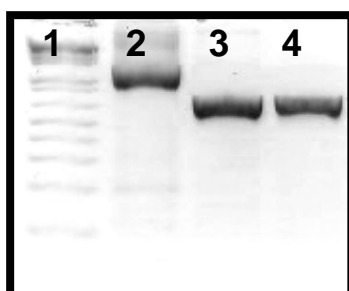


Fig.1 Identificação molecular de *Leptospira* isolada de gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*). 1 – Marcador de Massa molecular (1Kb DNA ladder plus); 2 – Isolado CCZ (16s); 3 – Isolado CCZ (LipL32); 4 – *Leptospira interrogans* Lai (LipL32)

Na técnica sorológica MAT identificou-se o título de 400 na reação do soro do gambá-de-orelha-branca com o novo isolado obtido. Na pesquisa direta, realizada após a coleta do sangue e urina, não foram visualizadas espiroquetas.

4. CONCLUSÃO

O trabalho realizado identificou o gambá-de-orelha-branca como potencial reservatório de *Leptospira* para o homem e animais domésticos. A análise da importância do uso deste sorovar na bateria de antígenos utilizada para diagnóstico de leptospirose humana e animal, através da MAT, encontra-se em andamento.

O seqüenciamento do DNA será empregado para a caracterização molecular definitiva da bactéria.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. *In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2ªed. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**, p. 112-120.1986.

CIRONE, S. M.; RIEMANN, H. P.; RUPPANNER, R.; BEHYMER, D. E., FRANTI, C.E. Evaluation of the hemagglutination test for epidemiologic studies of leptospiral antibodies in wild mammals. **Journal of Wildlife disease**. 1978, v. 14.

DAY, T. D.; O'CONNOR, C. E.; WAAS, J. R.; PEARSON, A. J.; MATTHEWS, L.R. Transmission of *Leptospira interrogans* serovar *Balcanica* infection among socially housed brushtail possums in New Zealand. **Journal of wildlife disease**,1998, 34(3), p. 576-581.

FAINE, S. (1982) Guidelines for the control of leptospirosis. **World Health Organization**, Who Offset Publication, n.67.1982

HAAKE DA, CHAO G, ZUERNER RL, BARNETT JK, BARNETT D, MAZEL M, MATSUNAGA J. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 2000, 68:2276-2285.

HIDALGO, J. L.; SULZER, K. R. Six new leptospiral serovars isolated from wild animals in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**,1984, v.19, n.6, p.944-945.

KO, A.I.; REIS, M.G.; DOURADO, C.M.R.; JOHNSON, W.D.; RILEY, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brasil. **Lancet**, 1999, v. 354 n. 9181, p. 820-825.

LEVETT P.N. BOLIN C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 2000, 68:2276-85.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**,2001,n.14, p.96-326.

MAJED, Z., E. BELLENGER, D. POSTIC, C. POURCEL, G. BARANTON, AND M. PICARDEAU. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005, 43:539-545.

PEREIRA, M. M., MATSUO, M. G.; BAUAB, A. R.; VASCONCELOS, S.A.; MORAES, Z. M.; BARANTON, G.; SAINT GIRON, I. A Clonal subpopulation of *Leptospira interrogans Sensu Stricto* Is the Major Cause of Leptospirosis Outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, 2000, p. 450-452.

SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D.W. Molecular cloning. Cold Spring Harbor **Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**. 2001