

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 (Keim, 2000). O objetivo do presente trabalho foi utilizar 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.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de leptospiras isoladas no Brasil de diferentes espécies animais (suínos, caninos e ratos), foram crescidas a 30 °C em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco Laboratories, USA) enriquecido com 8% de albumina bovina. A cultura foi centrifugada a 10.000 × g, ressuspensa em solução salina 1% e fervida por 10 min para ser utilizada como DNA molde para a reação de PCR. Estas culturas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Silvio Arruda Vasconcelos da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP. Os *primers* utilizados na PCR foram descritos anteriormente por Majed et al (2005). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, com 8 pmol do *primer* R e do *primer* M13(-21) marcado com o fluoróforo HEX (hexachloro-6-carboxy-fluorescine) e 2 pmol do *primer* F, contendo 50 ng de DNA genômico, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM e 10% de tampão 10x. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94 °C, 5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), anelamento (56 °C, 45 s) e extensão (72 °C, 45 s), seguidos por 8 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 45 s e 72 °C por 45 s e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min (Schuelke, 2000). Após, foi feita uma mistura de 2 µL da reação de PCR diluída 1:10, 0,25 µL do marcador ET-ROX 900, 7,75 µL de Tween 20 0,1% e submetidos à eletroforese capilar em um seqüenciador MegaBACE 500 e os resultados analisados no software MegaBACE Genetic Profiler.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 16 isolados de *Leptospira* sp. pela técnica de VNTR. Para isso, foram utilizados 3 marcadores, suficientes para a diferenciação dos isolados em nível de sorovar.

A figura 1 representa o resultado obtido através da análise com o programa MegaBACE genetic profiler, indicando o número em pares de base do produto de PCR através de um pico. Os isolados 2, 3, 7-16 apresentaram picos de aproximadamente 673 pb para o VNTR7, 300 pb para o VNTR10 e 656 pb para o VNTR19, correspondendo respectivamente a 10, 3 e 10 repetições. Por comparação com uma relação de sorovares e seus respectivos números de repetições para cada VNTR já disponível na literatura, foi possível concluir que estes isolados são do sorovar canicola. Já os isolados 1, 4-6 apresentaram bandas de aproximadamente 233 pb para o VNTR7, 480 pb para o VNTR10 e 254 pb para o VNTR19, correspondendo a 1, 7 e 2 repetições respectivamente, o que permitiu concluir que são do sorovar Icterohaemorrhagiae (Tabela 1).

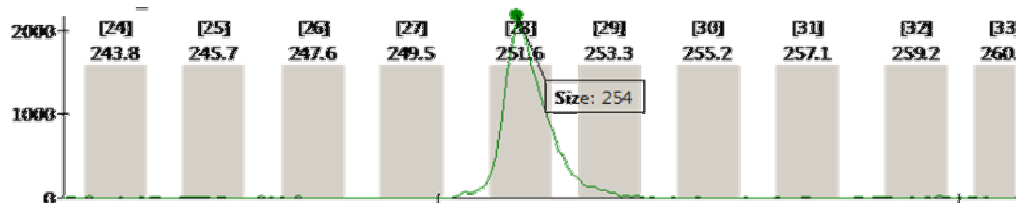


Figura 1. Gráfico representativo do perfil encontrado na eletroforese capilar com o primer VNTR 19 com a amostra 5.

TABELA 1. Isolados de *Leptospira* obtidos em diferentes locais segundo espécie animal de origem e resultado do procedimento de tipificação por VNTR.

Nº ordem	Origem do isolado	VNTR7	VNTR10	VNTR19	Tipificação VNTR (sorovar)
1	Canino - (M5/90)	1	7	2	Icterohaemorrhagiae
2	Canino - (M12/90)	10	3	10	Canicola
3	Canino - (M5/91)	10	3	10	Canicola
4	Humano - (M21/96)	1	7	2	Icterohaemorrhagiae
5	Rato - (M9/05)	1	7	2	Icterohaemorrhagiae
6	Rato - (M11/99)	1	7	2	Icterohaemorrhagiae
7	Rato - (M10/99)	10	3	10	Canicola
8	Canino - (LO1)	10	3	10	Canicola
9	Canino - (LO2)	10	3	10	Canicola
10	Canino - (LO5)	10	3	10	Canicola
11	Canino - (LO6)	10	3	10	Canicola
12	Canino - (LO8)	10	3	10	Canicola
13	Canino - (LO11)	10	3	10	Canicola
14	Canino - (LO12)	10	3	10	Canicola
15	Suíno - (L03)	10	3	10	Canicola
16	Suíno - (L04)	10	3	10	Canicola

Existem muitas dificuldades associadas à identificação sorológica de cepas de *Leptospira*. Por esta razão buscaram-se técnicas moleculares que apresentem o mesmo poder de diferenciação que é obtida por técnicas imunológicas. A técnica de PFGE, tem um alto poder discriminatório, porém requer uma grande quantidade de DNA e é bastante trabalhosa para ser executada. A análise de VNTR por sua vez, é uma técnica simples e rápida de ser realizada, e quando combinada com a eletroforese capilar, aumenta ainda mais seu poder discriminatório, sua rapidez e diminui seu custo. No nosso estudo, os 16 isolados de *L. interrogans*, obtidos a partir de amostras clínicas de humanos, suínos, caninos e ratos, puderam ser adequadamente caracterizados em nível de sorovar pela análise de VNTR, através da comparação dos resultados obtidos quanto ao número de repetição em cada locus com os dados disponíveis na literatura (Majed et al., 2005). Os resultados também mostraram que a técnica de eletroforese capilar permite uma análise precisa do tamanho dos amplicons, e com isso demonstra uma vantagem em relação à técnica de eletroforese em gel de agarose, onde não é possível medir o tamanho exato dos amplicons visualmente. Esta é a primeira descrição da utilização de eletroforese capilar para a determinação do tamanho dos amplicons resultantes da amplificação de VNTR de *L. interrogans*.

4. CONCLUSÕES

A utilização de três marcadores permitiu a caracterização das amostras em nível de sorovar, demonstrando que a técnica de VNTR é uma ferramenta poderosa na caracterização de isolados de *L. interrogans*. A eletroforese capilar possibilita a determinação precisa do tamanho do fragmento amplificado, e conseqüentemente do

número de VNTRs. Dos 16 isolados analisados, 4 foram caracterizados como pertencentes ao sorovar Icterohaemorrhagiae e 12 ao sorovar Canicola.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICARDI, J.N., MATTHIAS, M.A., DIAZ, M.M., LOVETT, M.A., LEVETT, P.N., GILMAN, R.H., WILLIG, M.R., GOTUZZO, E., VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Diseases**, 2003, V. 3, p. 757-771.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, 1999, V. 27, p. 573-580.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, 2^o Edition. 1999. 271 p.
- HERRMANN, J.L., BELLENGER, E., PEROLAT, P., BARANTON, G., SAINT GIRONS, I. Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. **Journal of Clinical Microbiology**, 1992, V.30, p.1696-1702.
- KEIM, P., PRICE, L.B., KLEVYTSKA, A.M., SMITH, K.L., SCHUPP, J.M., OKINAKA, R., JACKSON, P.J., HUGH-JONES, M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, 2000, V. 182, p. 2928-2936.
- LEVETT, P.N.. Leptospirosis, **Clinical Microbiology Reviews**, 2001, V. 14, p. 296-326.
- MAJED, Z., BELLENGER, E., POSTIC, D., POURCEL, C., BARANTON, G., PICARDEAU, M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005, V. 43, p. 539-545
- RAMADASS, P., MEERARANI, S., VENKATESHA, M.D., SENTHILKUMAR, A., NACHIMUTHU, K. Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1997, V. 47, p. 575-576.
- RAMISSE V., HOUSSU P., HERNANDEZ E., DENOEUDE F., HILAIRE V., LISANTI O., RAMISSE F., CAVALLO J.D., VERGNAUD G.. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. **Journal of Clinical Microbiology**, 2004, V. 42, p. 5722-5730.
- ROY, S., BISWAS, D., VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, A.P., SEHGAL, S.C. A 22-mer primer enhances discriminatory power of AP-PCR fingerprinting technique in characterization of leptospires. **Tropical Medicine & International Health**, 2004, V. 9, p.1203-1209.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature**, 2000, V.18, p. 233-234
- VIJAYACHARI, P., AHMED, N., SUGUNAN, A.P., GHOSUNNISSA, S., RAO, K.R., HASNAIN, S.E., SEHGAL, S.C. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. **Journal of Clinical Microbiology**, 2004, V. 42, p. 3575-3580.