

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



SEQUENCIAMENTO DO GENE *rpoB* PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Leptospira* spp.

FAGUNDES, Michel Quevedo¹; SEIXAS, Fabiana Kommling¹; SEIXAS NETO, Amilton Clair¹; DINIZ, Juliana Alcoforado¹; SILVA, Éverton Fagonde¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – UFPel;
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. michelquevedofagundes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leptospira* compreende um grupo de organismos extremamente variáveis, contendo centenas de sorovares e genótipos, os quais podem ocupar diversos ambientes, habitats e ciclos de vida. Algumas espécies deste gênero causam a leptospirose, uma doença caracterizada por sintomas tais como febre, mialgia, dores de cabeça e hemorragias internas, além de complicações renais e pulmonares. Muitos animais domesticados e selvagens servem como reservatório natural para estas bactérias e as eliminam no ambiente através da urina. Infecções humanas resultam do contato com solo ou água contaminada com urina de animais infectados (Levett, 2001). Investigações epidemiológicas deste organismo são importantes para distinguir casos individuais de casos relacionados a situações de surtos. Também é de grande importância determinar qual animal é a fonte de contágio, para conter ou prevenir a transmissão da doença (Faine et al, 1999). O gênero *Leptospira* contém 19 espécies (Bharti, 2003; Cerqueira & Picardeau, 2009). Estas espécies são ainda classificadas em sorogrupos e sorovares com base em reatividade antigênica (Levett, 2001). Métodos de tipagem molecular têm sido descritos para *Leptospira*, incluindo RAPD (Ramadass, 1997), PFGE (Herrmann, 1992), AP-PCR (Roy, 2004) e FAFLP (Vijayachari, 2004). Cada um destes métodos tem suas desvantagens, como poder discriminatório insuficiente, baixa reprodutibilidade entre laboratórios e dificuldades com os bancos de dados e disseminação de dados (Ramise, 2004), além de requerem equipamentos especializados.

A necessidade de uma caracterização rápida deste agente infeccioso tem estimulado o desenvolvimento de novos testes biológicos. Destes, a PCR aliada ao seqüenciamento de DNA são as técnicas de melhor desempenho para a detecção e identificação rápida dos genes microbianos. Resultados obtidos da comparação de seqüências do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S, o qual é largamente utilizado para identificação de patógenos, são insatisfatórios, devido ao poder discriminatório desta região ser limitado, em razão da ausência de um alto grau de polimorfismo deste gene. Dentre outros marcadores, uma região de 600 pb do gene

que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) foi utilizado para a caracterização de diversas espécies de *Archae* e *Proteobacteria* (Mollet, 1997) e recentemente para identificação de espécies do gênero *Borrelia*, *Treponema* e *Leptospira* (Renesto, 2000; La Scola, 2006). Esta região se mostrou altamente discriminatória dentre as espécies de *Leptospira* testadas, podendo ser utilizado como um marcador rotineiro para identificação de espécies de *Leptospira*. O objetivo do presente trabalho foi utilizar a metodologia combinada de PCR e seqüenciamento de DNA utilizando o gene *rpoB* como marcador para a tipagem molecular de isolados de *Leptospira*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Oito isolados de diferentes espécies animais [bovinos (1), suínos (2), ratos (2), caninos (1), e capivaras (2)], gentilmente cedidas pelo Dr. Silvio Arruda Vasconcelos da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP, foram cultivados 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 $\times g$, ressuspensa em solução salina 1% e fervida por 10 min para ser utilizada como DNA molde para a reação de PCR. Os *primers* utilizados na PCR foram descritos anteriormente por La Scola (2006). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L, com 4 pmol do *primer rpoB* R e 4 pmol do *primer rpoB* F, contendo 50 ng de DNA genômico, 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen), $MgCl_2$ 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) e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% para a confirmação do tamanho esperado. Após, o produto da PCR foi purificado com polietilenoglicol (PEG) e foi realizada a reação de seqüenciamento de DNA das amostras em triplicata no sequenciador MegaBace 1000 e análise das seqüências geradas nos programas Vector NTI 10.0 e BLASTn.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados oito isolados de *Leptospira* spp. pela técnica de seqüenciamento do gene *rpoB*. A Figura 1 mostra o gel de agarose da PCR, indicando que todas as amostras amplificaram uma banda de 600 pb, confirmando o tamanho esperado.

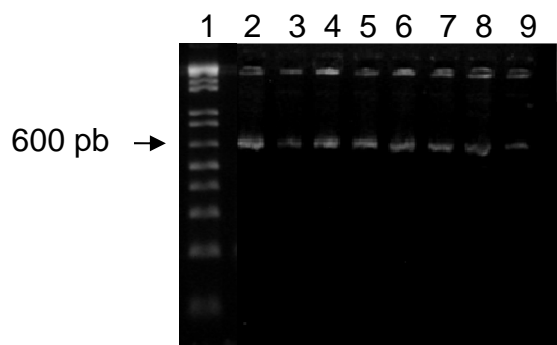


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR com o *rpoB*; 1- Marcador Molecular 100 pb Ladder (Invitrogen); 2- Isolado de Bovino; 3- Isolado de Suíno I; 4- Isolado de Suíno II; 5- Isolado

de Rato I; 6 - Isolado de Rato II; 7- Isolado de Cão; 8- Isolado de Capivara I; 9- Isolado de Capivara II.

Após, as amostras foram purificadas com PEG e submetidas à reação de seqüenciamento de DNA. Todas as amostras foram seqüenciadas, gerando sequências que foram editadas manualmente no programa Vector NTI 10.0. Em seguida, as seqüências foram submetidas ao programa BLAST para comparação com o banco de dados do GenBank. Todas as amostras foram caracterizadas e a tabela 1 mostra os resultados gerados pelo BLAST. A similaridade de seqüências no fragmento de 600 pb entre as espécies identificadas variou entre 97 e 99%.

Tabela 1: Resultados gerados pelo BLASTn das sequências do gene *rpoB* dos isolados.

Isolado	Caracterização	Cobertura	Identidade
Bovino	<i>L. inadai</i>	100%	97%
Suíno	<i>L. borgpetersenii</i>	99%	99%
Suíno	<i>L. borgpetersenii</i>	100%	99%
Rato	<i>L. borgpetersenii</i>	100%	99%
Rato	<i>L. borgpetersenii</i>	100%	99%
Cão	<i>L. borgpetersenii</i>	99%	99%
Capivara	<i>L. santarosai</i>	100%	98%
Capivara	<i>L. santarosai</i>	100%	98%

Os isolados obtidos de suínos, caninos e ratos apresentaram similaridade de 99% com a espécie *L. borgpetersenii*, os isolados obtidos de capivaras foram classificadas com *L. santarosai* (98%), a única amostra de bovino apresentou seqüência com alta identidade (97% com *L. inadai*). Como no caso do gene ribossomal 16S, um único par de *primers* foi suficiente para amplificação da região parcial do *rpoB*. Entretanto, este demonstrou vantagens em relação ao gene ribossomal 16S. O fragmento de 600 pb do gene *rpoB* pôde ser amplificado e seqüenciado em apenas uma reação de seqüenciamento e com os mesmos *primers* utilizados na amplificação por PCR, enquanto que o gene 16S necessita de seis diferentes *primers* e seis reações de seqüenciamento para uma caracterização precisa (Ref). Além disso, o gene *rpoB* apresenta um grau de polimorfismo mais alto quando comparado ao 16S, tornando-o mais útil para a identificação de espécies de *Leptospira*.

4. CONCLUSÕES

Estes resultados mostram a grande diversidade de espécies de leptospiros encontradas no Brasil e a diversidade de reservatórios disponíveis para estas espécies. O gene *rpoB* demonstra ser um marcador molecular robusto e de fácil aplicabilidade, útil para uma identificação inicial de amostras clínicas, ambientais e estudos epidemiológicos.

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.

CERQUEIRAM G. M., PICARDEAU, M. A Century of *Leptospira* strain Typing. **Infection, Genetics and Evolution**, 2009, V. 9, p. 760-768.

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.

LA SCOLA, B., BUI, L.T.M.,BARANTON, G., KAMIS, A., RAOULT, D. Parcial *rpoB* gene sequencig for identification of *Leptospira* species. **FEMS Microbiology Letters**, 2006, V. 263, p. 142-147.

LEVETT, P.N.. Leptospirosis, **Clinical Microbiology Reviews**, 2001, V. 14, p. 296-326.

MOLLET, C., DRANCOURT, M., RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**, 1997, V. 26, p. 1005-1011.

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.

RENESTO, P., LORVELLEC-GUILLON, 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**, 2000, V. 38, p. 2200-2203.

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 leptospire. **Tropical Medicine & International Health**, 2004, V. 9, p.1203-1209.

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.