

## ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS EM RINS DE BOVINOS ABATIDOS EM UM FRIGORÍFICO DE PELOTAS/RS

**SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto<sup>1</sup>; FERRO, Ariana Gayer<sup>1</sup>; DINIZ, Juliana Alcoforado<sup>2</sup>; CEZARINI, Cléber Clos<sup>3</sup>, DELLAGOSTIN, Odir Antônio<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária – UFPel; <sup>2</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel; <sup>3</sup>Coordenação de Inspeção de Produtos de Origem Animal-RS

**SILVA, Éverton Fagonde<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária – UFPel; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - UFPel

### 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade de distribuição mundial, causada por bactérias do gênero *Leptospira* (WHO, 2003). A enfermidade é considerada atualmente como uma das doenças tropicais emergentes negligenciadas (HOTEZ et al., 2006). A doença é classificada como uma antropozoonose direta, onde o agente causal é transmitido ao hospedeiro suscetível através do contato direto com a urina que contenha leptospiros viáveis, ou indireto através do contato com solo, água, alimentos ou utensílios contaminados (FAINE et al., 1999).

Para a agropecuária, a enfermidade causa grande impacto econômico, com altos índices de abortos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite. Esses problemas resultam em graves prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países acometidos, pois causam transtornos produtivos e reprodutivos (ELLIS, 1994).

Dados oficiais referentes à ocorrência da enfermidade em animais no Brasil ainda são escassos, sendo que a prevalência sorológica em animais é estimada em torno de 35%, com mais de 80% das propriedades rurais apresentando casos da doença. Além disso, estima-se que 5 a 10% dos trabalhadores de frigoríficos possuam anticorpos contra sorovares leptospirais, confirmando a importante relação ocupacional de veterinários, magarefes e produtores rurais com a enfermidade (FAVERO et al., 2001).

O isolamento de leptospiros de humanos e animais no Brasil vem sendo descrito desde o início do século passado. Em Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, houve relato nos últimos dez anos o isolamento de mais de uma dezena de cepas, oriundas principalmente de humanos, caninos e roedores sinantrópicos. Com estes isolamentos, pode-se evidenciar uma ampla variedade de espécies e sorogrupos que circulam na região sul do Rio Grande do Sul do estado e que podem causar desde quadros clínicos leves e inaparentes até casos que culminam com a morte do paciente.

Além disso, nossos estudos proporcionaram o relato do primeiro isolamento de *L. noguchii* em ovinos no mundo (SILVA et al., 2007). Esta espécie foi descrita posteriormente, como uma importante causa da leptospirose em humanos e animais em nossa região, sendo empregada em estudos de genômica e da patogênese da enfermidade. Por outro lado, ainda existe a necessidade de estudos e investigações na área animal da magnitude dos realizados para a

leptospirose humana, principalmente em animais produtores de carne e derivados.

Esse trabalho teve como objetivo isolar leptospiras de rins de bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas, RS, como também identificar o isolado através de métodos moleculares e patológicos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a coleta de amostras, três frigoríficos da cidade de Pelotas foram escolhidos para a execução do presente estudo. Os critérios para a escolha dos estabelecimentos foram baseados na localização e na rotina de abate. Na tentativa de isolamento, 20 rins foram coletados aleatoriamente na linha de abate, após a inspeção realizada pelo médico veterinário responsável. Mediante a limpeza do órgão, foi retirado um fragmento de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup> e o mesmo foi acondicionado em um recipiente plástico estéril, identificado e acondicionado em uma caixa térmica apropriada para o transporte.

O meio de cultura utilizado no estudo foi o meio EMJH (Difco), amplamente utilizado para o cultivo de leptospiras, na apresentação líquida e semi-sólida. Ambos os meios foram suplementados com 10% do volume total de soro de coelho. Para o uso, foi distribuída a quantidade de 5 mL em tubos para centrifuga de 15 mL, onde o meio suplementado foi submetido a prova de esterilidade durante 24 horas.

No final do procedimento de coleta, o material foi transportado imediatamente ao laboratório de biologia molecular do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) onde foi processado. Dentro de uma cabine de fluxo laminar, os fragmentos do tecido renal foram removidos assepticamente e colocados dentro de uma seringa de 5 mL estéril para a realização do macerado do tecido, por pressão, diretamente dentro do tubo com 5 mL de meio de cultura líquido. Após, o tubo foi homogeneizado gentilmente e deixado por 1 a 2 horas em repouso no escuro para a formação do sedimento. Decorrido esse período, foi realizado um repique de 0,5 mL do líquido próximo da superfície para um tubo com 5 mL de meio de cultura semi-sólido. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 29°C e verificados semanalmente, macro e microscopicamente, durante sete semanas.

Para identificação molecular preliminar, realizou-se a extração do DNA genômico com o *kit illustra bacteria genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare). Após a obtenção do DNA genômico, realizou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que amplificam o antígeno de membrana *LipL32* (SEIXAS et al., 2007), presente apenas em leptospiras patogênicas. Para o teste de virulência, procedeu-se a inoculação, através da via Intraperitoneal, do volume de 1 mL do cultivo em dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), avaliando-se os sinais clínicos e patológicos encontrados no teste.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado, obteve-se um isolado de *Leptospira* a partir do rim de um bovino abatido em um frigorífico de Pelotas-RS, sendo denominado de Bov 3. De

acordo com a documentação disponível no frigorífico, o animal era procedente de um lote de uma propriedade do município do Capão do Leão.

Quando o cultivo apresentou um crescimento de  $10^8$ .mL<sup>-1</sup>, foram procedidos os repiques para meio líquido e semi-sólido, bem como a extração de DNA genômico e a PCR. A amplificação de *lipL32* e a extração do DNA genômico estão na Figura 1.



Figura 1. DNA genômico e a amplificação do gene LipL32 da cepa Bov 3. Onde (1) marcador de peso molecular 1 kB; (2,3) gene LipL32; (4) DNA genômico do isolado.

O resultado do teste de virulência revelou que a cepa foi capaz de reproduzir experimentalmente os achados clínicos da leptospirose, como prostração, isolamento, perda de peso e óbito. Além disso, as lesões macroscópicas encontradas revelaram alterações típicas encontradas na leptospirose humana e animal, como a hemorragia pulmonar (Figura 2).



Figura 2. Hemorragia pulmonar em um animal inoculado com a cepa Bov 3. As setas indicam petéquias distribuídas pelos pulmões.

O isolamento de uma cepa de *Leptospira* de um bovino em Pelotas-RS representa uma nova era no estudo da leptospirose bovina em nossa região. Além disso, a cepa é patogênica e virulenta para o hamster, um modelo experimental padronizado por (pelo nosso grupo de estudos (SILVA et al., 2008).

#### 4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a cepa Bov 3 é uma *Leptospira* patogênica, devido a amplificação do gene LipL32. Além disso, a cepa é virulenta para hamster, um modelo animal suscetível a leptospirose. Estudos posteriores serão realizados para a completa caracterização molecular do isolado e para a utilização da cepa em estudos que visam produzir e testar uma vacina contra a leptospirose bovina.

## 5 REFERÊNCIAS

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n.3, p.463-478, 1994.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, Australia, 272p.1999.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose Bovina – Variantes Sorológicas Predominantes em Colheitas Efetuadas no Período de 1984 a 1997 em Rebanhos de 21 Estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.29-35, 2001.

HOTEZ, P.; OTTESEN, E.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.582, p.23-33, 2006.

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, É.F.; BROD, C.S.; CERQUEIRA, G.M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.144-149, 2007.

SILVA, É.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, n.31, p. 3892-3896. 2008.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2003.