

CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE UM ISOLADO DE *Leptospira interrogans* OBTIDO DO AMBIENTE

FORSTER, Karine Maciel¹; HARTWIG, Daiane Drawanz¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; JORGE, Sérgio¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – CDTec – UFPel

²Laboratório de Genômica funcional – Centro de Biotecnologia – CDTec – UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

kmacielforster@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. É uma doença de significativo impacto em saúde pública em países subdesenvolvidos e se enquadra como ocupacional em países desenvolvidos (Lau et al., 2010). Os roedores são considerados os principais hospedeiros reservatórios, porém muitos animais silvestres e a maioria dos mamíferos domésticos podem ser responsáveis pela transmissão aos humanos (Bharti et al., 2003). A exposição de mucosas, de pele lesionada ou até mesmo íntegra ao solo ou água contaminada com urina de animais, pode levar a uma infecção potencialmente fatal, caracterizada por náuseas, falência renal e ou hemorragia pulmonar (Haak & Pinne, 2009).

As leptospiras são bactérias consideravelmente resistentes. Entretanto, elas morrem rapidamente pela desidratação e pelo contato com alguns desinfetantes químicos. Além disso, são sensíveis ao pH ácido, sendo destruídas pelo suco gástrico em 30 minutos. São inibidas em pH abaixo de 6,0 e acima de 8,0 e temperatura abaixo de 10 °C ou acima de 36 °C (Faine, 1999). Com base nessas características e nas constantes alterações sofridas pelo ambiente (temperatura, umidade, pH) o isolamento dessa bactéria a partir de amostras do solo ou da água é difícil (Lau, et al., 2010).

O isolamento e a caracterização de novas cepas patogênicas de *Leptospira* são importantes para o desenvolvimento de vacinas e no aprimoramento do diagnóstico da doença. O CAAT (*cross agglutination absorption test*) é o teste padrão ouro para caracterização de leptospiras, mesmo sendo um teste pouco específico e que pode demandar meses para obtenção dos resultados (Cachay & Vinetz, 2005). Atualmente, técnicas moleculares têm se destacado como alternativa mais rápida e eficaz para caracterização de novas cepas de *Leptospira*, dentre elas estão a análise da variação do número de repetições em *tandem* (VNTR) (Majed et al., 2005) e o sequenciamento de alguns genes específicos da bactéria. Esses métodos permitem uma maior precisão na determinação das fontes de transmissão e têm demonstrado ser eficientes (Turk et al., 2003).

O presente estudo teve como objetivo a caracterização da virulência de um isolado de *Leptospira interrogans*, obtido a partir de uma amostra de água, através da determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀). Também foi realizada a caracterização molecular, através do sequenciamento do gene *rpoB* dessa cepa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura bacteriana, extração e purificação de DNA

O isolado, obtido de amostra de água de uma piscina abandonada (Lopes et al., 2009), foi crescido a 30 °C em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco Laboratories, USA) enriquecido a 10% com *Leptospira* enrichment Difco®. A cultura foi inativada em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos, alíquotada em microtubos de 1 mL e as células coletadas por centrifugação a 13000 x *g* por 5 minutos. O DNA das células foi extraído utilizando Illustra Bacteria GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. O gene *rpoB* foi amplificado por PCR (Renesto, et al., 2000). A purificação do produto de PCR foi feita com o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), também segundo instruções do fabricante, e as amostras armazenadas a -20 °C.

2.2. Sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o equipamento MegaBACE (Amershan Biosciences). Foi utilizado o programa Basic Local Alignment Search Tool, ou BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparar a sequência obtida com as sequências depositadas no GenBank.

2.3. Desenho experimental da Dose Letal 50% (DL₅₀)

Foram utilizados 40 hamsters Golden Syrian (20 machos e 20 fêmeas) com nove semanas de idade. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com diluições seriadas (10⁴ até 10⁰), em um volume final de 1 mL e monitorados diariamente até 30 dias após a infecção. A DL₅₀ foi calculada pelo método Reed and Muench (1938).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A sequência do gene *rpoB* obtida do isolado mostrou 100% de identidade tanto com *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* como com *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae*, ficando então a cepa caracterizada como sendo da espécie *Leptospira interrogans* pertencente ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* e ao sorovar *Icterohaemorrhagiae* ou *Copenhageni*, cepa FORSTER/CDTec (homenagem ao pesquisador responsável pelo isolamento e ao centro que apoiou a pesquisa). O resultado do sequenciamento confirmou a prévia caracterização (Lopes et al., 2009) do isolado pela técnica de VNTR.

O desenho experimental da DL₅₀ reafirmou os resultados obtidos no sequenciamento previamente descritos, porém agora *in vivo*. Esta cepa induziu doença, levando os animais a óbito com um inóculo contendo menos de 22 células de leptospira. O método Reed and Muench (1938) foi utilizado para calcular DL₅₀ e mostrou que a cepa teve uma DL₅₀ de 21,5 leptospiras em fêmeas. Entretanto, esse método foi incapaz de mensurar um número para DL₅₀

em machos, pois mesmo na menor diluição (1 leptospira) houve óbito de 50% dos animais (Tabela 1).

Tabela 1. Letalidade dos hamsters quando infectados com diluições seriadas do isolado.

Inóculo	Fêmeas	Dias das Mortes	Letalidade (%)	Machos	Dia das mortes	Letalidade (%)
10000	4/4	11,11,12,12	100	4/4	11,11,12,12	100
1000	4/4	11,12,12,14	100	4/4	11,11,12,14	100
100	4/4	11,12,14,14	100	4/4	11,12,13,14	100
10	4/4	12,14,20,20	100	4/4	11,11,20,20	100
1	4/1	13	25	4/2	11,22	50

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no sequenciamento pôde-se concluir que a cepa bacteriana isolada da amostra de água é uma cepa patogênica de *Leptospira*, caracterizada como *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar *Icterohaemorrhagiae* ou *Copenhageni*. Além disso, os valores obtidos na DL₅₀ comprovam que a cepa é altamente virulenta, podendo vir a ser utilizada em ensaios de desafio homólogo ou heterólogo, realizados na avaliação de novas vacinas.

5. REFERÊNCIAS

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 Infectious Disease**. v. 3, p. 757 - 771, 2003.

CACHAY, E. R., VINETZ, J. M. A Global Research Agenda for Leptospirosis. **J. Postgrad Med**. v. 51, n. 3, p. 174 - 178, 2005.

FAINE, S; ADLER, B; BOLIN, C; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne, 2º Edition. 1999. 271.

HAAKE, D. A., PINNE, M. A Comprehensive Approach to Identification of Surface-Exposed, Outer Membrane-Spanning Proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**. v. 4, n. 6, p. 60 - 71, 2009.

LAU, C., SMYTHE, L., WEINSTEIN, P. Leptospirosis: An emerging disease in travelers. **Travel Medicine**. v. 8, p. 33 - 39, 2010.

LOPES, Fernando Alves; FORSTER, Karine Maciel; CORTÉS, Santiago Davi; RIZZI, Caroline; HARTWIG, Daiane; SEIXAS, Amilton; RECUERO, Ana Lúcia Coelho; HARTLEBEN, Cláudia Pinho; SEIXAS, Fabiana Kömmling; DELLAGOSTIN, Odir Antônio. Isolamento de *Leptospira* a partir de água coletada em uma piscina abandonada. In: **XX CIC, XI ENPOS E I MOSTRA CIENTÍFICA**, Pelotas, 2009.

MAJED, Z; BELLENGER, E; POSTIC, D; POURCEL, C; BARANTON, G; PICARDEAU, M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. **J. of Clinical Microbiology.** v. 43, p. 539 - 545. 2005.

REED, L. J., MUENCH, H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. **Am J Hyg.** v. 27, p. 494 - 97, 1938.

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*. **J. of Clinical Microbiology.** v. 38, n. 6, p. 2200 – 2203. 2000.

TURK, N., Z. MILAS, J. MARGALETIC, V. STARESINA, A. SLAVICA, N. RIQUELME- SERTOUR, E. BELLENGER, G. BARANTON, D. POSTIC. Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. **Epidemiol. Infect.** v. 130, p. 159 - 166, 2003.