

LEPTOSPIROSE BOVINA: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E GENOTÍPICA DE CEPAS ISOLADAS EM FRIGORÍFICOS DE PELotas/RS

SCHIAVI, Nathieli Beltran¹; COLONETTI, Karina¹; SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto¹; CEZARINI, Cléber Clos²; SILVA, Éverton Fagonde³

¹Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Biotecnologia (CDTec); ²Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal (CISPOA/RS); ³Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Veterinária Preventiva. efsilva@ufpel.edu.br.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global (BARTHI et al., 2003). A doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, as quais são disseminadas no ambiente através da urina contaminada de animais infectados. Atualmente, a leptospirose alcança o elevado número de 500.000 casos por ano em nível mundial, com uma letalidade de 10% nos casos graves (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). No Brasil, mais de 12.000 casos da leptospirose humana são notificados anualmente, principalmente durante as epidemias nas grandes cidades do país, acarretando um custo consideravelmente elevado para o sistema de saúde com as internações e os tratamentos (GOUVEIA et al., 2008).

A leptospirose bovina resulta em graves prejuízos para os produtores rurais, e conseqüentemente, para a economia dos países acometidos. A doença que normalmente manifesta-se na forma crônica assintomática, apresenta elevados índices de abortos e animais natimortos, infertilidade de machos e fêmeas, e a redução na produção de leite. Além do importante impacto econômico, a doença nos bovinos é considerada como um fator de risco ocupacional para veterinários, magarefes e produtores rurais (FAINE et al., 1999).

Neste contexto, o isolamento de cepas do ecossistema local e a sua inclusão nos painéis de antígenos empregados no MAT, bem como a sua utilização para o desenvolvimento de vacinas autóctones, é de fundamental importância para o diagnóstico, epidemiologia e controle da enfermidade em nossa região e no Brasil. Além disso, o isolamento de cepas de bovinos em abatedouros demonstra o risco para a transmissão da leptospirose nas fazendas, nos abatedouros localizados no sul do Brasil e para animais e humanos suscetíveis. Dessa forma, o presente trabalho visou o isolamento e caracterização de cepas de bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas, RS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras, Cultivo bacteriano e Extração de DNA. Para a execução do projeto, 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, na rotina de abate e pela disponibilidade do serviço de inspeção durante as coletas. Para a tentativa de isolamento, rins foram coletados aleatoriamente na linha de abate, após a inspeção realizada pelo médico veterinário responsável. Após a limpeza e inspeção do órgão foi realizada a remoção de um fragmento de um dos lóbulos do rim, com aproximadamente 9cm³, o qual foi colocado em um recipiente plástico estéril, identificado e acondicionado em uma

caixa térmica apropriada para o transporte. Os isolados foram cultivados em meio EMJH semi sólido, enriquecido a 10% com suplemento Difco®, e incubados em estufa bacteriológica a 29°C (SILVA et al., 2008). Para identificação molecular, realizou-se a extração do DNA genômico com o *kit illustra bacteria genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare).

2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Três PCR foram realizadas. Uma com a finalidade de amplificar um fragmento de 474pb do gene da lipoproteína LipL32, o qual está presente apenas em leptospiros patogênicas. Outra para amplificar um fragmento de 1802pb do gene LigA (*Leptospiral Immunoglobulin-Like A*) a qual está presente apenas em leptospiros patogênicas e nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*. Outra PCR foi realizada para a amplificação do gene 16S RNA, o qual é amplamente utilizado na tipificação de leptospiros. Todos os *primers* foram construídos e analisados mediante o uso do software *Vector NTI 8.0* (Invitrogen). 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.

2.3. Sequenciamento do gene 16S RNA. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o equipamento MegaBACE (Amershan Biosciences). O programa *Basic Local Alignment Search Tool* ou BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado para comparar as sequências obtidas em nosso estudo com as sequências depositadas no GenBank.

2.4. Teste de virulência. Grupos de dois hamsters machos, com 4 semanas de idade foram inoculados com 1mL (10^8 leptospiros) de cada uma das cepas, através da via intraperitoneal (IP). Após a infecção, todos os animais foram mantidos em microisoladores, sendo alojados em estantes ventiladas com temperatura controlada. Todos os animais foram monitorados diariamente, observando-se o aparecimento dos sinais clínicos e óbitos. Durante o experimento, os animais moribundos foram eutanasiados, realizando-se a análise macroscópica dos órgãos e tecidos. Os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CEEA 4657).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamentos e Teste de Virulência. Duzentos e cinquenta amostras foram coletadas durante o período de execução do projeto. Destas, três (1,2%) amostras resultaram em culturas positivas. As cepas foram denominadas de BOV3, BOV14 e BOV15. De acordo com as informações obtidas nos frigoríficos onde as cepas foram isoladas, os animais eram machos adultos, procedentes dos municípios do Capão do leão (BOV3) e Pedro Osório (BOV14 e BOV15). O resultado do teste de virulência revelou que duas cepas (BOV3 e BOV15) foram capazes de reproduzir os principais achados clínicos da leptospirose experimental. Por outro lado, a cepa BOV14 não foi capaz de causar a enfermidade clínica e nem o óbito dos animais. Todos os animais inoculados com as cepas BOV3 e BOV15, evidenciaram alterações macroscópicas descritas como típicas da leptospirose experimental, como a icterícia nas mucosas, a congestão de órgãos e hemorragias petequiais pulmonares. Já os animais sobreviventes (cepa BOV14) não exibiam alterações

macroscópicas (fig.1). Contudo, o reisolamento das três cepas foi obtido com sucesso a partir do cultivo do tecido renal de todos os 6 animais.



Figura 1 - Análise macroscópica representativa, da necropsia realizada com hamsters inoculados no teste de virulência. (A) Hamster inoculado com a cepa BOV3; (B) cepa BOV14; (C) cepa BOV15. As setas brancas indicam presença de hemorragia pulmonar petequeial em (A) e (C).

3.2. Extração de DNA e PCR. A extração de DNA genômico das três cepas foi realizada com sucesso e o DNA foi armazenado a -20°C até o uso. A PCR para a amplificação de *lipL32* revelou o fragmento esperado de 474pb para todas as cepas isoladas (fig.2), e a amplificação do gene que codifica para LigANI, revelou que BOV3 e BOV15 apresentaram bandas de aproximadamente 2000pb, enquanto que a cepa BOV14 não amplificou o gene LigANI (fig.2). A cepa FIOCRUZ L1-130, utilizada como controle, também amplificou uma banda de aproximadamente 2000pb. Assim, estes resultados confirmaram que as três cepas são patogênicas.

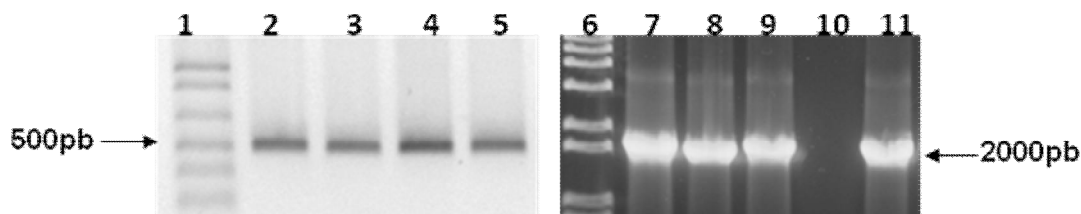


Figura 2 – Amplificação dos genes LipL32 (1-5) e LigA (6-11) nas cepas BOV3, BOV14, BOV15 e Fiocruz L1-130, onde 1=marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 2=L1-130; 3=BOV3; 4=BOV14; 5=BOV15; 6= 1 kb Plus (Invitrogen); 7,8=L1-130; 9=BOV3; 10=BOV14; 11=BOV15.

3.3. Sequenciamento do gene 16S RNA. A análise do sequenciamento utilizando-se o programa BLAST, classificou as três cepas de acordo com a homologia com as sequências depositadas no *GenBank*. Os resultados sobre o sequenciamento e outras informações sobre os isolados estão sumarizados na Tab. 1.

Tabela 1 – Sumário dos resultados das técnicas PCR com LipL32, LigA e de sequenciamento do gene 16S DNA

Isolado	LipL32	LigA	16S DNA
BOV3	Sim	Sim	100% <i>L. interrogans</i>
BOV14	Sim	Não	100% <i>L. borgpetersenii</i>
BOV15	Sim	Sim	100% <i>L. interrogans</i>

Neste trabalho relatamos o isolamento de 3 cepas de *Leptospira* do tecido renal de bovinos abatidos em Pelotas, onde duas delas são virulentas para hamsters, um modelo animal suscetível a leptospirose. Este resultado é inédito, já

que anteriormente nosso grupo de pesquisas havia isolado cepas de humanos, caninos, camundongos e ovinos (SILVA et al., 2008).

Embora a cepa BOV14 não tenha causado óbito nos animais inoculados, provocou uma infecção assintomática, já que foi possível o reisolamento da cepa. Este fato também é descrito para sorovares como Hardjo, que mesmo sendo patogênicos raramente causam doença aguda em hamsters (FAINE et al., 1999).

Na caracterização genotípica, a amplificação de *lipL32* confirmou que as três cepas são leptospirosas patogênicas. A amplificação do gene *ligA* na cepa controle (Fiocruz L1-130) e nas cepas BOV3 e BOV15, e a não amplificação do gene *ligA* na cepa BOV14 confirmam o estudo de McBRIDE et al. (2009), o qual descreve que LigA está presente somente em algumas cepas das espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. kirschneri*. Outros experimentos serão realizados para a confirmação do polimorfismo de *ligA* nos isolados.

4 CONCLUSÕES

As cepas BOV3 e BOV15 reproduzem a leptospirose experimental em hamster, as quais causam o óbito, manifestações clínicas e patológicas nos animais, semelhantes às descritas nas formas graves da leptospirose humana e animal.

Assim, as cepas BOV3 e BOV15 são candidatas aos ensaios de DL50 e a composição de vacinas que visem o controle da leptospirose bovina. Por outro lado, embora a cepa BOV14 não seja capaz de reproduzir a enfermidade letal em hamster, ela poderá ser utilizada em estudos sobre a leptospirose crônica e sobre a colonização renal.

5 REFERÊNCIAS

- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**. v.3, p. 757-771, 2003.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne, Australia. 1999, p. 255.
- GOUVEIA, E.L; METCALFE, J.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infection Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.
- KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.
- McBRIDE, A.J.; CERQUEIRA, G.M.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 196-205, 2009.
- SILVA, E.F.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in hamster model. **Vaccine**, v.26, p.3892-3896, 2008.