

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRA A PARTIR DE ÁGUA COLETADA EM UMA PISCINA ABANDONADA

ALVEZ, Fernando Lopez¹; FORSTER, Karine Maciel¹; USECHE, Santiago Davi Cortés²; RIZZI, Caroline¹; HARTWIG, Daiane¹; SEIXAS, Amilton¹; RECUERO, Ana Lúcia²; FERNANDES, Cláudia Hartlenben²; SEIXAS, Fabiana¹; DELLAGOSTIN, Odir¹

¹Centro de Biotecnologia – UFPel

²Centro de Controle de Zoonoses - UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. fernando.lopez.alvezl@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose, doença causada por bactérias do gênero *Leptospira*, é classificada como uma antropozoonose de ampla distribuição geográfica, que ocorre de forma endêmica no mundo inteiro (BHARADWAJ, 2004). A leptospirose constitui uma enfermidade bifásica tendo início a fase aguda, após a penetração da espiroqueta pelas membranas mucosas ou pela pele íntegra. Invadem a circulação, multiplicando-se ativamente, para posterior migração em direção a determinados órgãos de eleição, desaparecendo a seguir completamente da circulação, constituindo assim, a fase imune. A imunidade em relação à leptospirose é principalmente humoral (MITCHISON et al., 1997). O gênero *Leptospira* é um dos componentes da família dos *Espiroquetídeos*, onde estão reunidos os microrganismos com morfologia filamentosa, espiralados, visualizados apenas pela microscopia de campo escuro e de contraste de fase, com afinidade tintorial pelos corantes argênticos (FAINE et al., 1999). A maioria dos sorovares possui uma determinada distribuição geográfica. Diferentes sorovares de leptospirosas são mais prevalentes em determinadas regiões, estando associados com um ou mais hospedeiros (natural ou de manutenção), os quais servem como reservatórios da infecção. O hospedeiro natural, geralmente é uma espécie silvestre e, algumas vezes, animais domésticos. A transmissão da infecção entre os hospedeiros de manutenção, geralmente é eficiente e a incidência da infecção é relativamente alta. Hospedeiros acidentais não são importantes reservatórios da infecção e a incidência de transmissão é baixa. A transmissão da infecção de um hospedeiro acidental para outro é, relativamente incomum. A transmissão entre os hospedeiros de manutenção é geralmente direta, envolvendo o contato com urina infectada, fluidos placentários ou leite. Além disso, a infecção pode ser transmitida por via venérea ou via transplacentária. A infecção de hospedeiros acidentais é geralmente indireta, pelo contato com urina dos hospedeiros de manutenção, em áreas contaminadas

(Prescott & Zuerner, 1993). O objetivo deste trabalho foi o isolamento de uma nova cepa de *Leptospira sp.* a partir de amostras coletadas de bovinos no extremo sul do Rio Grande do Sul.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletada uma amostra de água de uma piscina com mais de três anos sem uso e sem manutenção. Nessa piscina havia oito ratos, um gambá e um animal cuja identificação foi impossível, pois já estava em estado de putrefação. A água foi coletada em um frasco estéril e foi levada ao laboratório. Esta água foi distribuída em quatro tubos e centrifugada a 3000 rpm por cinco minutos para que as sujidades mais grosseiras fossem depositadas no fundo e não interferissem na amostra. O sobrenadante foi então coletado, inoculado em meio de cultura (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris - EMJH) e incubado em estufa a 30° C. Após quatro dias a amostra foi verificada em microscópio de campo escuro onde foi possível visualizar a presença de espiroquetas, mas também de outros contaminantes. Foi feita uma nova centrifugação, coleta do sobrenadante, inoculação deste em meio propício ao crescimento de leptospiras, o qual, na semana seguinte foi filtrado para excluir outros contaminantes menores. Foram feitos repiques semanais até obtenção de uma cultura com 10⁸ espiroquetas e ao verificar que se tinha essa cultura foi realizada a extração de DNA através de Kit (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit) de acordo com as instruções do fabricante. Um alíquota foi encaminhada ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) para teste de soroglutinação microscópica (MAT), segundo Faine et al. (1999), uma segunda serviu para teste de virulência através da inoculação em dois Hamsters, um macho e uma fêmea segundo Macedo et al. (2004) e uma terceira foi congelada em butijão de nitrogênio líquido. Foi realizada a necropsia dos animais e coleta de órgão e sangue para tentativa de reisolamento. Os rins e fígado foram macerados para serem inoculados e do sangue utilizou-se uma gota para tentativa de cultivo. Foram feitas observações diárias dos animais para observação, se presente, de sintomas associados à infecção por leptospiras. Para caracterização da espécie genômica *L. interrogans* foi utilizada a técnica de análise por PCR do variable-number tandem repeats (VNTR) descrita por Majed, et al, 2005.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultura com 10⁸ espiroquetas foi obtida após seis semanas (seis repiques). Em três dias, os Hamsters infectados com 10⁸ espiroquetas providas da cultura vieram a óbito. Esse resultado demonstra que a cepa em questão é virulenta, visto que houve um intervalo de apenas 3 dias entre a inoculação e o óbito. Durante o período experimental os hamsters demonstraram sintomas como apatia e fadiga respiratória. Na necropsia foi possível observar icterícia generalizada e hemorragia pulmonar. Das culturas obtidas dos órgãos e do sangue coletados obteve-se o reisolamento da bactéria. A Tabela 1 apresenta os resultados sorológicos da MAT realizados no CCZ.

Tabela 1. Resultados sorológicos de humanos, caninos, bovinos e eqüinos com a nova cepa.

Espécie	Número	Positivos	Título mais	Título mais
---------	--------	-----------	-------------	-------------

avaliada	amostral	para nova cepa	alto	baixo
Humanos	40	0	-	-
Caninos	40	6	1:800	1:50
Bovinos	40	4	1:400	1:100
Eqüinos	40	5	1:400	1:100

Ao se utilizar a técnica de VNTR houve amplificação, portanto, a *Leptospira* isolada pertence a espécie *L. interrogans*.

4. CONCLUSÕES

O isolamento de leptospirosas a partir da água afirma esta como sendo um importante meio difusor da doença. O seqüenciamento do DNA será empregado para a caracterização molecular definitiva da bactéria.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARADWAJ, R. (2004). Leptospirosis - a reemerging disease? **Indian Journal of Medical Research** 120, 136-138.
- FAINE, S.B., ADLER, B., BOLIN, C., AND PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne: MediSci; 2nd Ed. 1999.
- MACEDO, N.A.; MORAIS, Z.M.; CAMARGO, C.R.A.; et al. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 41:194-200, 2004.
- MAJED, Z., E. BELLENGER, D. POSTIC, C. POURCEL, G. BARANTON, AND M. PICARDEAU. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005, 43:539-545.
- MITCHISON, M., BULACH, D. M., VINH, T., RAJAKUMAR, K., FAINE, S., & ADLER, B. Identification and characterization of the dTDP-rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related rfb locus in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Journal of Bacteriology** 179, 1262-1267, 1997.
- PRESCOTT, JF. & ZUERNER, RL. *Leptospira*. In: Gyles, L & Thoen, CO. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ames, Iowa University Press 2ª Ed., cap.24, p287-296, 1993.