

***Leptospira interrogans* ISOLADA DE CAPIVARA (*Hydrochaeris hydrochaeris*)**

**JORGE, Sérgio¹; COIMBRA, Marco Antonio Afonso²; LUCAS, Caroline¹;
FORSTER, Karine Maciel¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling¹; DELLAGOSTIN, Odir
Antonio¹; HARTLEBEN, Cláudia Pinho¹**

1 – Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec - UFPel
2 - Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre – NURFS/CETAS – UFPel
sergiojorgevet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira* além de ser uma antropozoonose de ampla distribuição geográfica, que ocorre de forma endêmica no mundo inteiro. Apresenta alta prevalência em países de clima tropical como o Brasil (Levett, 2001), entretanto, apesar do Estado do Rio Grande do Sul possuir um clima temperado, a prevalência da leptospirose humana é maior que a média do restante do país, onde predominam os climas tropical, subtropical e equatorial (12,5 versus 3,5 casos por 100 mil habitantes em 2001). No RS, 69% dos casos de leptospirose humana ocorrem na zona rural e a sua distribuição pode ser associada com os campos irrigados para as lavouras de arroz (Barcellos *et al.* 2003).

Dentro das diferentes espécies de *Leptospira*, encontram-se os sorovares antigenicamente relacionados, que constituem os sorogrupos. Já foram descritos mais de 260 sorovares, distribuídos em 29 sorogrupos (Faine *et al.*, 1999). O número de sorovares e sorogrupos tende a aumentar como consequência ao desenvolvimento e/ou aprimoramento de novas técnicas de biologia molecular para tipificação dos isolados, como por exemplo, a técnica de VNTR (*Variable-Number Tandem-Repeat*) que é frequentemente utilizada para a caracterização de sorovares de *L. interrogans* (Majed *et al.*, 2005).

A capivara é importante sob o ponto de vista de saúde pública. Esta espécie está relacionada com a transmissão de zoonoses bacterianas como a febre maculosa e a leptospirose. No Brasil, investigações sorológicas para detecção de infecção por leptospirose em capivaras e o isolamento desta espiroqueta têm sido realizados com o objetivo de indicar o papel destes animais como reservatório de cepas patogênicas (De Paula *et al.* 2001; Shimabukuro 2006; Silva, 2009). A capivara é o maior roedor do mundo atualmente vivo (Emmons, 1990), chegando a medir 1,30 m de comprimento e 0,60 m de altura; seu peso médio é de 50 kg para as fêmeas e 60 kg para os machos. Possuem ampla distribuição geográfica na América Central e do Sul, do Panamá ao nordeste da Argentina (Emmons, 1990). São animais territoriais que vivem em grupos e a estrutura social é estabelecida através de interações agressivas entre os machos (Alho & Rondon, 1987). Os hábitos gregários das capivaras favorecem a transmissão de leptospirose entre indivíduos do mesmo grupo social, podendo ocorrer, por meio da urina contaminada, a disseminação do agente para o ambiente e infectar indiretamente os animais domésticos, outras espécies de animais silvestres e o homem.

No presente estudo, foi isolada uma cepa de *Leptospira* patogênica dos rins de uma capivara atendida no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre/Centro de Triagem de Animais Silvestres - UFPel. A cepa foi submetida à caracterização molecular utilizando técnica de VNTR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta da amostra e isolamento da cepa

Os rins de uma capivara, fêmea, juvenil e proveniente do ambiente natural, foram coletados após o atendimento e óbito do animal no Núcleo de Reabilitação de Animais Silvestres NURFS/CETAS-UFPEL. Os fragmentos renais foram macerados e cultivados em 5 mL de meio de cultura EMJH (Ellinghausen McCullough Johnson Harris) enriquecido a 10% com *Leptospira enrichment Difco*[®] e após 1 h, 500 µL foram repicados em mais 5 ml de meio. As culturas foram incubadas a 30 °C e repicadas até a diluição de 10⁻². O acompanhamento dos cultivos foi realizado semanalmente em microscopia de campo escuro, onde houve crescimento de aproximadamente 10⁸ bactérias/mL após 14 dias.

2.2 Extração do DNA genômico

A cultura de *Leptospira* foi inativada em banho-maria a 56 °C durante meia hora. Após alíquotada em *ependorf*[®] de 1 mL e centrifugada a 13000 rpm durante 5 minutos para formação de um pellet. A suspensão do *pellet* e posterior extração de DNA foram feitas de acordo com instrução do fabricante do *illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose, para a confirmação da extração e, em seguida, armazenado a -20 °C.

2.3 Amplificação de PCR por VNTR

Sete *primers* discriminatórios foram utilizados: VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR11, VNTR19 e VNTR23, para a caracterização do isolado (Slack *et al.*, 2005). A reação foi realizada com *Taq* DNA polymerase recombinante (Invitrogen), utilizando um ciclo de desnaturação (94°C durante 5 min) seguido por 35 ciclos de amplificação e desnaturação (94 °C por 30 min), anelamento (55°C por 30 seg), e extensão (72°C por 1 min) e a extensão final (1 minuto e 30 segundos a 72°C). O tamanho dos produtos amplificados foi estimado por comparação (Majed *et al.*, 2005) com o marcador (Invitrogen) *1Kb Plus DNA Ladder* e as amostras foram corridas em gel de agarose ao lado de um controle negativo (água) e de um controle positivo (L₁130 – FIOCRUZ). A cepa L₁130 – FIOCRUZ foi escolhida para representar o controle positivo por estar previamente caracterizada (Ko *et al.*, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Leptospira* isolada dos rins da capivara, apresentou amplificações para os sete *primers* utilizados (Figura 1), correspondendo a 2, 1, 13, 7, 1, 2 e 0 repetições respectivamente, o que permitiu concluir, segundo dendrograma proposto por Majed e colaboradores (2005), que o isolado de *Leptospira* é do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Quanto ao sorovar, de acordo com o número de repetições, o isolado pode pertencer a Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni. A análise do VNTR é um método altamente discriminatório para a caracterização de isolados de *L. interrogans*, que juntamente com *L. borgpetersenii* perfazem as espécies patogênicas de maior importância em saúde pública, estando relacionadas com a

maioria dos casos de leptospirose em humanos e animais domésticos em todo o mundo.

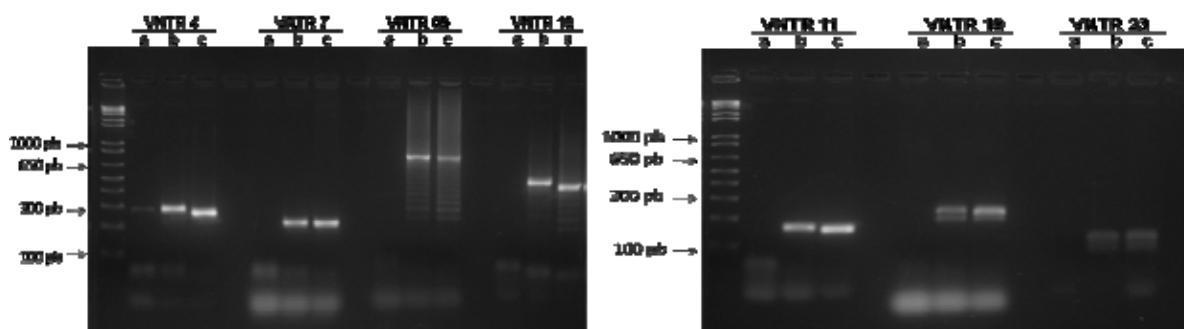


FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose 2%. Marcador de massa molecular (1Kb Plus DNA Ladder). **a** - controle negativo; **b** - controle positivo *Leptospira interrogans* L₁₃₀; **c** - Isolado de capivara.

Investigações sorológicas e isolamento de *Leptospiras* em animais silvestres são importantes para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença. É de grande importância determinar qual é a espécie animal fonte de contágio, para conter ou prevenir a transmissão da doença (Faine *et al*, 1999). Recentemente, na região Sul do RS, foram capturados 33 gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e isolou-se da urina de um destes animais uma cepa de *Leptospira borgpetersenii*, a qual foi caracterizada pelo seqüenciamento do gene *rpoB* bacteriano. Quando esta cepa foi incluída na técnica MAT (*Microscopic agglutination test*) foram identificados altos títulos de anticorpos aglutinantes em soros caninos, sugerindo uma relação epidemiológica entre os gambás-de-orelha-branca e os cães domiciliados (Jorge *et al.*, 2009).

Com o isolamento e a caracterização molecular de uma nova cepa patogênica de *Leptospira* de amostras biológicas de uma capivara, sugere-se que esses animais são reservatórios de *Leptospira interrogans* no ambiente, ocupando um papel de destaque na epidemiologia da doença.

4. CONCLUSÃO

Por comparação com uma relação de sorovares e seus respectivos números de repetições para o teste de VNTR, foi possível concluir que este isolado dos rins de uma capivara se trata de uma *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni ou Icterohaemorrhagiae. A caracterização molecular do isolado quanto à espécie genômica, sorogrupo e sorovar, são de grande relevância para uma melhor compreensão dos estudos epidemiológicos da doença, bem como seus respectivos reservatórios no ambiente.

Os roedores silvestres podem ser reservatórios de espécies patogênicas de leptospiros de maneira análoga aos roedores sinantrópicos.

5. REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J.R.; RONDON, N. L. Habitats, population densities, and social structure of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*, Rodentia) in the Pantanal, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. São Paulo, v. 4, n. 2, p. 139-49, 1987.
- BARCELLOS C; LAMMERHIRT C.B; ALMEIDA, M.A; SANTOS E. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Caderno de Saúde Pública**. V.199, p. 1283-1292, 2003.
- DE PAULA, C.D; MARVULO, M.F.V, MIRAGLIA, F. Isolamento de leptospira em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre. In: **V CONGRESSO E X ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS**, São Paulo, SP. 2001.
- EMMONS, L. H. **Neotropical Rainforest Mammals - a field guide**. Chicago: Chicago Press, 1990.
- FAINE, S; ADLER, B; BOLIN, C; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne, 2° Edition. 1999. 271.
- JORGE, S.; SEIXAS, F,K; BRIHUEGA, B; DELLAGOSTIN, O.A; SAMARTINO, L; FERNANDES, C.P.H; BROD, C.S. Role a marsupial (*Didelphis albiventris*) in maintenance of pathogenic *Leptospira*: strain isolation, molecular characterization and serological survey. **World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians-14th International Symposium**, Madrid, Spain, 2009.
- KO, A. I; GALVAO, R. M; RIBEIRO DOURADO, C. M; JOHNSON, W. D., JR; RILEY L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis **Study Group. Lancet**, 354, 820-825. 1999.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 14 p. 296-326. 2001.
- MAJED, Z; BELLENGER, E; POSTIC, D; POURCEL, C; BARANTON, G; PICARDEAU, M. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensus Stricto. **J. of Clinical Microbiology**. p. 539-545. 2005.
- SHIMABUKURO, J.S. **Estudo da soroprevalência de *Leptospira* spp.em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na bacia hidrográfica do Alto Tietê, SP**. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) USP, São Paulo, SP.
- SILVA, E. F; SEYFFERT, N; JOUGLARD, S. D.D; ATHANAZIO, D.A; DELLAGOSTIN, O.A; BROD, C.S. Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29(2), p.174-176, 2009.
- SLACK, A.T; DOHNT, M.F; SYMONDS, M.L; SMYTHE, L.D. Development of a Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. **Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob**, 4:10, 2005.