

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PRELIMINAR DE LEPTOSPIRAS ISOLADAS DE BOVINOS

SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto¹; FERRO, Ariana Gayer¹; CEZARINI, Cléber Clos²; DELLAGOSTIN, Odir Antônio³; SILVA, Éverton Fagonde¹

¹Faculdade de Veterinária, PPGV – UFPel; ²Coordenação de Inspeção de Produtos de Origem Animal-RS; ³Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel

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 (KO et al., 2009).

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).

Em Pelotas (RS), nosso grupo relatou nos últimos dez anos o isolamento e a caracterização molecular de sete cepas, oriundas principalmente de humanos, caninos e roedores sinantrópicos (SILVA et al., 2008). Com estes isolamentos, podemos evidenciar uma ampla variedade de espécies e sorogrupos que circulam no ecossistema local, e que podem causar desde quadros clínicos leves e inaparentes até casos que culminam com a morte do paciente. Por isso, estudos e investigações na área animal devem ser realizados, assim como os que estão sendo empregados para a leptospirose humana.

Esse trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular preliminar de três cepas de leptospiras isoladas de bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas, RS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo bacteriano e extração de DNA

Os isolados BOV3, BOV14 e BOV15 foram cultivados em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) semi sólido, (Difco Laboratories, USA) 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)

Após a obtenção do DNA genômico, realizou-se a primeira técnica para a caracterização molecular. Uma PCR foi realizada com oligonucleotídeos que amplificam o gene *LipL32*, o qual está presente apenas em leptospiros patogênicos (SEIXAS et al., 2007). Uma segunda PCR foi realizada para a amplificação do gene 16S RNA, o qual é amplamente utilizado na tipificação de leptospiros (CERQUEIRA et al., 2010). Por último, uma terceira PCR foi realizada para a amplificação do gene *rpoB*, o qual é utilizado adicionalmente na tipificação de leptospiros (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.

2.3. Sequenciamento dos genes 16S RNA e *rpoB*

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o equipamento MegaBACE (Amershan Biosciences), conforme CERQUEIRA (2010). 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. Eletroforese de gel em campo pulsado (PFGE)

Os isolados foram submetidos à identificação por PFGE, onde os “plugs” de agarose foram preparados e misturados com as cepas cultivadas para a solidificação e as posteriores incubações e lavagens. A digestão enzimática foi realizada através da digestão com a enzima *Not I*. Após a eletroforese, o gel foi corado e a análise dos padrões dos fragmentos obtidos foi realizada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quando o cultivo das três cepas apresentou um crescimento de 10^8 .ml⁻¹, foi procedida a extração de DNA genômico e as PCR. A amplificação de *lipL32* e a extração do DNA genômico da cepa BOV3 estão na Fig. 1. Este resultado confirmou que as três cepas são patogênicas, já que o gene *LipL32* está presente apenas em cepas patogênicas.

As PCR para a amplificação dos genes 16S DNA e *rpoB* foram realizadas com sucesso. Assim, os amplicons foram submetidos ao seqüenciamento e posterior análise.

1 2 3 4



Figura 1 – Imagem representativa com o DNA genômico e a amplificação do gene LipL32 da cepa BOV3, onde: (1) marcador de peso molecular 1 kB; (2,3) gene LipL32; (4) DNA genômico do isolado.

A análise do seqüenciamento dos genes 16S DNA e *rpoB*, utilizando-se o programa BLAST, classificou as cepas de acordo com a homologia com as sequências depositadas no GenBank. Os resultados sobre o seqüenciamento e outras informações sobre os isolados estão sumarizados na Tab. 1.

Tabela 1 – Resultados das técnicas PCR LipL32, seqüenciamento dos genes 16S DNA e *rpoB*.

Isolado	LipL32	16S DNA	<i>rpoB</i>
BOV3	Sim	100% <i>L. interrogans</i>	SR
BOV14	Sim	100% <i>L. borgpetersenii</i>	SR
BOV15	Sim	100% <i>L. borgpetersenii</i>	95% <i>L. borgpetersenii</i>

SR = Sem resultado.

Embora os resultados do seqüenciamento do gene 16S DNA tenha apresentado homologia de 100% com dados depositados no GenBank para as espécies apresentadas (Tab. 1), este resultado foi considerado inconclusivo, já que foi observada homologia de 100% com outras sequências pertencentes a espécies, sorogrupos e sorovares distintos. Esse mesmo fato foi observado com a cepa BOV15, a qual também possui homologia de 95% com outras sequências depositadas.

A padronização do PFGE, o qual é considerado como técnica “padrão-ouro” para diferenciar sorovares da família Leptospiraceae (GALLOWAY et al., 2008) foi realizada com sucesso (dados não mostrados). Entretanto, o ensaio será repetido para que a análise com os padrões disponíveis seja realizada de forma fidedigna.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na caracterização molecular preliminar dos três isolados, conclui-se que as cepas são patogênicas, através da PCR LipL32.

Os resultados do seqüenciamento dos genes 16S DNA e *rpoB* são inconclusivos.

A técnica PGFE deve ser repetida para uma análise confirmatória.

Para a classificação final dos três isolados, a caracterização molecular deverá ser associada com a caracterização sorológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CERQUEIRA, G.M., McBRIDE, A.J.A., QUEIROZ, A., PINTO, L.S., SILVA, É.F., HARTSKEERL, R.A., REIS, M.G., KO, A.I., DELLAGOSTIN, O.A. Monitoring *Leptospira* Strain Collections: The Need for Quality Control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.1, p. 83–87, 2010.

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.

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.

GALLOWAY, R.L., LEVETT, P.N. Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.4, p. 628–632, 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, p.736-749, 2009.

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

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

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., 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.