

CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptospira* PATOGÊNICA ISOLADA DE *Canis familiaris*

BÁRBARA COUTO ROLOFF¹; SÉRGIO JORGE²; FRANCINE ALVES SINNOTT²;
ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN²; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN²; LEONARDO
GARCIA MONTE³

¹Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – barbararoloff@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas

³Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas
– leonardogmonte@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER & DE LA PENA, 2010). A epidemiologia da infecção por *Leptospira* envolve mais de 260 sorovares patogênicos e inúmeros hospedeiros (RIM et al., 1993; JORGE et al., 2012). Este patógeno é mantido no ambiente através dos hospedeiros suscetíveis ou reservatórios, que eliminam as bactérias na urina, contaminando o solo e a água (LEVETT, 2001). A leptospirose possui distribuição global, com mais de 500 mil casos por ano (WHO, 1999), no entanto, ainda é considerada uma doença negligenciada (WHO, 2011). Na América Latina há alta prevalência de leptospirose devido às condições ambientais e as diferentes espécies que servem como reservatórios da bactéria (LEVETT, 2001). O Brasil é o 17º país com maior incidência da doença, apresentando cerca de 12,8 casos/milhão de pessoas ao ano.

Atualmente, o diagnóstico da leptospirose é baseado na sintomatologia clínica, no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) a partir de soro dos indivíduos com suspeita da doença, detecção sorológica de mudanças bioquímicas típicas de comprometimento renal e isolamento ou detecção da *Leptospira* em amostras biológicas (FAINE et al., 1999). Para a caracterização das leptospirosas isoladas podem ser utilizados métodos imunológicos ou moleculares, utilizando-se anticorpos monoclonais, hibridização e sequenciamento de genes. Contudo, apesar da especificidade, são metodologias onerosas e pouco disponíveis. Buscando alternativas para a identificação de novos isolados de leptospira, foram descritas as metodologias de VNTR (*Variable-Number Tandem-Repeat Loci*) para caracterização das espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*; e Imunofluorescência Indireta (IFI) baseada na utilização de anticorpos específicos contra de antígenos específicos exclusivos e *Leptospira* patogênica (JORGE et al., 2012). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar *Leptospira* isolada a partir da urina de um cão com suspeita clínica leptospirose.

2. METODOLOGIA

A amostra biológica (urina) utilizada neste estudo foi obtida de um canino com suspeita clínica de leptospirose recebida no laboratório de Imunodiagnóstico (CDTec, UFPel), proveniente do canil da Fundação Universidade de Rio Grande.

A amostra foi semeada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), segundo protocolo conhecido (FAINE et al., 1999), resultando em um cultivo de leptospiros. A partir do cultivo, leptospiros vivos foram fixadas em lâminas, para realização da imunofluorescência indireta utilizando como anticorpo primário um anticorpo policlonal (pAb) anti-LipL32, produzido e anteriormente caracterizado no laboratório de imunodiagnóstico. Para tal, lâminas de vidro foram cobertas com poly-L-lisina 10%, diluída em água destilada, e deixadas em temperatura ambiente *overnite*. A cada círculo da lâmina foi adicionado 20 µL do cultivo de leptospiros e deixados a 30 °C por uma hora (até a gota secar). As lâminas foram cobertas com metanol gelado 10 min a 4 °C e deixadas secar à temperatura ambiente. O bloqueio foi feito com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% diluído em PBS por 30 min a 30 °C em câmara escura e úmida. O pAb anti-LipL32, diluído 1:200 (20 µL) foi adicionado cada círculo da lâmina e, após incubação por 2 h em câmara úmida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG coelho conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (Sigma) diluído 1:100 e novamente incubado por 1 h em câmara úmida. Uma gota de meio de montagem (glicerol 90% diluído em PBS) foi adicionada sobre os poços e a lâmina coberta com lamínula. A visualização foi feita em microscópio de fluorescência a 450 nm (Olympus BX 51). Entre todos os passos foram realizadas lavagens com uma solução de SFB 10%. O corante de DNA Hoechst 33258 foi utilizado para confirmar a presença de leptospiros nas lâminas. Como controles do teste foram utilizados o sorovar Patoc (*L. biflexa*) e um soro normal de coelho (SNC). Para VNTR, o DNA do isolado foi extraído utilizando o kit Illustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare) e submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, para quantificação e avaliação de sua integridade, e então armazenado a -20 °C até o uso. Para o PCR sete pares de primers discriminatórios foram utilizados: VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR11, VNTR19 e VNTR23. A reação baseou-se em um ciclo de 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 min, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e um último ciclo de 72 °C por 30 s. Como controle negativo da reação foi utilizada água estéril para PCR. Os produtos da reação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e o padrão de bandas resultante foi comparado com o DNA de uma cepa previamente caracterizada (*L. interrogans* Fiocruz L1-130) utilizado como controle positivo, seguindo as recomendações de MAJED et al. (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pAb anti-LipL32 foi capaz de identificar a presença da proteína LipL32 na superfície das bactérias, comprovando a expressão do fator de patogenicidade LipL32 (Fig. 1). Não foram observadas reações do pAb anti-LipL32 e sorovar Patoc (Fig. 1) e do SNC com ambas as cepas utilizadas (dados não mostrados). A utilização de anticorpos específicos para caracterização de cepas de *Leptospira* é uma metodologia barata e de fácil realização, tendo sido reportada em outros estudos (JORGE et al., 2012).

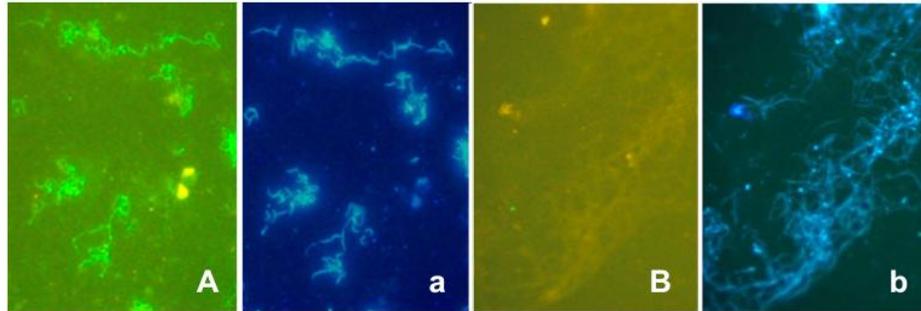


Figura 1: Imunofluorescência indireta demonstrando a expressão de LipL32 na superfície de *L. interrogans* isolada de *Canis familiaris*. A: *L. interrogans* reagindo com anticorpos anti-LipL32; B: *L. interrogans* confrontado com um Soro Normal de Coelho (controle negativo); a e b: DNA de *Leptospira* com Hoechst 33258.

A análise do VTNR apresentou amplificação dos sete primers discriminatórios (Fig. 2), de acordo com o dendograma previamente proposto como *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni (MAJED et al., 2005). Esses dois sorovares não podem ser diferenciados por técnicas moleculares, porém, a identificação do sorogrupo pode ser útil em surtos de leptospirose e em estudos epidemiológicos (LEVETT, 2001). Além disto, as características patogênicas destes sorovares são semelhantes e ambos compartilham os mesmos reservatórios (FAINE et al., 1999).

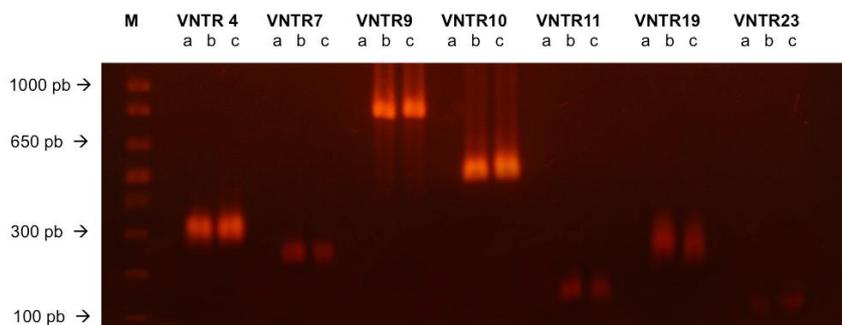


Figura 2: Caracterização de *L. interrogans* por VNTR. Gel de agarose 1,5 % do produto amplificado por PCR. M: Marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen); a: Controle negativo; b: Controle positivo (DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130); c: DNA genômico do isolado *Canis familiaris*.

L. interrogans sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni foi previamente isolada e caracterizada utilizando a metodologia de VNTR (JORGE et al., 2012; MONTE et al., 2013), sendo uma metodologia sensível e específica. Neste estudo foi possível caracterizar *L. interrogans* isolada de um cão a partir da urina. O isolamento de leptospirose é recomendado na vigilância epidemiológica da doença, buscando o conhecimento dos sorovares envolvidos na região de ocorrência dos casos (LEVETT, 2001).

4. CONCLUSÕES

As metodologias de VNTR e IFI, utilizando anticorpos específicos contra *Leptospira* patogênica, são ferramentas importantes para a caracterização de isolados de *Leptospira*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B; DE LA PENA, M A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** v.140, p.287 – 296, 2010.
- BROD, C S; ALEIXO, J A G; JOUGLARD, S D D; FERNANDES, C P H; TEIXEIRA, J L R; DELLAGOSTIN, O A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, n.38, v.4, p.294 - 300, 2005.
- FAINE, S, ADLER, B, BOLIN, C, PEROLAT, P. ***Leptospira* and Leptospirosis**, Melbourne: MedSci, 1999, 2ed.
- GREENE, C E; **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, St. Louis, Missouri, U.S.A.: Saunders Elsevier, 2006, 3ed.
- JORGE, S; HARTLEBEN, C P; SEIXAS, F K; COIMBRA, M A; STARK, C B; LARRONDO, A G; AMARAL, M G; ALBANO, A P; MINELLO, L F; DELLAGOSTIN, O A; BROD, C S. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil. **Acta Tropica**, n.124, v.2, p.147 – 51, 2012.
- JORGE, S; MONTE, L G; COIMBRA, M A; ALBANO, A P; HARTWIG, D D; LUCAS, C; SEIXAS, F K; DELLAGOSTIN, O A; HARTLEBEN, C. Detection of Virulence Factors and Molecular Typing of Pathogenic *Leptospira* from Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Curr Microbiol**, n.65, p.461 – 464, 2012.
- LEVETT, P N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Review**. n.14, v.2, p.296 – 326, 2001.
- MAJED, Z; BELLENGER, D; POSTIC, D; POURCEL, C; BARANTON, G; PICARDEAU. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.539 – 545, 2005.
- MONTE, L G; JORGE, S; XAVIER, M A; LEAL, F M A; AMARAL, M G; SEIXAS, F K; DELLAGOSTIN, O A; HARTLEBEN, C P. Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. **Acta Tropica**, n.126, p.164 – 166, 2013.
- RIM B M; RIM C W; CHANG W H; KAKOMA I. Leptospirosis serology in Korean wild animals. **Journal of Wildlife Diseases**, n.29, p.602 - 603, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leptospirosis worldwide. **Wkly Epidemiol Rec**, n.74, p.237 – 242, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Leptospirosis: an emerging public health problem. **Wkly Epidemiol Rec**, n.86, p.45 – 50, 2011.