

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Leptospira* sp. DE CANINO

CARLOS EDUARDO POUHEY DA CUNHA¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN¹;
AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO¹; ALAN JOHN ALEXANDER McBRIDE¹;
ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN²

¹ Universidade Federal de Pelotas – Centro de Desenvolvimento Tecnológico – cpouey@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – Centro de Desenvolvimento Tecnológico – odirad@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose negligenciada, difundida mundialmente, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (WHO, 2011), que se divide em 6 espécies saprofitas, 5 intermediárias e 8 patogênicas (*L. kmetyi* ainda tem uma classificação incerta), divididas em mais de 260 sorovares (LEVETT, 2001; BOONSLIP et al., 2013). *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri* são as espécies mais comumente associadas com doença em humanos (BOONSLIP et al., 2013), sendo estimados cerca de 500.000 casos por ano (WHO, 2011).

Leptospira spp. patogênicas colonizam o tubo renal de seus hospedeiros e são, então, eliminadas para o ambiente através da urina, contaminando o solo e coleções hídricas (KO et al., 2009). A infecção se dá indiretamente pelo contato com material contaminado ou diretamente por contato com urina contaminada. Assim, reinicia-se o ciclo de transmissão e infecção do patógeno.

Apesar de colonizarem os rins, *Leptospira* spp. patogênicas podem danificar outros órgãos, como fígado e pulmões (ADLER & MONCTEZUMA, 2010). A leptospirose pode ocorrer desde uma forma assintomática, passando por um quadro clínico similar a um quadro gripal até sua forma mais grave, apresentando hemorragia pulmonar difusa e falência dos rins e fígado (KO et al., 2009). Na primeira fase, onde há bacteremia, a doença apresenta febre e dores musculares e de cabeça. Posteriormente, caso não tratada, a leptospirose pode desenvolver-se em sua forma mais severa, conhecida como Síndrome de Weil, que pode ser fatal e apresenta os demais sintomas supracitados (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Caninos podem apresentar quatro formas de leptospirose: síndrome icterica, hemorrágica, urêmica (doença de Stuttgart e reprodutiva, resultando em aborto ou nascimento prematuro ou com filhote enfraquecido). Os principais sintomas são febre, icterícia, vômito, diarreia, falência renal, hemorragias e morte (ADLER & MONCTEZUMA, 2010). Entretanto, a maioria dos casos é assintomática quando a infecção se dá por um sorovar já adaptado ao hospedeiro (Canicola para cães), mas que pode causar doença em outras espécies (DELLAGOSTIN et al., 2011). Dessa forma, caninos podem também ser considerados animais reservatórios capazes de disseminar leptospirose para humanos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma cepa de *Leptospira* sp. isolada de canino quanto a sua espécie, sorovar e virulência.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostra

Amostra de sangue foi coletada através da veia braquial, com seringa e agulha, de canino com 7 meses de idade com quadro clínico característico de leptospirose (febre, icterícia, vômito, desidratação e urina escura).

2.2 Cultivo e isolamento de *Leptospira* sp.

O isolamento de *Leptospira* sp. se deu pelo cultivo de duas a quatro gotas da amostra de sangue em meio Ellinghouse-McCullough-Johnson-Harris (EMJH – Difco) líquido suplementado com 10% *Leptospira* Enrichment EMJH (Difco) e 200 µg/mL de 5-fluoruracil. Os cultivos foram mantidos em estufa B.O.D a 30 °C sem agitação e monitorados semanalmente por microscopia em campo escuro para avaliar o crescimento de espiroquetas. Meio semissólido foi usado para cultivo nas mesmas condições para armazenar o isolado.

2.2 Extração de DNA genômico e caracterização molecular

Culturas de *Leptospira* sp. com aproximadamente 10⁸ células/mL foram utilizadas para extração de DNA genômico por *illustra* bacteria genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência da extração foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA genômico purificado foi armazenado a -20 °C e usado para caracterização molecular dos isolados.

A confirmação do isolado como *Leptospira* sp. patogênica foi feita pela amplificação do gene *lipL32* conforme descrito por SEIXAS et al. (2007).

Análise do número de repetições em tandem (VNTR) em vários *loci* foi realizada conforme SALAÜN (2006) para caracterização do sorogrupo e sorovar dos isolados. Brevemente, fragmentos repetitivos de 4 *loci* (VNTR-4, VNTR-7, VNTR-10 e VNTR Lb-5) foram amplificados por PCR, o número de repetições mensurado de acordo com o tamanho dos amplicons em gel de agarose 1% e tais dados foram cruzados com os dados tabelados no referido artigo. *Leptospira interrogans* L1-130 foi usada como controle do padrão de bandas para comparação e confirmação dos resultados.

2.3 Caracterização da virulência dos isolados em modelo animal

Um cultivo do isolado com 5 passagens *in vitro* foi utilizado para inoculação intraperitoneal de aproximadamente 10⁸ células bacterianas em hamsters sírios fêmeas (*Mesocricetus auratus*) com 8 semanas de idade. Foram usados 3 animais no grupo inoculado com o isolado e 2 no grupo controle, inoculado com PBS estéril. Os animais foram observados por 21 dias e eutanasiados quando moribundos.

Um dos rins foi removido assepticamente, macerado e homogeneizado em meio EMJH suplementado para reisolamento do patógeno. Amostras de rim, fígado e pulmão foram coletadas para analisar a presença de *Leptospira* sp. nesses órgãos pela técnica de *imprint* (CHAGAS-JÚNIOR et al., 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando crescimento de espiroquetas foi detectado por microscopia em campo escuro, o cultivo foi repicado para meio EMJH líquido e semissólido, bem como congelado em nitrogênio líquido para armazenamento da cepa. A extração de DNA genômico foi realizada quando o cultivo atingiu densidade de

aproximadamente 10^8 células por mililitro. Amplificação do gene *lipL32* por reação de PCR confirmou o isolado como *Leptospira* sp. patogênica e portanto procederam-se os demais experimentos.

A técnica de VNTR revelou que o isolado pertence ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, conforme observado por comparação do padrão de bandas com o de uma cepa referência (L1-130). Esse resultado também revela que o isolado é da espécie *L. interrogans*.

Animais inoculados com 10^8 espiroquetas morreram aos 4 (2 animais) e 6 dias (1 animal) após a inoculação. O agente etiológico foi reisolado com sucesso a partir de cultivo renal. Pulmões e fígado apresentavam petéquias ao passo que rins e fígado estavam descoloridos no momento da eutanásia. A técnica de *imprint* demonstrou a presença de *Leptospira* sp. em todos os órgãos analisados (Figura 1). Os animais do grupo controle (PBS) não apresentaram qualquer dano macroscópico nos órgãos e não foi possível detectar nenhuma *Leptospira* por *imprint*, conforme esperado. Análises histopatológicas serão ainda realizadas para avaliar o dano tecidual causado a nível microscópico.

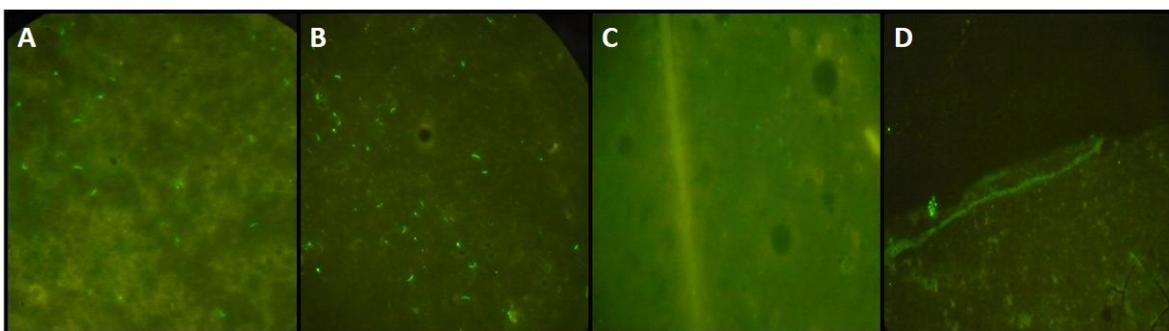


Figura 1: *Imprint* de rim (A), fígado (B) e pulmão (C) para detecção de *Leptospira* sp. nos órgãos de animais experimentalmente infectados. Os mesmos órgãos de animais inoculados com PBS estéril foram usados como controle negativo (D – somente rim mostrado). Aumento de 200 vezes.

4. CONCLUSÕES

Os resultados de VNTR indicam o isolado como sendo *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Os demais resultados nos permitem concluir que a cepa isolada é virulenta em modelo de experimentação animal. Esta cepa será útil nos projetos de desenvolvimento de vacinas recombinantes e testes rápidos de diagnóstico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MONCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, p.287-296, 2010.

BOONSLIP, S.; THAIPADUNGPANIT, J.; AMORNCHAI, P.; et al. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.1, p.e1954, 2013.

CHAGAS-JUNIOR, A. D.; SILVA, C. L. R.; SOARES, L. M. et al. Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. **PLoS One**, San Francisco, v.7, n.2, p.e327112, 2012.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, Georgetown, v.7, p.1215-1224, 2011.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.10, p.736-747, 2009.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, p.296-326, 2001.

SALAÜN, L.; MÉRIEN, F.; GURIANOVA, S.; et al. Typing of the Agent of Leptospirosis Tandem-Repeat Analysis for Molecular Application of Multilocus Variable-Number. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, p.3954-3962, 2006.

SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; et al. 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**, Ottawa, v.53, n.4, p.472-479, 2007

WHO. Leptospirosis an emerging public health problem. **Weekly Epidemiological Records**, Genève, v.86, p.45-50, 2011.