

QUATRO CEPAS DE *Leptospira borgpetersenii* SOROGRUPO BALLUM ISOLADAS DE CAMUNDONGOS

FÉLIX, S.R.^{1*}; SILVA, É.F.¹; CERQUEIRA, G.M.¹; SEIXAS, F.K.¹; GALLINA, T.²; HARTMANN, D.M.¹; DELLAGOSTIN, O.A.¹

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia (UFPel)

*Apresentador

INTRODUÇÃO:

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial que acomete o homem e os animais. Muitos roedores são descritos como reservatórios de leptospirosas patogênicas, entre eles os camundongos (*Mus musculus*). Os camundongos são roedores encontrados em todos os continentes e são considerados como fonte de infecção para a leptospirose humana (Levett, 2001).

Relatos sobre a ocorrência de leptospirosas em camundongos são comuns em todos os países, tanto por inquéritos sorológicos quanto por isolamento da bactéria. No Brasil, o isolamento de leptospirosas em camundongos foi realizado com sucesso em várias cidades, como no Rio de Janeiro, com o isolamento de cepas do sorogrupo Pomona (Cordeiro, 1970) e no porto de Santos, com o isolamento de leptospirosas Wolffi (Giorgi et al., 1984).

Neste trabalho, comunicamos o isolamento de leptospirosas pertencentes a espécie *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum de camundongos capturados em uma residência do meioo rural de Pelotas.

MATERIAL E MÉTODOS:

Seis camundongos foram capturados na periferia de uma residência do meio rural de Pelotas, RS. Aparentemente, todos os animais estavam saudáveis no momento da captura, e foram conduzidos até o Centro de Biotecnologia da UFPel. Após a eutanásia dos animais, os rins foram coletados assepticamente e o macerado destes foi inoculado diretamente em meio de cultura EMJH com 10% de suplemento comercial. As culturas negativas foram mantidas por um período de até 49 dias em estufa bacteriológica a 29 °C, enquanto que as culturas positivas foram repicadas semanalmente nas mesmas condições.

Após o crescimento das culturas, o DNA genômico das quatro cepas foi extraído e amplificado através da técnica de PCR. Cada reação foi realizada em um volume final de 50 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, 6 ng de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM e 10% de tampão 10x da enzima Taq DNA polimerase. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (55°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Após os 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 7 min. Foram aplicados 5 µl da reação de amplificação e 2 µl de tampão de amostra 6 X em gel de agarose

1,0% corado com Brometo de Etídeo na concentração de 0,05 µg/ml e visualizado sob luz UV. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad) com tampão TBE a 130 volts por 25 minutos. O produto de PCR foi purificado utilizando o Kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification”, Invitrogen.

O material purificado foi sequenciado por eletroforese capilar utilizando di-deoxi-nucleotídeos marcados em um seqüenciador MegaBACE (Amershan Biosciences). O programa Basic Local Alignment Search Tool, ou BLAST, localizado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foi utilizado para comparar os resultados encontrados com os dados depositados no banco de dados mundial (GenBank).

Paralelamente, as cepas foram testadas em grupos de dois hamsters do mesmo sexo, com 4 semanas de idade, através do desafio intraperitoneal com a inoculação de 10⁸ leptospiras. Os animais com doença clínica foram eutanasiados e realizou-se a cultura de um rim e a análise histopatológica do tecido renal através da coloração com prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Quatro cepas foram isoladas a partir da cultura renal de quatro camundongos. A cultura renal dos outros dois animais não foi realizada com sucesso (TABELA 1).

TABELA 1. Resultados das tentativas de isolamento, da histopatologia e do teste de virulência em hamsters, realizada com amostras de tecido renal de camundongos capturados

Amostras	Cultura		Histopatologia		Teste de Virulência
	Renal	Sangue	Renal	Pulmonar	
1E	+	-	+	-	-
2E	+	-	+	-	+
3E	+	-	+	-	-
4E	+	-	+	-	-
5E	-	-	-	-	NR
6E	-	-	-	-	NR

NR = Não realizado

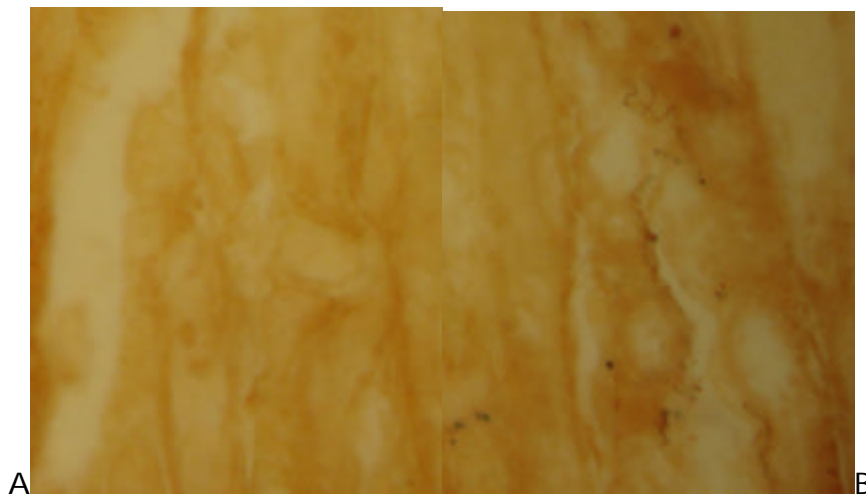
O seqüenciamento de aproximadamente 1400 pb do gene 16S de cada uma das quatro cepas isoladas e a análise com as sequencias depositadas no

GenBank permitiu a identificação destas cepas como pertencentes à espécie *L. borgpetersenii*, sorogrupo Ballum.

Todos os animais inoculados com as cepas isoladas foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sintomas, e os animais que apresentaram sintomas e óbitos foram eutanasiados.

Até o momento, a recuperação das cepas através de cultura renal foi realizada com êxito para apenas uma das cepas, a cepa 2E, que foi a única que causou sinais clínicos e óbito em hamsters. A análise histopatológica revelou a presença de leptospiros no tecido renal dos 4 camundongos capturados com cultura positiva, bem como os hamsters doentes inoculados com 2E (FIGURA1). Todas as cepas do isolamento original e as re-isoladas dos animais testados foram identificadas e congeladas, sendo armazenadas a -70 °C e em nitrogênio líquido.

Figura 1. Figura representativa da análise histopatológica do tecido renal de camundongos capturados. A=animal negativo, B= animal positivo.



Nosso grupo recentemente realizou a padronização de cepas virulentas em hamsters como modelo animal suscetível a leptospirose, pertencentes às espécies *L. interrogans* e *L. noguchii* (Silva et al., 2008). Estas cepas serão utilizadas em futuros experimentos de padronização da dose letal 50%, patogênese e desafio heterólogo de vacinas recombinantes.

REFERÊNCIAS:

CORDEIRO, F. Leptospiros isoladas do camundongo *Mus musculus* brevisortris no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 1970. V.5, 561-564.

GIORGI W, GENOVEZ ME, TERUYA JM, da SILVA, AS. *Leptospira interrogans*, sorotipo Wolffi, isolada de camundongo capturado no Porto de Santos, SP. **Biológico**. 1984. V.50, n.12,295-297.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. 2001. v.14, n.2, 296-326.

SILVA EF, SANTOS CS, ATHANAZIO DA, SEYFFERT N, SEIXAS FK, CERQUEIRA GM, FAGUNDES MQ, BROD CS, REIS MG, DELLAGOSTIN OA, KO AI. Characterization of virulence of Leptospira isolates in a hamster model. **Vaccine**. 2008; 26(31):