

# SEQUENCIAMENTO DO GENE *rpoB* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Leptospira noguchii*

SILVA, É.F.<sup>1</sup>; SEIXAS, F.K.<sup>1</sup>; CERQUEIRA, G.M.<sup>1</sup>; HARTWIG, D.D.<sup>1</sup>; FÉLIX, S.R.<sup>1</sup>; HARTMANN, D.M.<sup>1\*</sup>; DELLAGOSTIN, O.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

\* Apresentador

## INTRODUÇÃO:

As leptospirosas patogênicas exibem ampla variação de características fenotípicas e genotípicas. Atualmente, as leptospirosas são classificadas em 17 espécies e mais de 200 sorovares (Brenner et al., 1999; Salaun et al., 2006), sendo o gene 16S rRNA, o alvo usual para identificação das espécies de *Leptospira*. Devido ao baixo grau de polimorfismo deste gene entre as espécies genômicas, é necessário o sequenciamento de todo o gene (+/- 1500 pb) para a identificação de um novo isolado clínico (La Scola et al., 2006). Neste estudo, testamos a amplificação do gene *rpoB* como ferramenta para uma identificação inicial de isolados de *L. noguchii*.

## MATERIAL E MÉTODOS:

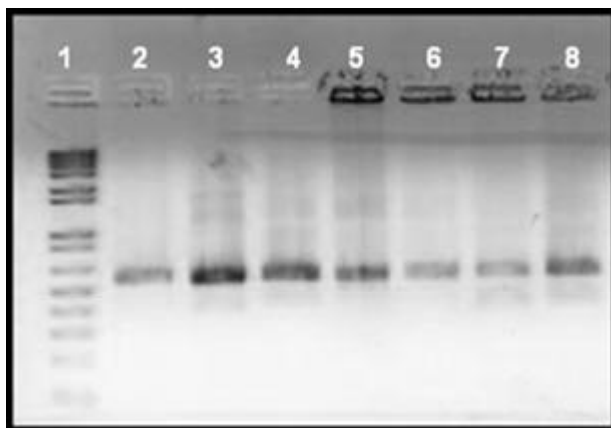
Cepas de *L. noguchii* foram identificadas como agente causal da leptospirose em humanos e animais em Pelotas, RS. Estes isolados foram obtidos a partir de amostras de sangue de dois humanos, e de rins de canino e de ovino, sendo caracterizadas genotipicamente e sorologicamente (Silva et al. 2007), além de testadas quanto sua virulência em modelo animal suscetível (Silva et al., 2008).

Os primers utilizados na PCR foram descritos anteriormente por La Scola et al (2006), e a 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), MgCl<sub>2</sub> 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 (Amersham 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).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A amplificação do fragmento de aproximadamente 600 pb correspondente ao gene denominado *rpoB* que codifica para subunidade B da RNA polimerase, foi possível com a temperatura de anelamento de 55<sup>o</sup> C. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliar a eficiência da amplificação. A Figura 1 mostra amplificação de 7 amostras analisadas.



**FIGURA 1.** PCR com primers *rpoB* F e *rpoB* R. Coluna 1, marcador de massa molecular 1Kb DNA ladder; coluna 2, cepa *L. noguchii* Autumnalis Bonito; coluna 3, cepa *L. noguchii* Autumnalis Caco; coluna 4, cepa *L. noguchii* Bataviae Cascata; coluna 5, *L. noguchii* Australis Nicarágua 1011 (OMS); coluna 6, *L. noguchii* Louisiana orleans (OMS); coluna 7 *L. noguchii* Panama panama (OMS); coluna 8, *L. noguchii* Pomona proechimys;

O material amplificado foi sequenciado por eletroforese capilar, e o resultado do seqüenciamento do *rpoB* permitiu caracterizar todos os isolados como *L. noguchii* (TABELA 1), além de correlacionar a proximidade genética entre eles (FIGURA 2).

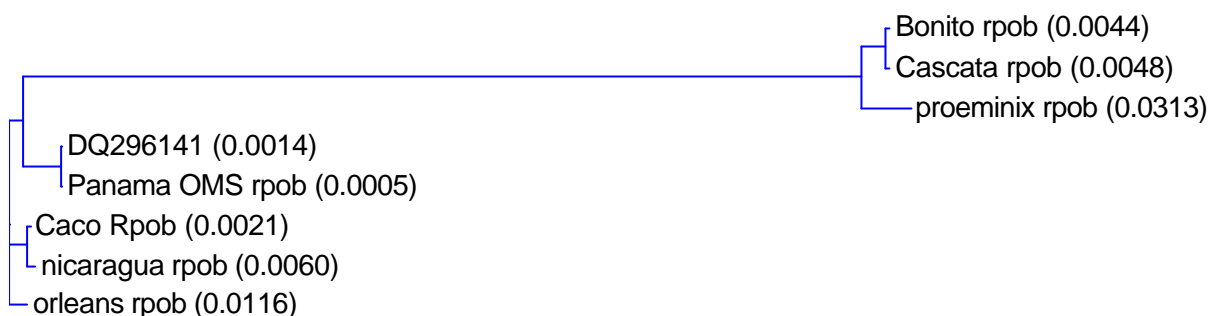
**TABELA 1.** Caracterização de isolados de *Leptospira* através do seqüenciamento do *rpoB*.

Isolados <sup>a</sup> / cepa OMS <sup>b</sup>	Seqüenciamento (pb)	Análises de BLAST <sup>c</sup>
Bonito <sup>a</sup>	545pb	94%
Caco <sup>a</sup>	501pb	94%
Cascata <sup>a</sup>	569pb	94%
Nicarágua 1011 <sup>b</sup>	535pb	94%
Orleans <sup>b</sup>	529pb	95%
Panama <sup>b</sup>	538pb	100%
Proechimys <sup>b</sup>	516pb	96%

<sup>c</sup> comparação com a sequencia de *Leptospira noguchii* serovar Panama depositada.

Nos últimos anos, muitas técnicas moleculares tem sido avaliadas para a classificação de leptospiros, em nível de espécie e sorovar (Salaun et al., 2006; Majed et al., 2005), entretanto, nenhuma das técnicas descritas são baseadas em análise de sequencias(La Scola et al., 2006).

Sendo assim, conclui-se que o seqüenciamento do gene rpoB pode ser utilizado como ferramenta adicional para a triagem de cepas de *L. noguchii* isoladas a partir de amostras clínicas.



**Figura 2.** Correlação genética entre os isolados e amostras de *Leptospira* da OMS.

## REFERÊNCIAS:

- BRENNER DJ, KAUFMANN AF, SULZER KR, STEIGERWALT AG, ROGERS FC, WEYANT RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int J Syst Bacteriol.** 1999; 49 Pt 2, 839-858.
- SALAUN L, MERIEN F, GURIANOVA S, BARANTON G, PICARDEAU M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **J Clin Microbiol.** 2006; 44, 3954-3962.
- LA SCOLA B, BUI LT, BARANTON G, KHAMIS A, RAOULT D. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. **FEMS Microbiol Lett.** 2006; 263(2), 142-147.
- SILVA EF, BROD CS, CERQUEIRA GM, BOURSCHEIDT D, SEYFFERT N, QUEIROZ A, SANTOS CS, KO AI, DELLAGOSTIN OA. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Vet Microbiol.** 2007; 121(1-2)

- 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):
- MAJED Z, BELLENGER E, POSTIC D, POURCEL C, BARANTON G, PICARDEAU M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. **J Clin Microbiol**. 2005; 43(2):539-545.