

I-122 - UTILIZAÇÃO DE MULTIPLEX-PCR PARA A DETECÇÃO DE LEPTOSPIRAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA OBTIDAS DE COMUNIDADE CARENTE DO MUNICÍPIO DE PETRÓPOLIS, RJ

Fabiano Sutter de Oliveira⁽¹⁾

Graduação em Química pela Universidade do Grande Rio. Pós-graduação em Toxicologia Forense e faz mestrado em tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Alberto Dias de Souza Costa

Graduação em Química Industrial pela Universidade do Grande Rio. Pós-graduação em Gestão empresarial pela Faculdade Arthur Sá Earp Neto. (FASE).

André Lermontov

Engenheiro Químico pela Escola de Química da UFRJ. Mestre em Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da UFRJ. Doutor em Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da UFRJ. Gerente de Tecnologia do Grupo Águas do Brasil S/A com mais de 15 anos de experiência em saneamento ambiental, tratamento de água e efluentes.

Martha Maria Pereira

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Gama Filho. Mestre em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz. Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz. Pós doutorado no Instituto Pasteur (França). Pesquisadora Titular do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Coordenadora do Lab. de Referência Nacional para Leptospirose (IOC/Fiocruz). Diretora do Centro Colaborador da OMS para Leptospirose.

Leandro de Moura Hillen

Graduando em Farmácia pela Universidade Serra dos Órgãos. Possui formação Técnica em Química e em Eletrotécnica.

Ilana Teruszkin Balassiano

Microbiologista pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Mestre em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tecnologista em Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz.

Juliana Magalhães Vital-Brazil

Bióloga pela Universidade Santa Úrsula. Mestre em Ciências (Biologia Molecular) pela Fundação Oswaldo Cruz. Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tecnologista III da Fundação Oswaldo Cruz.

Endereço⁽¹⁾: Rua Dr. Sá Earp, 84 - Morin - Petrópolis - RJ - CEP: 25625-073 - Brasil - Tel: (24) 2103-5656 - e-mail: fsutter@aguasdoimperador.com.br

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose mundialmente distribuída, com características cosmopolitas, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. No Brasil, todas as regiões apresentam casos de leptospirose humana. As comunidades urbanas desprovidas de saneamento básico são as mais afetadas, sendo notificados anualmente, mais de 10.000 casos da doença. O método laboratorial convencionalmente utilizado na detecção de leptospirose, a partir de amostras ambientais, é o isolamento em cultura, porém esta metodologia é laboriosa e consome muito tempo. Alternativamente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado valiosa na rápida e específica detecção deste patógeno. Esta pesquisa, uma parceria entre a empresa Águas do Imperador S/A e o Centro de Referência Nacional para Leptospirose/Fiocruz, teve como proposta padronizar e implementar um protocolo, baseado em PCR, para a determinação da ocorrência de *Leptospira* spp. Em amostras de água coletadas em uma comunidade carente. A região estudada está indevidamente inserida em uma Área de Proteção Ambiental (APA), localizada na Estrada do Contorno, bairro Capela no município de Petrópolis/RJ. Entre o período de maio a julho de 2009, foram coletadas 100 amostras em pontos estratégicos previamente caracterizados como de alto risco, sendo parte deste plano de amostragem o lago, a rede precária de distribuição de água por toda a extensão da comunidade e próximo ao depósito de lixo. O DNA obtido foi utilizado na multiplex-PCR para a detecção de leptospirose saprófitas e patogênicas, através do emprego de iniciadores que permitem a amplificação específica de regiões referentes aos genes *rrs2* (RNA ribossomal 16S) e *lip32* (Lipoproteína de membrana externa). Utilizando essa metodologia, foi detectada a presença do microrganismo nas localidades próximas ao depósito de lixo e no lago, corroborando com dados

epidemiológicos retrospectivos da comunidade estudada, que apontam histórico de óbito por leptospirose. Estudos prévios reconhecem que a água e o solo contaminados pela urina de animais infectados são importantes veículos na transmissão de leptospirosas patogênicas. Dessa forma, o presente trabalho ressalta a necessidade de ações governamentais no sentido de ampliar a fiscalização para que tal tipo de ocupação não ocorra especialmente em locais com restrições ambientais. Além disso, o método desenvolvido mostrou-se útil no monitoramento de contaminação ambiental por leptospirosas, sendo uma ferramenta valiosa para o acompanhamento da incidência desse microrganismo em áreas endêmicas e o controle da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Leptospira, Leptospirose, Multiplex-PCR, Água.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por *Leptospira spp.*, reconhecida mundialmente como um importante problema de saúde pública, especialmente em países tropicais (Mathur et al. 2009). O contágio humano se dá através do contato direto com a urina de animais infectados ou indiretamente através da água contaminada (Tansuphasiri et al. 2006a, Vijayachari et al. 2008, Adler & de la Peña Montezuma 2009). É uma antroponose de grande distribuição mundial, que atinge diferentes animais sinantrópicos (roedores selvagens e domésticos), que servem como reservatório da bactéria causadora da doença, a leptospira. Também são reservatórios os suínos, bovinos, equinos, ovinos e os cães (Croda, 2008; Carreira, 2009; Fontes et al, 2009).

O agente etiológico da leptospirose pertence ao gênero *Leptospira*, do qual fazem parte espécies patogênicas e saprófitas. Este microrganismo apresenta a capacidade de colonizar cronicamente os túbulos renais de alguns mamíferos, tornando-os reservatórios naturais do patógeno (Croda, 2008; Carreira, 2009).

A doença é considerada emergente em países em desenvolvimento e reemergente em países desenvolvidos. Em países desenvolvidos a contaminação por *Leptospira* geralmente acontece, através de atividades de recreação em águas naturais, como a canoagem, o rafting, o ecoturismo, o triatlo, e com atividades de risco ocupacional e, por isso, é considerada reemergente (Jouglard, 2005; Oliveira, Guimarães & Medeiros, 2009).

No Brasil, a leptospirose é considerada endêmica em zonas rurais e urbanas. Nestas últimas, a incidência da doença pode ser maior em comunidades carentes, onde a ausência de saneamento básico contribui para as condições ecológicas necessárias para a transmissão do patógeno por intermédio dos animais reservatórios. (Sarkar et al. 2002, Dias et al. 2007). É interessante destacar que surtos nessas áreas apresentam altas taxas de mortalidade com poucos dias de hospitalização, o que causa um impacto na saúde pública e contribui para o aumento do número de casos notificados. Deste modo, a detecção de *Leptospira* em amostras ambientais demonstra ser uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos (McBride et al. 2005).

A leptospirose é uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias helicoidais (espiroquetas) do gênero *Leptospira* (Jouglard, 2005, Reis et al, 2005, Oliveira, Guimaraes & Medeiros, 2009), caracterizada por uma diversidade de manifestações clínicas, que vão desde febres baixas, sintomas semelhantes à gripe, até a forma mais grave, como a síndrome de Weil (forma grave icterica da doença), insuficiência renal e hemorragias, entre elas a síndrome de hemorragia pulmonar, que também é uma forma grave da doença (Brasil, 2009, Reis et al, 2005), podendo resultar em alta morbimortalidade (Croda, 2008, Fontes et al, 2010).

O principal problema para determinar o risco qualitativo da exposição às leptospirosas está associado à dificuldade de isolamento do patógeno em águas de superfície. Esta dificuldade se deve principalmente a observação de que leptospirosas saprófitas, predominantes nesse tipo de amostra, são morfolologicamente similares têm velocidade de crescimento mais rápida que as patogênicas. Além disso, essa metodologia é considerada laboriosa e demorada (Ganoza et al. 2006, Tansuphasiri et al. 2006a). Para superar estas limitações, ferramentas moleculares baseadas em PCR têm provado ser específicas na detecção do microrganismo. Esta metodologia pode ser usada para detectar especificamente o patógeno, uma vez que pode ter como alvo os genes específicos, especialmente aqueles relacionados à superfície macromoléculas que não estão presentes no grupo saprófitas (Adler & de la Peña Montezuma 2009).

O objetivo do presente estudo foi adequar e avaliar um protocolo, frequentemente utilizado na detecção de DNA de leptospira em amostras clínicas, baseado em Multiplex-PCR, para amostras de água, utilizando dois sets de iniciadores que permitem a diferenciação de espécies patogênicas e não patogênicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em uma zona de proteção ambiental (ZPE) dentro dos limites de Petrópolis, estado do Rio de Janeiro. Amostras de água foram coletadas em um povoado chamado Contorno, entre o período de maio-julho de 2009. Esta área apresenta características semelhantes às áreas de favelas nas áreas urbanas do Brasil e é o lar de cerca de 440 pessoas. Não há saneamento básico e a água que vem de uma nascente de pequeno porte é armazenada em um reservatório que é usado para toda a comunidade. Na ausência de um sistema de esgoto, o esgoto é descartado diretamente no meio ambiente sem tratamento prévio. Um total de 100 amostras de água foram coletadas a partir do abastecimento de água que é distribuída para toda a comunidade (50 pontos diferentes) de pequenos lagos (25 pontos diferentes) e águas de superfície (25 pontos diferentes), onde os seres humanos e animais domésticos e silvestres podem compartilhar o risco de infecção. Um total de 125 mL de água foram coletados de cada local pré-determinado em frascos de polipropileno estéreis e transportados em uma caixa de gelo para o laboratório. As amostras foram mantidas a 4°C e processadas dentro de 24 h.

Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica, conforme descrito por Tansuphasiri et al. (2006b), com algumas modificações. Resumidamente, a fim de concentrar as amostras de água, estas foram filtradas através de duas membranas de nitrocelulose (Millipore, Irlanda) de diferentes tamanhos de poros: 0,45 µm seguido de filtro de 0,22 µm. Cada um dos filtros usados para cada amostra foram separadamente cortados em pedaços pequenos e transferidos para um tubo de 15 ml de polipropileno e armazenados a -20°C antes da extração do DNA.

Como controles positivos, duas amostras diferentes de 125 mL de água estéril, foram inoculadas artificialmente com 10⁶ células obtidas a partir de culturas de cepas de referência de *Leptospira interrogans* sorovar M20 cepa Copenhageni (patogênica) e *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1 (saprófita). O processamento foi o mesmo descrito anteriormente. Além disso, os controles negativos consistiam de 125 mL de água estéril artificialmente contaminadas com *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*.

Inicialmente, 1 mL de solução de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, EDTA 1 mM, 150 mM NaCl, 1% Triton X-114) contendo 1 mg/mL de proteinase K (Invitrogen, EUA) foi adicionado aos tubos contendo os pedaços dos filtros, sendo incubados a 65°C por 15 min. Em seguida, um volume correspondente a 1,2 mL de clorofórmio foi adicionado e misturado por vortex. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 10 min (4°C) e a fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrifuga contendo 80 mL de álcool isopropílico a 0,8% e misturados novamente por vortex. Após centrifugação a 15.000 g por 20 min (4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em uma solução contendo 170 µL de NaCl 1,2 M e RNase a 4 mg/mL (Invitrogen, EUA) e em seguida incubadas a 37°C por 15 min. Como etapa final, 425 µL de etanol absoluto frio foram adicionados para precipitar o DNA e cada amostra foi incubada a -20°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 100 µL de etanol 75 % gelado. O DNA seco foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE estéril (1 M Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M EDTA) e armazenado a -20°C.

A amplificação do gene *lipL32*, que codifica para a lipoproteína de membrana externa LipL32, e do gene 16S RNA ribossomal (rRNA), foi realizada utilizando-se os iniciadores descritos por Alves et al. (2006) e Tansuphasiri et al. (2006a), respectivamente. A sequência do iniciador *forward* do gene *lipL32* foi: 5'ATCTCCGTTGCACTCTTTGC3' e do iniciador *reverse* foi: 5'ACCATCATCATCATCGTCCA3'. A sequência do iniciador *forward* do gene 16S rRNA foi: 5'GAACTGAGACACGGTCCAT3' e do iniciador *reverse* foi: 5'GCCTCAGCGTCAGTTTTAGG3'. Estes dois pares de iniciadores permitiram distinguir entre as espécies de *Leptospira* patogênicas e saprófitas. Ambos os genes são amplificados em espécies patogênicas, mas apenas rRNA 16S é amplificado nas espécies saprófitas (Tansuphasiri et al. 2006a).

O PCR-Multiplex foi realizado em um volume de reação final de 25 µL. Todas as reações continham: tampão 1X livre de magnésio, 1 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10 µM de cada iniciador, 1U de *Taq* polimerase (QIAGEN). A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta. Os iniciadores *lipL32* e 16S rRNA produziram fragmentos de 474 pb e 430 pb, respectivamente.

1. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

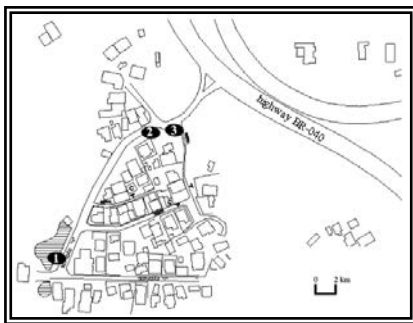


Figura 1: Área de estudo: Comunidade do Contorno - Petrópolis/RJ. Ponto 1- lago; Ponto 2- ponto da rede de distribuição de água; Ponto 3- depósito de lixo.



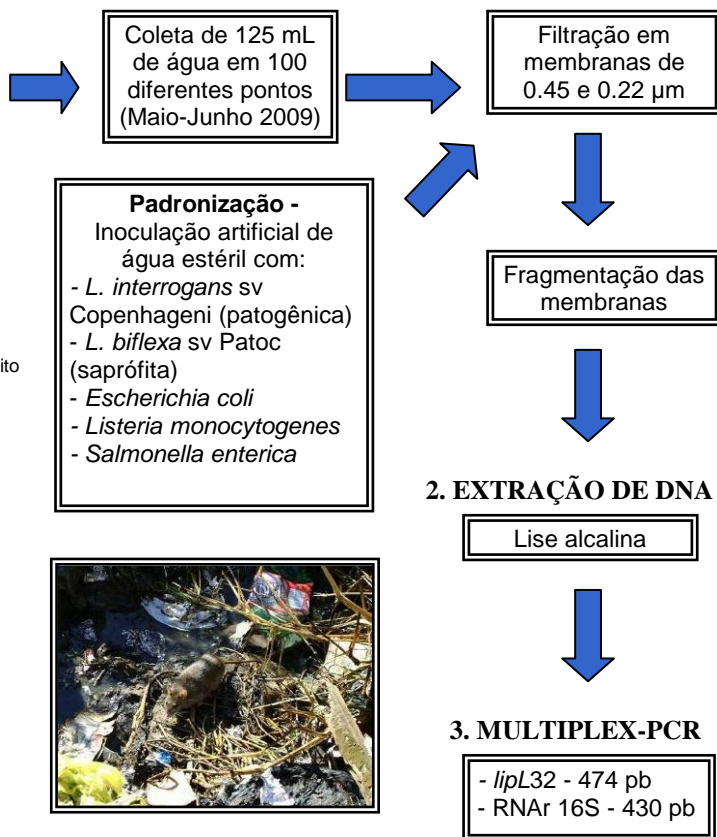
Figura 2: Ponto de coleta 1



Figura 3: Ponto de coleta 2



Figura 4: Ponto de coleta 3



APOIO FINANCEIRO: Águas do Imperador/SA, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A principal razão para a pesquisa de leptospiros em águas de superfície da Comunidade do Contorno, um assentamento localizado em uma zona de proteção ambiental (ZPE), foi a ocorrência de um caso fatal de leptospirose humana. O histórico epidemiológico deste caso sugeria uma possível associação entre atividade ocupacional e exposição prolongada, sem equipamentos de proteção individual (EPI) adequados, em pequenos lagos localizados nesta Comunidade (Fig. 2).

Três das 100 amostras de água coletadas em diferentes pontos da Comunidade apresentaram reação positiva no Multiplex-PCR. O protocolo aplicado, uma adaptação daquele previamente utilizado em nosso Laboratório para amostras clínicas, provou ser efetivo na detecção de DNA de leptospiros em amostras ambientais de água (dados não mostrados).

Não foram detectadas reações positivas quando o DNA de outras espécies bacterianas foi utilizado como controle (dados não mostrados). É importante ressaltar que estes microrganismos são patógenos comumente associados a infecções transmitidas pela água. Esse resultado demonstra que os sets de iniciadores 16S rRNA e lipL32 amplificam especificamente DNA de Leptospira.

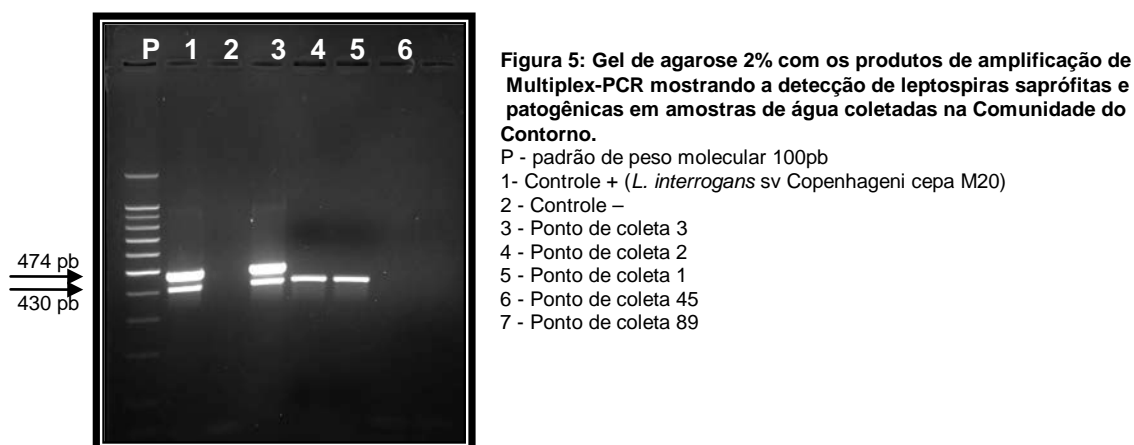
Um total de 97% das amostras analisadas foram negativas para a amplificação dos genes RNAr 16S e lipL32.

Na Figura 5, linhas 4 e 5, é possível observar a amplificação referente apenas ao gene RNAr 16S, utilizando um iniciador universal para espécies de *Leptospira*. A detecção desta banda específica ocorreu em somente 2% das amostras: no pequeno lago localizado em frente à creche (Fig. 1, marcador 1 e Fig. 2), e em um dos pontos da rede de distribuição de água que atende toda a Comunidade (Fig. 1, marcador 2 e Fig. 3). A amplificação de um gene associado ao RNA ribossomal não permite a distinção entre leptospiros saprófitas e patogênicas, uma vez que RNAr 16S é comum aos dois grupos.

Na Figura 5, linha 3, é possível observar a amplificação correspondente aos dois sets de iniciadores, indicando a detecção de leptospiros patogênicos. Essa afirmação se baseia na observação de que LipL32 é a principal proteína de membrana externa encontrada na superfície de leptospiros patogênicos, sendo altamente conservada entre essas espécies.

A amostra associada a leptospiros patogênicos foi coletada em água empoçada próximo ao depósito de lixo (Fig. 1, marcador 3), que possivelmente foi contaminada pela urina de animais silvestres ou domésticos e/ou roedores, cuja presença foi observada no dia da coleta (Fig. 4). Descrições prévias relatam que além destes animais serem importantes na determinação do risco de transmissão do patógeno, eles podem ser considerados como fontes persistentes de leptospiros.

É importante ressaltar que, por tratar-se a Comunidade do Contorno de um assentamento inserido em uma área com restrição ambiental, a concessionária local fica impossibilitada de implementar uma rede de condução de água potável e de tratamento de esgoto. Dessa forma, o conjunto de soluções proposto seria: autorização emergencial para implantação da rede de água e de esgotos, assim como de biosistemas integrados; retirada das casas; melhoria do sistema de coleta de lixo.



CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a metodologia utilizada permite a detecção de genes de espécies saprófitas e patogênicas de *Leptospira* a partir de amostras de água, sendo útil no monitoramento de contaminação ambiental por esse microrganismo, permitindo o acompanhamento da incidência do mesmo em áreas endêmicas e para o controle do risco de leptospirose humana.

Ressaltamos ainda a necessidade de ações governamentais no sentido de ampliar a fiscalização, para que ocupações indevidas não ocorram, especialmente em locais com restrições ambientais, ou na aplicação de medidas corretivas, conforme proposto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, P. A.; Leptospira e leptospirose. *Vet. Microbiol* 140: 287-296. 2009.
- ALVES, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, L. M.; VIJAYACHARI, P.; MACHANGU, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A.; Multilocus sequência de tipagem para identificação e classificação genotípica das espécies patogênicas de *Leptospira*. *Ann Antimicrob Clin Microbiol* 5: 28. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.
- CRODA, J. H. R. Patogênese da síndrome pulmonar hemorrágica na leptospirose humana. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia. São Paulo. 2008.
- DIAS, J. P.; TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C.; MENDES, C. M.; GUIMARÃES, R. P. M. G.; BARRETO M. L. Fatores associados à leptospirose, infecção em um grande centro urbano do Nordeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 499-504. 2007.
- FONTES, A. P. A.; RIBEIRO, D. P.; JESUS, L. S. B.; ALMEIDA, M. L. D. & SILVA, Â. M. Aspectos funcionais respiratórios na leptospirose humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(2):161-165, mar-abr, 2010.
- GANOZA, C.A.; MATTHIAS, M. A.; COLLINS-RICHARDS D. B.; CUNNINGHAM, C. B.; SEGURA, E. R.; GILMAN, R. H.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Determinação de risco para a forma grave da leptospirose por análise molecular das águas de superfície ambiental para *Leptospira* patogênica. *PLoS Med* 3: 308. 2006.
- JOUGLARD, S. D. D. Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira* spp. por sequenciamento do 16S rDNA e análise de VNTR. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pelotas. Outubro de 2005.
- MATHUR, M. A.; TURBADKAR, D. Leptospirose surto em 2005: experiência do Hospital LTMG. *Indian J Med Microbiol* 27: 153-155. 2009.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M.G. Leptospirose. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376-386. 2005.
- OLIVEIRA, D. S. C.; GUIMARÃES, M. J. B. & MEDEIROS, Z. Modelo produtivo para leptospirose. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 38(1): 17-26. Jan-Mar. 2009.
- REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D. M.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X. T. O.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; ALBERT, I. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2(4): e228. doi:10.1371/journal.pntd.0000228. 2008.
- SARKAR, U.; NASCIMENTO, S.F.; BARBOSA, R.; MARTINS, R.; NUEVO, H.; KALAFANOS, I.; GRUNSTEIN, I.; FLANNERY, B.; DIAS, P.V.; RILEY, J.; REIS, M.G. Inquérito de base populacional caso-controle de fatores de risco para leptospirose, durante uma epidemia urbana. *Am J Trop Med Hyg* 66: 605-610. 2002.
- TANSUPHASIRI, U.; CHANTHADEE, R.; PHULSUKSOMBATI, D.; SANGJUN, N. Desenvolvimento de uma reação em cadeia da polimerase duplex para uma rápida detecção de leptospirosas patogênicas. *Sudeste Asiático J Trop Med Saúde Pública* 37: 297-308. 2006a.
- TANSUPHASIRI, U.; THIPSUK, C.; PHULSUKSOMBATI, D.; CHANYASANHA, C. Duplex PCR hibridização de detecção de leptospirosas patogênicas com base em amostras de água ambientais provenientes das áreas endêmicas na Região Nordeste da Tailândia. *Sudeste Asiático J Trop Med Saúde Pública* 37: 729-741. 2006b.
- TEREZA, M. V. P. Q. Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da leptospirose. Tese (Doutorado) Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Departamento de Química. LISBOA. 2009.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirose: um problema emergente de saúde pública mundial. *J Biosci* 33: 557-569. 2008.