

DE660 - Doenças endêmicas negligenciadas

[826] **DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE REAL TIME REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) PARA ESTUDO DE PATOGENESE DE LEPTOSPIRA NO MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE HAMSTER.**

WUNDER JÚNIOR, E.A.¹; SANTOS, C.S.²; DOS REIS, M.G.³; KO, A.I.⁴.

1,2,3.Cpqgm/fiocruz, Salvador, Ba, Brasil; 4.Cornell University, New York, Zz, Estados Unidos.

Resumo:

Introdução: A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* e causa uma infecção sistêmica com manifestações graves, como a doença de Weil, e a síndrome de hemorragia pulmonar. Após a penetração, a disseminação rápida do patógeno nos tecidos do hospedeiro é um fator essencial na patogênese da doença. A capacidade do hospedeiro em evitar essa disseminação é fundamental na proteção contra a doença. As vacinas de bacterinas e de subunidades são capazes de induzir essa proteção, porém não sabemos em que momento após a infecção ocorre a eliminação do agente. Novos métodos, como o Real Time PCR, ainda não foram aplicados nos estudos de cinética de disseminação da leptospira e no papel das vacinas na imunoproteção contra a infecção sistêmica.

Objetivo: Padronizar um ensaio de Real Time PCR (TaqMan) para leptospirose, no modelo animal de hamster, para uso em estudos de disseminação, tropismo e proteção vacinal.

Material e Métodos: Utilizamos o método de Real Time PCR quantitativo para determinar a carga do patógeno em tecidos, baseado na detecção do gene *LipL32*. A curva padrão e o limite mínimo de detecção do teste foram determinados utilizando diluições seriadas de DNA da cepa L1 130. Diferentes concentrações de leptospiros foram adicionadas a 25mg de tecido renal e o DNA extraído foi analisado para determinar o limite de detecção em tecidos. Nos estudos de infecção, grupos de 03 animais foram desafiados com 108 leptospiros e necropsiados em diferentes momentos após a infecção. Os tecidos foram coletados após perfusão e congelados para extração de DNA e análise quantitativa.

Resultados: A curva padrão com DNA genômico apresentou um limite de detecção entre 1-10 leptospiros por reação. Porém, o limite de detecção em tecidos infectados experimentalmente foi de 104 leptospiros/g de tecido. Os experimentos com animais desafiados com 108 leptospiros mostraram que, 24h após a infecção, foi possível detectar quantidades entre 102-103 leptospiros/g de tecido, sendo baço e rim os tecidos mais infectados. No quarto dia após a infecção, quando a letalidade é 100%, os números detectados chegaram a 105 leptospiros/g em todos os tecidos, com exceção de cérebro e coração que não passaram de 103 leptospiros/g. Esses números foram calculados com base na curva padrão com DNA, existindo portanto uma subestimação da quantidade de acordo com o limite de detecção em tecidos.

Conclusão: Os estudos com o ensaio de Real Time PCR mostraram ser possível detectar diferenças de infecção nos tecidos analisados. Determinamos que as leptospiros disseminam rapidamente para todos os tecidos após o desafio experimental em hamster e atingem uma carga de até 105 leptospiros/g de tecido antes do óbito. O uso desta técnica permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos de imunidade, infecção e papel da patogênese da leptospirose.