

## DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira* EM AMOSTRAS DE URINA DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE

Caroline Dantas Meira<sup>1</sup>  
Amauri Arias Wenceslau<sup>2</sup>  
Fábio Santos Carvalho<sup>1</sup>  
Janaína Maria Xavier Correa<sup>3</sup>  
George Rêgo Albuquerque<sup>2</sup>

### RESUMO

A leptospirose é uma zoonose importante, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A diversidade e inespecificidade dos sintomas podem dificultar o diagnóstico definitivo, sendo muitas vezes necessário a utilização de testes laboratoriais. Objetivou-se avaliar o uso do diagnóstico molecular de *Leptospira* spp. em urina de cães com suspeita clínica de leptospirose. Foram analisadas 15 amostras de urina de cães atendidos na rotina do Hospital Veterinário da UESC e do Centro de Controle de Zoonoses de Ilhéus-BA, sendo que, dois (13,3%) foram positivos na PCR e possuíam quadro sugestivo de leptospirose. Verificou-se que as amostras de urina que foram armazenadas a -20°C e sem tamponamento não houve amplificação do DNA, enquanto que nas amostras que foram imediatamente processadas e também sem tamponamento gerou um amplificado com 285 pb específico de *Leptospira* spp. de acordo com os *primers* G1 e G2 utilizados. A PCR pode ser recomendada como um método de diagnóstico complementar de leptospirose.

**Palavras-chave:** PCR, leptospirose, DNA, infecção, zoonose.

### MOLECULAR DETECTION OF *Leptospira* IN URINE SAMPLES OF DOGS NATURALLY INFECTED

### ABSTRACT

Leptospirosis is an important zoonosis caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. The diversity and multiplicity of symptoms may complicate the final diagnosis and is often necessary to use laboratory tests. The objective was to evaluate the use of molecular diagnosis of *Leptospira* spp. in the urine of dogs with clinical suspicion of leptospirosis. Were analyzed 15 urine samples from dogs treated in routine UESC Veterinary Hospital and the Center for Zoonosis Control from Ilheus, Bahia, of which two (13.3%) were positive by PCR and had suggestive signs of leptospirosis. It was found that the urine samples that were stored at -20 ° C and without buffering no DNA amplification, occurred while the samples that were processed immediately without buffering too generated a 285 bp amplified with specific *Leptospira* spp. in accordance with the G1 and G2 primers used. PCR can be recommended as a complementary diagnostic method of leptospirosis.

**Keywords:** PCR, leptospirosis, DNA, infection, zoonosis.

<sup>1</sup> Médicos Veterinários - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Bolsista FAPESB. E-mail: cdmeira@hotmail

<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, UESC. Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP: 45662-900, Ilhéus-Bahia-Brasil, Fone: 55 73 3680-5406. E-mail: wenceslau@uesc.br \*Autor para correspondência

<sup>3</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária - UESC. Bolsista de Iniciação Científica FAPESB

## DETECCIÓN MOLECULAR DE *Leptospira* EN MUESTRAS DE ORINA DE PERROS INFECTADOS NATURALMENTE

### RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis causada por espiroquetas patógenas importantes del género *Leptospira*. La diversidad y la multiplicidad de los síntomas pueden complicar el diagnóstico final, a menudo es necesario utilizar pruebas de laboratorio. El objetivo fue evaluar la utilización del diagnóstico molecular de *Leptospira* spp. en orina de perros con sospecha clínica de leptospirosis. Se analizaron 15 muestras de orina de los perros tratados en la rutina del Hospital Veterinario de la UESC y el Centro de Control de Zoonosis de Ilhéus, Bahía, de los cuales dos (13,3%) fueron positivas por PCR y había sugerentes de leptospirosis. Se encontró que las muestras de orina que se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y sin taponamiento no hubo amplificación de ADN, mientras que las muestras que fueron procesadas inmediatamente, y sin tamponamiento se generó un amplificado de 285 pb específico con *Leptospira* spp. de acuerdo con la primers G1 y G2 utilizados. La PCR puede ser recomendado como un método complementario de diagnóstico de la leptospirosis.

**Palabra-claves:** PCR, leptospirosis, ADN, infecciones, zoonosis.

### INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que pode acometer humanos, animais silvestres e domésticos (1,2).

No Brasil, assume caráter epidêmico relacionado, principalmente, às precárias condições de saneamento básico associado à consequente proliferação de roedores, que são os principais portadores da bactéria no meio urbano. Os cães são considerados a segunda principal fonte de infecção para o homem devido o contato com roedores ou com a urina contaminada (3). As principais fontes de infecção em áreas urbanas estão relacionadas principalmente a roedores.

O diagnóstico de doenças infecciosas com detecção de micro-organismo de crescimento lento ou daqueles que não são cultiváveis torna-se possível por meio das técnicas de biologia molecular. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais utilizadas, sendo um método rápido, sensível e específico, que possibilita o diagnóstico a partir de uma pequena amostra de DNA (4, 5).

Diversos estudos demonstram que a PCR é um método eficaz no diagnóstico de doenças causadas por bactérias, antes do desenvolvimento dos títulos de anticorpos ou quando os títulos estão baixos e o curso clínico não característico. No caso da leptospirose, os anticorpos são detectados somente cinco ou sete dias após a infecção, o que torna os testes sorológicos pouco eficientes na detecção de infecções onde o agente não induz uma resposta imune capaz de reagir com os padrões conhecidos (4, 6-8).

A comparação dos resultados obtidos entre a análise da urina e do soro pela PCR e da sorologia, utilizando a soroaglutinação microscópica (SAM), confirmou que a análise da urina pode ter mais sucesso que a análise do soro, tanto da PCR quanto da SAM, sendo informativa na primeira semana da doença (4). A utilização da PCR em urina de cães pode ser útil no diagnóstico precoce da leptospirose (9).

Objetivou-se avaliar a PCR no diagnóstico da *Leptospira* spp. na urina de cães infectados naturalmente com suspeita clínica da doença, utilizando-se o par de primers G1 e G2.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Área e animais de estudo:** Foram estudados 15 cães provenientes do município de Ilhéus, localizado no litoral sul do Estado da Bahia com suspeita clínica de leptospirose. As amostras de urina de 10 animais foram provenientes da rotina de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (HV-UESC). Amostras de cinco animais errantes foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilhéus-BA. Foi estabelecido o diagnóstico clínico baseado no histórico (nos casos dos animais domiciliados) e nas manifestações clínicas, como febre, anorexia, desidratação, prostração e/ou icterícia. A urina, na quantidade de 15 mL, foi coletada com sonda uretral estéril, transferida para tubos tipo Falcon, com capacidade para 50 mL e identificados, não sendo utilizando tamponantes. Metade da urina coletada foi congelada para posterior análise a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a outra foi processada imediatamente.

**Extração do DNA das amostras de urina:** Homogeneizou-se e aliquotou-se 10 mL da amostra de urina. Centrifugou-se os tubos a 17.000 g, descartou-se o sobrenadante e o sedimento ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de água miliQ. Centrifugou-se as amostras novamente e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se tampão de extração (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 500mM EDTA, pH 8,0; Proteinase K 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 1% de Triton X – 100). Cada amostra foi levada ao vórtex e aquecida em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos. Adicionou-se Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se a amostra manualmente. Centrifugou-se as amostras a 8.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com o auxílio de uma pipeta. Precipitou-se o DNA com Acetato de Amônio 5 M e etanol a 100%. As amostras foram incubadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após esse período, foram centrifugadas a 17.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e precipitado com etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 17.000 g por 15 minutos. O sedimento foi eluído em 60  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1mM EDTA, pH 8,0) . As amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da PCR.

**Condições de amplificação do DNA:** Preparou-se uma mistura de reagentes em um microtubo para capacidade para 200  $\mu\text{L}$  que consistiu em 1,5x de tampão Taq, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo (G1 e G2), 100  $\mu\text{M}$  de dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 2,5U, de Taq DNA Polimerase (Ludwing®). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para 20  $\mu\text{L}$ . A seguir foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. O sistema utilizou oligonucleotídeos específicos para amplificação de um fragmento do gene *secY* do genoma das espécies de *Leptospira*, exceto *L. kirschneri*, que possuíam as seguintes sequências nucleotídicas: G1[direto] - 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3'; G2 [reverso] - 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3'. O volume final da reação foi de 35  $\mu\text{L}$  (10).

**Amplificação do DNA:** Para a PCR foi utilizado um termociclador MJ96G-Biocyler. O primeiro ciclo consistiu de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Os 34 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Uma etapa final de 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  para extensão final. A visualização do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0 %, corado com brometo de etídeo e fotodocumentado em transiluminador (L-PIX Loccus Biotecnologia). Os fragmentos amplificados na PCR foram comparados com o controle positivo isolado de cão com sinais clínicos para leptospirose e positivo na PCR e sorologia.

## RESULTADOS

Dos 15 cães analisados, dois (13,3%) foram positivos para *Leptospira* spp., quando a urina não neutralizada foi processada imediatamente após a coleta, entretanto, as mesmas amostras processadas após o descongelamento apresentaram resultados negativos. O fragmento de DNA de *Leptospira* amplificado na PCR apresentou, aproximadamente, 285 pb (Figura 1).

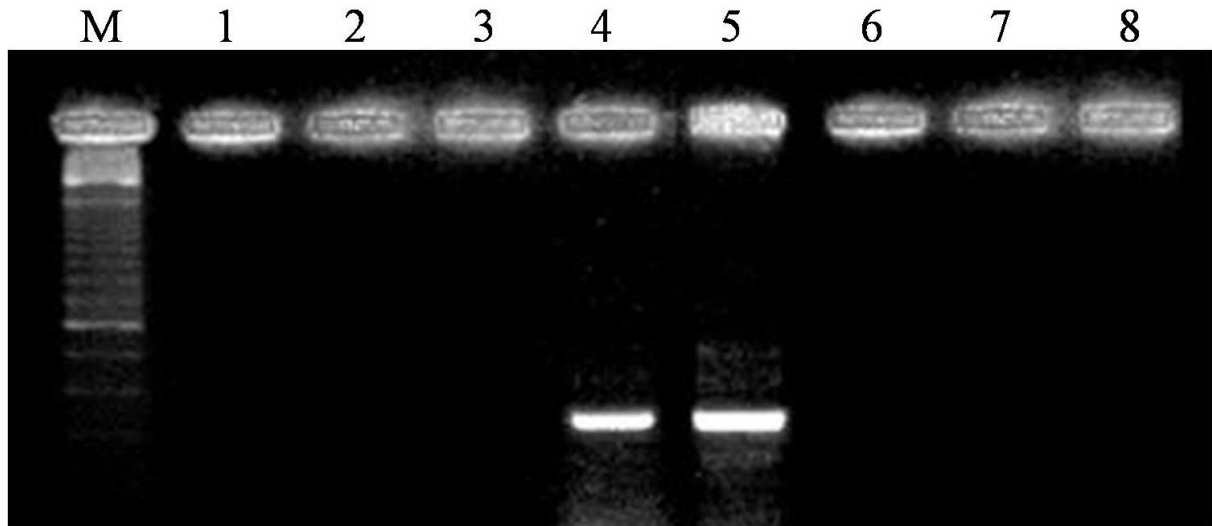


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2,0% dos produtos da PCR. M. Marcador molecular; 1-2-3-6-7: animais negativos; 4-5: animais positivos; 8: controle negativo

## DISCUSSÃO

A positividade de leptospirose com a PCR de amostras de urina de cães com quadro clínico sugestivo foi de 13,3%, resultado bem inferior aos encontrados na literatura que variam entre 50% e 90% (4,11), fato este que pode ter sido influenciado pela não neutralização das amostras no momento da coleta.

As amostras de urina congeladas e descongeladas antes do processamento podem produzir resultados negativos uma vez que algumas bactérias, inclusive a *Leptospira*, podem sofrer lise durante a estocagem a baixas temperaturas, estocagem em meios ácidos ou pelo contato com substâncias inibidoras na própria urina tais como uréia e creatinina (12,13). O ácido nucléico pode ser degradado na estocagem ou perdido junto ao sobrenadante após a centrifugação utilizada nas fases iniciais de extração do DNA para concentração dos microrganismos (13). Além disso, existe a possibilidade de que a alíquota utilizada não apresentasse a bactéria uma vez que a sua eliminação pela urina é intermitente (14).

O congelamento pode provocar a lise das bactérias, sendo recomendado o processamento da amostra no mesmo dia da coleta da urina, principalmente, quando não se usa um tamponante para neutralizar a grande quantidade de inibidores enzimáticos que podem prejudicar a PCR. A padronização e a escolha correta do protocolo de extração do DNA, escolha dos reagentes e dos *primers* para a PCR, são essenciais no sucesso do diagnóstico precoce da infecção.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os obtidos por Riediger (15), que demonstram a especificidade do conjunto de oligonucleotídeos G1/G2 na análise de amostras de urina no diagnóstico da leptospirose.

## CONCLUSÕES

O processamento das amostras de urina de cães (não neutralizadas e congeladas), talvez não seja adequado para a realização da PCR para diagnosticar a leptospirose, porque geraram resultados falso-negativos.

## REFERÊNCIAS

1. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:757-71.
2. Levett PN. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clin Appl Immunol Rev.* 2004;4:435-48.
3. Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin OA. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38:294-300.
4. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1894-8.
5. Molina AL, Tobo PR. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein.* 2004;2:139-42.
6. Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1035-9.
7. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296-326.
8. Sachse K, Frey J. PCR detection of microbial pathogens. Totowa: Humana Press; 2003.
9. Akuzawa M, Tanaka M, Murakami T, Oishi A, Deguchi E, Misumi K, et al. PCR for detecting *Leptospira* in canine urine and its clinical applications. *J Jpn Vet Med Assoc.* 2001;54:288-92.
10. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol.* 1993;139:1691-700.
11. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol.* 1995;4:110-4.
12. Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly JM, Cappellen WA, et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J Cell Biol.* 2004;166:27-36.
13. Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37:131-4.

14. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Genève: World Health Organization; 1982.
15. Riediger IN. Comparação dos diagnósticos sorológico e molecular da leptospirose humana na região metropolitana de Curitiba, Paraná [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007 [cited 2009 Jan 16]. Available from: <[http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/13635?mode=full&submit\\_simple=Show+full+item+record](http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/13635?mode=full&submit_simple=Show+full+item+record)>.

**Recebido em: 25/05/10**

**Aceito em: 07/02/11**