



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELEINE KUROKI ANZAI

**UTILIZAÇÃO DA PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEPTOSPIROSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leptospira* spp**

Londrina
2006

ELEINE KUROKI ANZAI

**UTILIZAÇÃO DA PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEPTOSPIROSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leptospira* spp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Julio César de Freitas.

Londrina
2006

ELEINE KUROKI ANZAI

**UTILIZAÇÃO DA PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEPTOSPIROSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *Leptospira* spp**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Animal - FMVZ/USP

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva -
UEL

Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva -
UEL

Londrina, 28 de Junho de 2006.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Leptospirose, Virologia Animal e Anatomia Patológica, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Área de Concentração Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento a pesquisa abaixo relacionadas:

- 1. PROPG:** Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.
- 2. CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Ensino Superior.
- 3. Seti:** Secretária de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior - Unidade Gestora do Fundo Paraná

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que tem me dado ao longo da minha vida.

Aos meus pais Yoshio e Marie pelo amor, carinho, apoio e por acreditarem em mim em todos os momentos de minha vida e por tornar os meus sonhos possíveis. A minha irmã Evelyn que tanto a admiro e que sempre me levantou nos momentos mais difíceis. Ao meu cunhado Márcio, pela ajuda e amizade. Mesmo tão distante de casa, sinto muitas saudades e dedico todo esse trabalho a vocês.

Ao professor e orientador Julio Cesar de Freitas, pela amizade e enorme colaboração na minha formação, tanto profissional quanto pessoal em todos esses anos de graduação e pós-graduação. Pela ajuda, paciência e conselhos, principalmente, nessa nova fase de minha vida e nesse conturbado final do mestrado. Você não foi apenas um orientador, mas um amigo que me ajudou e me aconselhou em todos esses momentos.

Ao professor Dr. Amauri Alcindo Alfieri pelas orientações, auxílio na realização deste trabalho e carinhosamente por me receber no Laboratório de Virologia Animal.

Ao professor Dr. Silvio de Arruda Vasconcellos e a todos do VPS/FMVZ/USP, especialmente, a Zenaíde, pelo uso livre e irrestrito do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, além do valioso auxílio durante a minha formação acadêmica.

À professora Alice Fernandes Alfieri, pela amizade, carinho e constantes ensinamentos.

Aos professores Antônio Carlos, Carmen Hilst, Giovana, Batata e aos residentes de Pequenos Animais pela ajuda e colaboração nesse trabalho.

À técnica e amiga do Laboratório de Leptospirose Lucimara, por toda prática laboratorial adquirida, pelo carinho e amizade em todos esses anos.

À técnica do Laboratório de Virologia Animal Kérlei, pela amizade, carinho e auxílio durante todo esse trabalho.

À técnica do Laboratório de Microbiologia, Luciene, pela amizade e incentivo.

Aos técnicos Zé, Maria, Dalíria, pela atenção e carinho dados durante esses anos de convívio.

A minha amiga Vanessa, praticamente irmã, que sempre esteve do meu lado, principalmente, nos momentos mais difíceis. Por estar sempre disposta a me ajudar e pela sua família maravilhosa que acabei adotando nos anos que estive em Londrina.

A Fran, pela amizade que se criou em todos esses anos de convívio, pelos ensinamentos e conselhos transmitidos.

A Bruna, pela amizade e pelos momentos engraçados que passamos juntas.

Aos amigos Alexandre, Betinha, Flora, Gleí, Juliana, Mara, Marlise, Dú pela amizade, companheirismo e momentos divertidos que passamos nesses anos de UEL.

A Maria Fernanda, Daniela Dib, Kledir, Luciano, pela amizade e apoio.

Aos amigos de graduação e pós-graduação, Juliana Galhardo, Kátia, Paula, Michelle, Letícia, Rosa, pela amizade e companheirismo.

Aos meus novos amigos de Santa Catarina, Márcia, Gerson, Gustavo, Alessandra, Renata, Elaine e Leandro, que em pouco tempo de convívio, tornaram-se ótimos amigos e me ajudaram em todo esse período de mudanças e adaptação.

A todos os meus amigos.

*"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor
mas lutamos para que o melhor fosse feito..."*

Não somos o que devíamos ser.

Não somos o que iremos ser.

Mas, graças a Deus,

Não somos o que éramos."

Martin Luther King

ANZAI, E. K. **Utilização da PCR para o diagnóstico da leptospirose em cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp.** 2006. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

A leptospirose canina é uma das principais zoonoses de distribuição mundial. Nos cães, os sinais clínicos podem ser vagos ou inaparentes, não apresentando um quadro característico. A gravidade das manifestações clínicas depende não somente da dose e virulência do sorovar infectante, como também da susceptibilidade do hospedeiro e dos órgãos e sistemas atingidos. O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas laboratoriais, baseadas na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético, porém todas elas apresentam inconvenientes para a sua utilização. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica da PCR com os *primers* Lig1 e Lig2, que amplificam o fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp, em amostras de urina, fragmentos de rim, fígado e pulmão de 19 cães com suspeita clínica de leptospirose. Amostras de sangue e urina foram coletadas durante o exame físico. As amostras de sangue foram submetidas à técnica de soroaglutinação microscópica e as amostras de urina, ao exame direto da urina em microscopia de campo escuro e à técnica da PCR. Os fragmentos de rim, fígado e pulmão coletados durante a necropsia foram processados e utilizados na PCR. Resultados positivos foram encontrados na SAM, CE e PCR de fragmentos de rim e fígado de dois cães; na SAM, CE e PCR de fragmento de rim e amostra de urina de um cão, somente na PCR de fragmento de rim de um cão e somente na SAM de quatro cães. Resultados negativos em todas as técnicas foram encontrados em 10 animais. Este estudo mostrou a viabilidade do diagnóstico da leptospirose pela PCR utilizando os *primers* Lig1 e Lig2 em amostras biológicas de cães infectados naturalmente.

Palavras-chave: Cães. Leptospirose. Diagnóstico. PCR.

ANZAI, E. K. **Use of PCR for the diagnosis of leptospirosis in dogs naturally infected by *Leptospira* spp.** 2006. 35p. Dissertation (Máster Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Leptospirose canine is one of main zoonosis of world-wide distribution. In the dogs, the clinical signals can be vague or inaparentes, not even typical clinical manifestation. The gravity of the symptoms is depend not only inoculated dose and virulence of infecting stain and serovar but also depend on the host susceptibility . Diagnosis of leptospirosis can be made by different laboratory techniques, based in the direct or indirect detention of the agent or the genetic material, however all they present inconveniences for its use. The present work had as objective to evaluate the technique of the PCR with primers Lig1 and Lig2, that they amplify 468 pb of the amino-terminal region of the genes *ligA* and *ligB* of *Leptospira* spp, in samples of urine, fragments of kidney, liver and lung of 19 dogs with clinical suspicion of leptospirosis. Blood and urine samples were collected during the physical examination. Blood samples were tested by microscopic agglutination and urine samples were examined by dark-field microscopy and PCR technique. The kidneys, liver and lung fragments were collected at the necropsy and submitted to PCR technique. Positive results had been found in SAM, CE and PCR of kidney and liver fragments of two dogs; in SAM, CE and PCR of kidney fragment and urine sample of a dog, in the PCR kidney fragment of a dog and only in SAM of four dogs. Negative results in all the techniques had been in 10 animals. This study showed to the viability of the diagnosis of leptospirosis for the PCR using primers Lig1 and Lig2 in biological samples of dogs naturally infected.

Keywords: Dogs. Leptospirosis. Diagnosis. PCR.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	10
Diagnóstico laboratorial da leptospirose	10
Referências	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	18
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	19
3.1 DETECÇÃO PELA PCR DOS GENES <i>LIGA</i> E <i>LIGB</i> DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA DE LEPTOSPIROSE.....	19
Resumo	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Material e métodos	22
Resultados e discussão	24
Referências	27
3.2 LEPTOSPIROSE CANINA: DIAGNÓSTICO PELA PCR E TÉCNICAS PADRÕES	29
Resumo	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Casuística.....	31
Discussão.....	33
Referências	35

1 REVISÃO DE LITERATURA

Diagnóstico laboratorial da leptospirose

A leptospirose canina é um problema de grande importância na saúde pública. Nos cães, os sinais clínicos podem ser vagos ou inaparentes, não apresentando um quadro característico, sendo a gravidade das manifestações clínicas dependentes não somente da dose e virulência do sorovar infectante, como também da susceptibilidade do hospedeiro e dos órgãos e sistemas atingidos (GIRIO, 1993).

O rápido diagnóstico da leptospirose é de extrema importância, principalmente para a eficácia do tratamento do paciente. Entretanto, devido à alta ocorrência de sinais inespecíficos e manifestações variadas da doença, é difícil realizar o diagnóstico da leptospirose canina com base em apenas sinais clínicos ou patológicos de rotina (BOLIN, 1996).

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas laboratoriais baseadas na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético (FAINE et al., 1999; SANTA ROSA, 1970), porém todas apresentam inconvenientes. A soroaaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos é a mais utilizada em todo o mundo (FAINE et al., 1999). A técnica consiste principalmente na reação entre anticorpos presentes no soro contra os antígenos encontrados na superfície da leptospira (LEVETT, 2001). Reações cruzadas entre sorovares, títulos vacinais e o início da fase aguda da enfermidade são fatores importantes na interpretação dos resultados laboratoriais, sendo assim os testes sorológicos devem ser realizados levando em consideração dados epidemiológicos, bem como as informações obtidas na anamnese e no exame físico (BOLIN, 1996).

A visualização direta de leptospiros em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospiúria. Entretanto, essa técnica apresenta como limitações, baixa sensibilidade, necessidade de observador experiente, eliminação de forma intermitente de leptospira pela urina e lise pelo pH ácido da urina (BOLIN et al., 1989).

O exame bacteriológico da *Leptospira* spp é considerado a técnica definitiva no diagnóstico da leptospirose e proporciona a identificação do sorovar infectante com possibilidade de estudos epidemiológicos e profiláticos da enfermidade, mas o isolamento

deste microrganismo é difícil e pode levar semanas para apresentar crescimento (SANTA ROSA, 1970; VASCONCELLOS, 1987; FAINE et al., 1999).

A técnica de imunoperoxidase indireta, utilizando soro hiperimune com anticorpos contra sorovares de leptospiros, tem sido usada para o diagnóstico em órgãos de animais infectados (SCANZIANI et al., 1991). A técnica possibilita a localização de leptospiros em cortes histológicos e a visualização simultânea do agente e das lesões microscópicas (SCANZIANI et al., 1991; FAINE et al., 1999). Entretanto, tem como inconvenientes a necessidade da integridade da estrutura e antigenicidade da leptospira que pode ser facilmente alterada durante a estocagem e o processamento da amostra (SCANZIANI et al., 1991).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico precoce da leptospirose no homem e em várias espécies animais. A técnica da PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas do DNA do microrganismo em diversos tipos de amostras biológicas tais como humor aquoso (MERIEN et al., 1993), urina (BAL et al., 1994), soro sanguíneo (BROWN et al., 1995), líquido (ROMERO et al., 1998) e tecidos (BROWN et al., 2003). O método consiste na amplificação exponencial *in vitro* de regiões específicas de DNA em um curto espaço de tempo. Cada ciclo consiste de três fases: 1) desnaturação das fitas de DNA; 2) anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ao DNA molde; 3) síntese do DNA específico utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase. As moléculas amplificadas pela técnica da PCR são facilmente detectadas e identificadas pela eletroforese (BELAK; BALLAGI-PORDÁNY, 1993).

Atualmente, estão disponíveis grande número de técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial de rotina para leptospirose, porém nenhuma associa as exigências de sensibilidade, especificidade e praticidade (LEVETT, 2001). Excetuando os custos iniciais para a aquisição de equipamentos, a técnica de PCR é específica, sensível, rápida e de baixo custo para o diagnóstico da leptospirose (HEINEMANN, 1999). No entanto, apresenta como limitações, a incapacidade de identificar o sorovar infectante. Enquanto isto não é significativo para o paciente individualmente, a identificação do sorovar tem valor epidemiológico e de saúde pública (LEVETT, 2004). A sensibilidade da PCR pode variar de acordo com a escolha dos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primer*), padronização dos reagentes empregados na técnica, seleção do material biológico, forma de conservação e tempo de estocagem da amostra, uma vez que o DNA pode facilmente sofrer degradação (VELOSO et al., 2000).

Diversos pares de *primers* foram desenhados para a técnica da PCR, alguns baseados em fragmentos de genes específicos (genes rRNA) ou seqüências derivadas da biblioteca genômica (LEVETT, 2001), porém poucos foram capazes de amplificar o DNA da leptospira em amostras clínicas de humanos (MÉRIEN et al., 1992, BROWN et al., 2003) ou de animais (WAGENAAR et al., 2000). *Primers* que amplificam apenas *Leptospira* gênero-específico são incapazes de diferenciar as leptospirosas patogênicas das não-patogênicas (LEVETT, 2001). Estes *primers* podem ser utilizados em amostras de sangue durante o estágio agudo da doença, porém não podem ser usados nos casos em que as amostras são naturalmente contaminadas com leptospira saprófita (BRANGER et al., 2005).

Van Eyes et al. (1989) trabalhando com amostras de urina bovina experimentalmente contaminadas, demonstraram que a técnica da PCR pôde detectar 10pg de DNA de leptospira, o que corresponde a 10 bactérias por mL de urina. Gerritsen et al. (1991) após modificar o protocolo desenvolvido por Van Eyes et al. (1989) conseguiram detectar a presença de 5 a 10 bactérias por mL de urina bovina.

Gravekamp et al. (1991) desenharam o par de *primers* denominado G1 e G2 que não amplifica os sorovares da espécie *L. kirschneri*, necessitando portanto do uso de dois pares de *primers* para a detecção de todos os sorovares patogênicos. Os *primers* Lep1 e Lep2 desenhados por Mérien et al. (1992) amplificam um fragmento de 331 pb do gene rrs (16S rRNA) de *Leptospira interrogans* sorovar Canícola. Esses *primers* revelaram ser específico para *Leptospira* spp, não amplificando o DNA de outras bactérias como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum* entre outras. Entretanto, como os *primers* Lep1 e Lep2 não são capazes de diferenciar leptospirosas patogênicas das não-patogênicas. Resultados falso-positivos poderão ocorrer numa eventual contaminação com leptospira não-patogênica.

A aplicação da PCR no diagnóstico clínico da leptospirose foi avaliada por Kee et al. (1994) em amostras de sangue de cobaias experimentalmente infectados com *L. interrogans*. A PCR foi capaz de detectar DNA da leptospira dois dias após a infecção experimental, enquanto anticorpos só puderam ser detectados pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) sete dias após a infecção.

Tendo em vista a possibilidade da transmissão venérea da leptospirose bovina, Heinemann et al. (1999) demonstraram que a técnica da PCR pode ser utilizada para assegurar a produção de sêmen livre de *Leptospira* spp em centrais de inseminação artificial.

A eficácia da técnica da PCR em amostras de tecidos humanos autolisados, obtidos no *postmortem* e mantidos refrigerados foi determinada por Brown et al. (2003). A

PCR foi considerada mais sensível na detecção de leptospiras, quando comparada com as técnicas de bacteriologia e imunofluorescência direta.

No Brasil, Shimabukuro et al. (2003) consideraram a técnica da PCR mais rápida e prática em relação ao exame bacteriológico para detecção de *Leptospira* spp em amostras renais de suínos obtidos de abatedouros. Embora não tenha sido possível a comparação da sensibilidade e especificidade dessas duas técnicas, esse estudo ressaltou a importância da PCR como diagnóstico para a identificação de suínos portadores renais e possíveis transmissores da bactéria para trabalhadores de abatedouro.

Palaniappan et al. (2005) desenvolveram o par de *primers* Lig1 e Lig2 que amplificam o fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp. A expressão dos genes *lig* é um fator de virulência encontrado apenas em leptospiras patogênicas (PALANIAPPAN et al., 2002). Esses genes não estão presentes nas leptospiras não-patogênicas (MATSUNAGA et al., 2003). O par de *primers* Lig1 e Lig2 foi considerado mais sensível em relação aos *primers* previamente descritos, quando testados em amostras de urina experimentalmente contaminadas com *Leptospira interrogans* patogênica.

O gene *hap1* (hemolysis-associated protein-1), expressa uma proteína somente em leptospiras patogênicas que quando usada como imunógeno, induziu a proteção clínica de animais modelos vacinados (BRANGER et al., 2001). Branger et al. (2005) desenvolveram e validaram a eficácia dos *primers* Adia214 e Adia215 desenhados a partir do fragmento do gene *hap1*. Diferentes estágios da leptospirose, em cães experimentalmente infectados, usando três técnicas de diagnóstico: PCR, cultura e a SAM em amostras de urina, sangue e órgãos e concluíram que a PCR é uma importante ferramenta no diagnóstico precoce da doença, bem como na identificação das fases de leptospiremia, portador renal e leptospirúria.

Mérien et al. (2005), Ootemann et al. (2005), Fonseca et al. (2006) demonstraram a importância da PCR no diagnóstico precoce da leptospirose humana e em pacientes em que o tratamento com antibióticos já tinha sido iniciado. A PCR foi capaz de detectar o DNA da leptospira em amostras de soro humano antes da detecção de anticorpos circulantes pela SAM e pela técnica de ELISA IgM (OOTMAN et al., 2005).

Na leptospirose canina, poucos foram os trabalhos que utilizaram a técnica de PCR no diagnóstico *ante-mortem* e *post-mortem* dessa enfermidade. Harkin et. (2003a, 2003b) demonstraram que a PCR é uma técnica bastante eficaz no diagnóstico precoce da leptospirose canina, permitindo que condutas adequadas de tratamento e de saúde pública sejam adotadas com maior antecedência.

REFERÊNCIAS

- BAL, A.E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERT, R.A.; DE MEZA BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W.J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.8, p. 1894-1898, 1994.
- BELAK, S.; BALLAGI-PORDANY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.17, n.1, p.55-72, 1993.
- BOLIN, C.A.; ZUENER, R.L.; TRUEBA, G. Comparisson of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.7, p. 1001-1003, 1989.
- BOLIN, C.A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging diseases of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine Surgery (Small. Animal)**, v.11, n.3, p.166-171, 1996.
- BRANGER, C.; SONRIER C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRE-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.11, p.6831-6838, 2001.
- BRANGER, C.; BLANCHARD, B.; FILLONNEAU, C.; SUARD, I.; AVIAT, F.; CHEVALLIER, B.; ANDRE-FONTAINE, G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.243, n.2, p.437-445, 2005.
- BROWN, P.D; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D.G.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, R.A.; EDWARDS, C.N.; EVERARD, C.O.R.; TERPSTRA, W.J.; LEVETT, P.N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.2, p.110-114, 1995.
- BROWN, P.D.; CARRINGTON, D.G., GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H; EDWARDS, C.N.; JONES, SR.; PRUSSIA, P.R.; GARRIQUES, S.; TERPSTRA, W.J.; LEVETT, P.N. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.154, n.4, p.581-586, 2003.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira and leptospirosis***. 2nd ed. Melbourne, Australia: MedSci; 1999, 326 p.

FONSECA, C.A.; TEIXEIRA, M.M.; ROMERO, E.C.; TENGAN, F.M.; SILVA, M.V.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Infection**, London, v.52, n.1, p.15-22, 2006.

GERRITSEN, M.J, OLYHOEK, T, SMITS, M.A, BOKHOUT, B.A. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.12, p. 2805-2808, 1991.

GIRIO, R.J.S. Abordagem clínica da leptospirose animal. In: Encontro Nacional em Leptospirose, 3.1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, p.59, 1993.

HARKIN, K.R.; ROSHTO, Y.M.; SULLIVAN, J.T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.222, n.9, p.1224-1229, 2003a.

HARKIN, K.R.; ROSHTO, Y.M.; SULLIVAN, J.T.; PURVIS, T.J.; CHENGAPPA, M.M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.222, n.9, p.1230-1233, 2003 b.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; GREGORI, F.; HIGA, ZM., VASCONCELLOS, S.A., RICHTZENHAIN, L.J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.73, n.4, p. 261-267, 2000.

KEE, S.H.; KIM, I.S.; CHOI, M.S.; CHANG, W.H. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.4, p. 1035-1039, 1994.

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

LEVETT. P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, Chicago, v.4, n.6, p.435-448, 2004.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p.929-945, 2003.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C.M.; MORAIS, Z.M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A. Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 77, n. 1, p. 32- 34, 1999.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.9, p. 2219-2224, 1992.

MERTEN, F.; PEROLAT, P.; MANCEL, E.; PERSAN, D.; BARANTON, G. Detection of leptospiral DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis. **Journal of Infections Diseases**, Boston, v.168, n. 5, p.1335-1336, 1993.

MERTEN, F.; PORTNOI, D.; BOURHY, P.; CHARAVAY, F.; BERLIOZ-ARTHAUD, A.; BARANTON, G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.249, n.1, p.139-147, 2005.

OOTEEMAN, M.C.; VAGO, A.R.; KOURY, M.C. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis.. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v.65, n.2, p.247-257, 2005.

PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; JUSUF, S.S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J.F.; MCDONOUGH, S.P.; BARR S.C.; DIVERS, T.J.; SIMPSON, K.W.; MCDONOUGH, P.L.; MOHAMMED, H.O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.11, p.5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; CHANG, C.F.; PAN, M.J.; YANG, C.W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S.P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.19, n.2, p.111-117, 2005.

RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S.A.; HIGA, Z.M.M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. The multiplex PCR goes the detection of *Brucella* spp and *Leptospira* spp DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.87, p. 139-147, 2002.

ROMERO, E.C.; BILLERBECK, A.E.; LANDO, V.S.; CAMARGO, E.D.; SOUZA, C.C.; YASUDA, P.H. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.5, p. 1453-1455, 1998.

SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1, n.2, 1970.

SCANZIANI, E.; LUINI, M.; FABBI, M.; PIZZOCARO, P. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.50, p.229-232, 1991

SHIMABUKURO, F.H.; DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PINHEIRO, J.P.; PADOVANI, C.R. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiroses pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, n.4, p.243-253, 2003.

VAN EYS, G.J.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M.J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M.T.; SCHEGGET, J.T.; TERPSTRA, W.J. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n.10, p. 2258-2262, 1989.

VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.11, n.1, p. 17-24, 1987.

VELOSO, I.F.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E; MOREIRA, E.C. A comparison of three DNA extractive procedure with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction Analysis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.339-343, 2000.

WAGENAAR, J.; ZUERNER, R.L.; ALT, D.; BOLIN, C.A. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, n.3, p. 316, 2000.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a técnica da PCR para o diagnóstico da leptospirose em materiais biológicos de cães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a técnica da PCR para o diagnóstico da leptospirose em cães com suspeita clínica da doença.
- Verificar a presença do DNA de *Leptospira* spp em amostras de urina e fragmentos de rim, fígado e pulmão de cães com suspeita clínica de leptospirose.
- Realizar a técnica da PCR com os *primers* Lig1 e Lig2 que amplificam parcialmente os genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 DETECÇÃO PELA PCR DOS GENES *LIGA* E *LIGB* DE *LEPTOSPIRA* SPP EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA DE LEPTOSPIROSE

RESUMO

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas laboratoriais baseadas na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica da PCR com os *primers* Lig1 e Lig2, que amplificam o fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp, em amostras de urina, fragmentos de rim, fígado e pulmão de 19 cães com suspeita clínica de leptospirose. Também foi realizada a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) e exame direto da urina em microscopia de campo escuro (CE). Resultados positivos foram encontrados na SAM, CE e PCR de fragmentos de rim e fígado de dois cães; na SAM, CE e PCR de fragmento de rim e amostra de urina de um cão; somente na PCR de fragmento de rim de um cão e somente na SAM de quatro cães. Resultados negativos em todas as técnicas foram encontrados em 10 animais. Este estudo mostrou a viabilidade do diagnóstico da leptospirose pela PCR utilizando os *primers* Lig1 e Lig2 em amostras biológicas de cães infectados naturalmente.

Palavras chaves: Cão. Leptospirose. PCR. Diagnóstico.

Detention for the PCR of the genes *ligA* and *ligB* of *Leptospira* spp in biological samples of dogs with clinical suspicion of leptospirose

ABSTRACT

Diagnosis of leptospirosis can be made by different laboratory techniques, based in the direct or indirect detention of the agent or the genetic material. The present work had as objective to evaluate the technique of the PCR with primers Lig1 and Lig2, that they amplify 468 pb of the amino-terminal region of the genes *ligA* and *ligB* of *Leptospira* spp, in samples of urine, fragments of kidney, liver and lung of 19 dogs with clinical suspicion of leptospirosis. Blood and urine samples were collected during the physical examination. Blood samples were tested by microscopic agglutination and urine samples were examined by dark-field microscopy and PCR technique. The kidneys, liver and lung fragments were collected at the necropsy and submitted to PCR technique. Positive results had been found in SAM, CE and PCR of kidney and liver fragments of two dogs; in SAM, CE and PCR of kidney fragment and urine sample of a dog, in the PCR kidney fragment of a dog and only in SAM of four dogs. Negative results in all the techniques had been in 10 animals. This study showed to the viability of the diagnosis of leptospirose for the PCR using *primers* Lig1 and Lig2 in biological samples of dogs naturally infected.

Keywords: Dog. Leptospirosis. PCR. Diagnosis.

Introdução

A alta ocorrência de sinais clínicos inespecíficos e de manifestações variadas da leptospirose em cães, torna o diagnóstico desta doença difícil de ser realizado com base apenas em sinais clínicos ou patológicos (BOLIN, 1996). Apesar da existência de várias técnicas laboratoriais para o diagnóstico da leptospirose, a grande maioria delas apresenta limitações (HARKIN; GARTRELL, 1996).

Entre os métodos de diagnóstico baseados na detecção do DNA da leptospira, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada, com mais frequência, na detecção da doença em várias espécies animais (VAN et al., 1989; BROWN et al., 1995; HEINEMANN et al., 1999; RICHTZENHAIN et al., 2002).

A técnica da PCR apresenta além da rapidez para a obtenção do resultado, alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas do DNA do microrganismo em amostras biológicas diversas como sangue, urina, humor aquoso e fragmentos de órgãos (MÉRIEN et al., 1992, HEINEMANN et al., 1999; RICHTZENHAIN et al., 2002, OOTMAN et al., 2005). Entretanto, na leptospirose esta técnica apresenta como limitação a incapacidade de identificar o sorovar infectante. Enquanto isto não é significativo para o paciente individualmente, a identificação do sorovar tem valor epidemiológico em saúde pública (LEVETT, 2004). A sensibilidade da PCR pode variar de acordo com a seleção da sequência alvo de nucleotídeos a ser amplificada, o método de extração do ácido nucléico, a padronização dos reagentes empregados na técnica, a seleção do material biológico, a forma de conservação e o tempo de estocagem da amostra uma vez que o DNA pode facilmente sofrer degradação (VELOSO et al., 2000).

Poucos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram capazes de amplificar o DNA da *Leptospira* spp em amostras clínicas provenientes de seres humanos (MÉRIEN et al., 1992) ou de animais (VAN et al., 1989; ZUENER et al., 1995; TAYLOR et al., 1997; MASRI et al., 1997; WAGENAAR et al., 2000).

Gravekamp et al. (1991) desenharam *primers* denominados G1 e G2 que não amplificam os sorovares da espécie *L. kirschneri*, necessitando o uso de dois pares de *primers* para a detecção de todos os sorovares patogênicos. Mérien et al. (1992) utilizaram os *primers* que amplificam um fragmento de 331 pb do gene *rrs* (16S rRNA) tanto de leptospiros patogênicas quanto de não-patogênicas.

Palaniappan et al. (2005) desenvolveram os *primers* Lig1 e Lig2 que amplificam o fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp, presentes em leptospirosas patógenicas. A expressão do genes *lig* é um fator de virulência encontrado apenas em leptospirosas patógenicas (PALANIAPPAN et al., 2002). Os *primers* Lig1 e Lig2, quando avaliados em amostras de urina de bovinos e equinos experimentalmente contaminadas com a *Leptospira interrogans* patogênica, foram considerados mais sensíveis em relação aos *primers* previamente descritos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica da PCR com os *primers* Lig1 e Lig2, que amplificam o fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp, em amostras de urina e fragmentos de rim, fígado e pulmão de cães com suspeita clínica de leptospirose.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 19 cães avaliados clinicamente em um Hospital Escola Veterinário, no período de janeiro a dezembro de 2005. Os animais que basicamente apresentavam anorexia, depressão, vômito, diarreia, febre, descarga oculonasal, mialgia ou dor abdominal foram considerados como suspeitos de leptospirose (WOHN, 1996). Os cães vieram a óbito entre algumas horas a cinco dias após o atendimento clínico.

Amostras biológicas

Amostras de sangue e urina foram coletadas durante o exame clínico. Os soros foram congelados a -20°C e posteriormente submetidos à técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). A urina foi dividida em duas alíquotas, sendo uma delas estocada imediatamente e mantida por até 90 dias a -20°C e a outra foi utilizada para o exame direto da urina em microscopia de campo escuro (CE) (SANTA ROSA, 1970). Durante a necropsia fragmentos de fígado, rim e pulmão dos cães foram coletados e mantidos a -20°C por até 90 dias.

Exame direto da urina em microscopia de campo escuro (CE)

Alíquotas de 10 µL de urina foram depositadas em uma lâmina de microscopia. A leitura foi realizada em microscópio óptico (Olimpus - Modelo Bx 40) com

aumento de 200x. A visualização de células com morfologia e movimentação compatíveis com leptospiros caracterizou o resultado positivo (FAINE, 1982).

Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM)

A SAM foi realizada com 21 sorovares de referência de *Leptospira*: Australis, Bratislava, Autumnalis, Fortbragg, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi e Sentot. Os soros que apresentaram 50% ou mais de leptospiros aglutinadas na diluição 1:100 foram considerados positivos e então diluídos seriadamente a razão dois até a determinação da diluição máxima positiva (FAINE et al., 1999).

Extração do ácido nucleico

Imediatamente após o descongelamento, 1 mL das amostras de urina foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C e o sedimento ressuspenso em 300 µL da própria urina.

Os fragmentos de rim, fígado e pulmão foram descongelados e triturados (10% p/v) em PBS, centrifugados a 3.000 x g por 15 min e os sobrenadantes foram recolhidos em frascos estéreis e novamente mantidos a -20°C até a extração.

A extração do DNA da leptospira foi realizada a partir de 300 µL da amostra de acordo com a técnica da sílica/tiocionato de guanidina (BOOM et al., 1990). Em todos os procedimentos foram incluídas, como controle negativo, uma alíquota de água ultrapura autoclavada e, como controle positivo, a estirpe LO 14, isolada pelo Laboratório de Leptospirose e identificada pelo Royal Tropical Institut-Amsterdã (KIT) como sorovar Canicola.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para a reação da PCR foram utilizadas alíquotas de 5 µL do DNA extraído; 20 pmol dos *primers*: Lig1 (sense) [5'tcaatcaaacagcggct3'] e Lig2 (anti-sense) [5'acttgcatggaaattgagag3'] (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1,6 mM de cada dNTP (Invitrogen®, EUA); 3,75 unidades de Taq DNA recombinante (Invitrogen®, Brasil); 1 X PCR buffer (20mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl); 2 mM MgCl₂ e água ultrapura autoclavada para o volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research Co - PTC-200, EUA) nas seguintes condições de tempo e

temperatura: i) uma etapa de desnaturação inicial de 4 min / 94°C; ii) 40 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min e 72°C por 1 min; iii) uma etapa de extensão final a 72°C por 7 min.

Alíquotas de 8 µL dos produtos da PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo (0,5 ng/mL) em tampão TBE pH 8,4 (89 mM TRIS, 89 mM ácido bórico; 2mM EDTA), sob voltagem constante (90V) durante aproximadamente 30 min e visualizado sob luz UV.

Análise estatística

A concordância Kappa foi utilizada para comparação entre as técnicas avaliadas no estudo Kappa (SMITH, 1995).

Resultados e discussão

Atualmente, um grande número de técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial de rotina para leptospirose canina estão disponíveis, porém nenhuma associa as exigências de sensibilidade, especificidade e praticidade. A técnica da PCR é específica, sensível e rápida para o diagnóstico da leptospirose (MÉRIEN et al., 2005; OOTEMAN et al., 2005; FONSECA et al., 2006). No entanto, a sensibilidade da PCR pode variar de acordo com a seleção do *primer*, método de extração do DNA e tipo de amostra clínica analisada. Palaniappan et al. (2005) testaram os *primers* Lig1 e Lig2 em amostras de urina de cães experimentalmente contaminadas com *Leptospira interrogans* patogênicas e considerou-o mais sensível em relação aos *primers* previamente descritos (GRAVEKAMP et al., 1991; MÉRIEN et al., 1992).

A PCR realizada no fragmento do rim dos cães 1, 2, 3 e 4 (tabela 1) apresentou resultado positivo, indicando a presença de leptospira neste órgão. A urina destes quatro animais também foi positiva no CE, entretanto na PCR somente a urina dos cães 3 e 4 foi positiva. Resultados negativos na PCR, de amostras de urina, podem ocorrer devido a presença de substâncias inibidoras da própria urina, tais como uréia, creatinina e radicais ácidos e fatores como pH ácido e o congelamento da amostra, antes de proceder a extração do DNA (BOOM et al., 2004; LUCCHESI et al., 2004). Estes fatores podem provocar a lise das leptospiros durante a estocagem da urina e como resultado, seu DNA pode ser perdido com o

sobrenadante após centrifugação para concentrar o microrganismo. Isto pode justificar os resultados negativos na PCR das amostras de urina dos cães 1 e 2.

O cão nº5 também apresentou resultado positivo na PCR do rim, entretanto a PCR da urina, fígado e pulmão, foram negativos. Além dos motivos já citados para a ocorrência de resultados negativos na PCR da urina, é possível ainda que a alíquota da urina utilizada, no cão 5, não apresentasse célula de leptospira, pois a sua eliminação pela urina é intermitente (FAINE, 1982). Esta hipótese é reforçada pelo resultado negativo, do CE, deste animal.

Os resultados positivos da PCR, do fígado, dos cães 1 e 2 e negativos dos cães 3 e 4 podem ser justificados pela permanência ou não das leptospiras no fígado. É provável que os cães 3 e 4 já haviam passado da fase de leptospiremia e estas bactérias tenham sido eliminadas do fígado.

Os resultados negativos na SAM dos cães 4 e 5 podem ser consequência de infecção causada por sorovar diferente dos presentes na bateria de antígenos utilizados na SAM, além da imunossupressão e incapacidade dos cães em montar uma resposta imune (FAINE, 1982).

Os cães de 6 a 9 foram positivos na SAM, porém negativos no CE e na PCR. Títulos de anticorpos contra leptospira encontrados na SAM podem ser resultantes de uma resposta vacinal ou de uma infecção, em que anticorpos aglutinantes para leptospira podem permanecer por meses (VASCONCELLOS, 1987) ou proveniente de contato, sem a evolução da infecção ou da doença (BOLIN, 1996).

A concordância Kappa entre o CE e a PCR foi alta e significativa ($\kappa=0,85$, $p<0,05$), no entanto, esta significância não ocorreu entre a SAM e a PCR ($\kappa=0,26$, $p>0,05$), não detectando concordância significativa entre as duas técnicas.

Resultados negativos em todos os métodos de diagnóstico utilizados, nos cães 10 a 19, porém todos com suspeita clínica de leptospirose, ressaltam a importância do diagnóstico laboratorial na exclusão da suspeita clínica, tanto da leptospirose quanto de outras enfermidades, que apresentam sinais clínicos semelhantes, para implementação de condutas adequadas de tratamento, de controle e de profilaxia.

Brown et al. (2003) consideraram a técnica de PCR mais sensível em material *post-mortem* na detecção de leptospiras quando comparada com os métodos de bacteriologia e imunofluorescência direta. Faine et al. (1999) afirmaram que as leptospiras sofrem a ação de substâncias inibitórias ou enzimas líticas nos tecidos *post-mortem*. Neste trabalho, os resultados positivos da PCR nos fragmentos de rim e fígado, mostram a

importância desta técnica nos casos onde é possível realizar o diagnóstico somente em material de necrópsia.

A PCR em amostras de urina também pode ser considerada uma prova rápida, de baixo custo, eficiente na identificação de portador renal e conseqüentemente de cães na fase de leptospirúria (BRANGER et al.;2005).

Enquanto Palaniappan et al, (2005) avaliaram os *primers* Lig 1 e Lig 2 somente em amostras de urina experimentalmente contaminadas com *Leptospira interrogans* patogênicas, este estudo demonstrou a viabilidade do diagnóstico da leptospirose pela PCR utilizando os *primers* Lig1 e Lig2, em amostras biológicas de cães infectados naturalmente.

Tabela 1 – Resultados da PCR das amostras de urina, fragmento de rim, fígado e pulmão, técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) e exame direto da urina em microscopia de PCR

Cão n ^o .	SAM ¹	CE ²	Rim	Fígado	Pulmão	Urina
1	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	-	+
4	-	+	+	-	-	+
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-
10 a 19	-	-	-	-	-	-

¹kappa = 0,28

²kappa = 0,85 p < 0,001

REFERÊNCIAS

- BOLIN C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging diseases of companion animas. *Semin, Vet. Med. Surg. Small. Anim.*, v.11, n.3, p.166-171, 1996.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.3, p.495-503, 1990.
- BRANGER C.; BLANCHARD, B.; FILLONNEAU, C. et al. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.243, n.2, p.437-445, 2005.
- BROWN, P.D; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D.G.et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, n.2, p.110-114, 1995.
- BROWN, P.D.; CARRINGTON, D.G., GRAVEKAMP, C. et al. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res. Microbiol.*, v.154, n.4, p.581-586, 2003.
- FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1982, 153p.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: MedSci, 1999, 326p.
- GRAVEKAMP C, VAN DE KEMP H, FRANZEN M. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.*, v. 139, p.1691-1700, 1993.
- HARKIN K R, GARTRELL C L. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.32, p.495-501, 1996.
- HEINEMANN. M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, v.73, n.4, p. 261-267, 2000.
- LEVETT. P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, v.4, n.6, p.435-448, 2004.
- MASRI S A, NGUYEN P T, GALE S P. et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can. J. Ve.tRes.*, v.61, p.15-20, 1997.

- MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, n.9, p. 2219-2224, 1992.
- OOTEMAN, M.C.; VAGO, A.R.; KOURY, M.C. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis.. *J. Clin. Microbiol.*, v.65, n.2, p.247-257, 2005.
- PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; JUSUF, S.S. et al Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.*, v.70, n.11, p.5924-5930, 2002.
- PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; CHANG, C.F. et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires, *Mol. Cell. Probes.*, v.19, n.2, p.111-117, 2005.
- RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B. et al. The multiplex PCR goes the detection of *Brucella* spp and *Leptospira* spp DNA from aborted bovine fetuses. *Vet. Microbiol.*, v.87, p. 139-147, 2002.
- SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Ver. Microbiol.*, v.1, n.2, 1970. SMITH, R. D. *Veterinary Clinical Epidemiology, a problem-oriented approach*. 2nd.Boca Raton: CCR Press, 1995, 279p.
- TAYLOR, M.J.; ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.M. et al. Magnetic immuno capture PCR assay (MIPA): detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Vet. Microbiol.*, v.56, p.135-145, 1997.
- VAN EYS, G.J.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M.J. et al. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, n.10, p. 2258-2262, 1989.
- VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. *Comum. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo.*, v.11, n.1, p. 17-24, 1987.
- VELOSO, I.F.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E. et al. A comparison of three DNA extractive procedure with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction Analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.95, n.3, p.339-343, 2000.
- WAGENAAR, J.; ZUERNER. R.L.; ALT, D et al. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, n.3, p. 316-320, 2000.
- WOHL J.S. Canine leptospirosis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.18, p. 1215-1225, 1996.

3.2 LEPTOSPIROSE CANINA: DIAGNÓSTICO PELA PCR E TÉCNICAS PADRÕES

RESUMO

O diagnóstico definitivo da leptospirose pode ser realizado rotineiramente por várias técnicas, todas baseadas na titulação de anticorpos ou na detecção de leptospiras na urina ou em órgãos. O objetivo deste trabalho foi descrever a PCR e técnicas padrões para o diagnóstico da leptospirose em um cão. Foi utilizado um cão com suspeita clínica de leptospirose atendido no Hospital Escola Veterinário. O diagnóstico foi realizado pelos achados de necropsia, exames histopatológicos, imunoperoxidase indireta, soroglutinação microscópica, isolamento da estirpe Londrina 20 e na PCR. A técnica da PCR demonstrou ser uma prova rápida, de baixo custo e viável para a detecção de leptospira no rim e na urina do cão estudado.

Palavras chaves: Cão. Leptospirose. Diagnóstico. PCR.

Canine Leptospirose: diagnosis for the PCR and techniques standards.**ABSTRACT**

The definitive diagnosis of leptospirosis can be made by several techniques as routine based on measuring the titre of antibodies in serum or detection of leptospire on patient urine or organs. The objective of this work was to show the use of PCR technique and techniques standarts to confirm the disease in one dog with clinical suspicion. The present study used one dog with clinical signs suggestive of leptospirosis, was presented to the Veterinary Teaching Hospital of the Universidade Estadual de Londrina. Diagnosis was based on post-mortem findings, histological examination, indirect immunoperoxidase, microscopic agglutination test, strain isolation of Londrina 20 and PCR. PCR technique showed to be a rapid test with low cost. In addition, the test was efficient to detect *Leptospira spp* in kidneys and urine of the studied dog.

Keywords: Dogs. Leptospirosis. Diagnosis. PCR.

Introdução

Apesar de Faine (1982) e Bolin (1996) considerarem vários sinais clínicos de leptospirose canina, como clássicos, frequentemente a doença no cão evolui com sinais brandos ou mesmo inaparentes, não apresentando um quadro característico (THIERMANN, 1980). A gravidade das manifestações clínicas depende tanto da dose e virulência do sorovar infectante quanto da susceptibilidade do hospedeiro e dos órgãos e sistemas atingidos (GIRIO, 1993).

Os sinais clínicos da leptospirose, mesmo quando característicos, não são patognomônicos, o que impede que o diagnóstico clínico seja conclusivo (FAINE et al., 1999). O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado rotineiramente por várias técnicas, todas baseadas na titulação de anticorpos ou na detecção de leptospiras na urina ou nos órgãos. Dentre todas as técnicas, a soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos é a mais utilizada em todo o mundo (FAINE et al., 1999). Esta técnica, assim como a detecção de leptospiras na urina ou nos órgãos, todas apresentam inúmeras dificuldades relacionadas à manutenção das leptospiras vivas, equipamentos e corpo técnico especializado (FAINE et al., 1999). Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido utilizada para pesquisas de *Leptospira* spp em fluídos orgânicos e órgãos de várias espécies animais (VAN et al., 1989; BROWN et al., 1995; HEINEMANN et al., 1999; RICHTZENHAIN et al., 2002), porém em menor frequência quando comparada com muitos outros microrganismos.

O objetivo deste trabalho foi descrever a PCR e técnicas padrões para o diagnóstico da leptospirose em um cão.

Casuística

Um cão fêmea, da raça pastor alemão, com cinco anos de idade, foi atendido em um Hospital Escola Veterinário. Na anamnese, o proprietário relatou que há dois dias, o animal não se alimentava e apresentava incoordenação motora com dificuldade de se manter em pé. O exame clínico constatou prostração, sensibilidade abdominal, úlcera no olho esquerdo e secreção ocular purulenta bilateral, decúbito lateral e hiperestasia dos membros

posteriores. Durante o exame físico, foram coletadas amostras de sangue e urina. O hemograma completo revelou leucocitose com neutrofilia.

O exame direto da urina em microscópio de campo escuro (CE) (SANTA ROSA, 1970), realizado imediatamente após a colheita revelou células com morfologia e movimentação compatíveis com leptospiros. A urina semeada em meio de cultura EMJH modificado (ALVES, 1995), acrescido de antibióticos, apresentou crescimento de células de leptospiros 20 dias após a semeadura. A estirpe isolada recebeu a identificação de Londrina 20 (LO 20). A SAM detectou título de 800 para os sorovares Canicola e Pyrogenes.

À necropsia observaram-se hemorragias (petéquias, equimoses e sufusões) distribuídas, difusamente, sobre a pele, mucosa oral e tecido subcutâneo. A cortical e a medular renais estavam pálidas com hemorragias petequiais na superfície capsular. O fígado encontrava-se hipertrofiado, friável e com áreas de congestão. Foram observados ainda edema pulmonar e sufusões na pleura visceral. Fragmentos de rim, fígado e pulmão foram coletados durante a necropsia. Nos fragmentos renais, corados por hematoxilina-eosina (HE), foram observados nefrite intersticial linfoplasmocitária severa, principalmente na região cortical, e discreta hialinização glomerular. As lesões hepáticas encontradas foram congestão intensa e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário periportal intenso e nos pulmões congestão intensa, edema difuso, broncopneumonia supurativa, hemorragia multifocal.

A prova de imunoperoxidase indireta (SCANZIANI et al., 1991), utilizando o soro hiperimune produzido em coelho contra a estirpe Londrina 1 (sorogrupo Canicola), detectou leptospiros coradas em castanho intenso na luz dos túbulos renais. Os cortes de fígado e pulmão foram negativos nesta técnica.

A técnica de PCR foi utilizada para detecção de *Leptospira* spp em amostras de urina e fragmentos de fígado, rim e pulmão. A extração do DNA da leptospira foi realizada de acordo com a técnica da sílica/tiocionato de guanidina (BOOM et al., 1990). Como controle negativo, em todos os procedimentos, foram incluídas alíquotas de água ultrapura autoclavada. Foram utilizados os *primers* Lig1 (sense) [5'tcaatcaaacagcggct3'] e Lig2 (anti-sense) [5'acttgattggaaattgagag3'] (Invitrogen™ Life Technologies, EUA), desenhado para amplificar um fragmento com 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp, encontrados apenas em sorovares patôgenicos (PALANIAPPAN et al., 2005). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em solução de TEB pH 8,4 (89 mM TRIS; 89 mM

ácido bórico; 2mM EDTA) e visualizados sob luz UV. Apenas as amostras de urina e rim foram positivas na técnica de PCR.

Discussão

A alta ocorrência de cães com leptospirose apresentando sinais clínicos inespecíficos ressalta a importância da realização do diagnóstico conclusivo. Estes sinais podem, de forma isolada ou em associação, ser encontrados em outras doenças infecciosas, dificultando o diagnóstico clínico (BOLIN, 1996).

Os títulos de anticorpos encontrados na SAM contra os sorovares Canicola e Pyrogenes podem ser considerados compatíveis com a fase aguda da doença. O hemograma apresentou valores fora dos parâmetros considerados normais, principalmente a leucocitose com neutrofilia, o que é também compatível com infecção por leptospira (KOGICA et al., 1990).

Resultados positivos nas técnicas de CE, cultura da urina em EMJH modificado, imunoperoxidase indireta no rim e PCR no rim e na urina confirmaram a passagem e a permanência da leptospira, com consequente multiplicação nos rins (OLIVEIRA et al., 2005). É provável ainda que as lesões observadas no HE no parênquima hepático, renal e pulmonar podem ter sido causadas pela multiplicação desta bactéria

Os resultados positivos da técnica de imunoperoxidase indireta somente no rim e da PCR no rim e na urina, indicam que, provavelmente, quando o animal veio a óbito, as leptospiros já haviam sido eliminadas do fígado e pulmão.

O presente diagnóstico baseou-se nos achados de necropsia, no isolamento da estirpe LO 20 e nos resultados da histopatologia, imunoperoxidase indireta, perfil sorológico e PCR. Cada técnica laboratorial realizada neste trabalho apresenta limitações para o uso no diagnóstico de rotina da leptospirose. O CE tem como desvantagens, a baixa sensibilidade, a necessidade de observador experiente, a possibilidade de a bactéria ser lisada pelo pH ácido da urina, além da eliminação da leptospira pela urina ocorrer de forma intermitente (FAINE, 1982). As técnicas de isolamento são demoradas e trabalhosas, sendo restritas a poucos laboratórios e requer a presença de leptospiros viáveis, o que dificulta ainda mais a detecção do microorganismo em material *post-mortem* (BROWN et al., 2003). A imunoperoxidase indireta depende da integridade da estrutura e antigenicidade da leptospira

que pode ser facilmente alterada durante a estocagem e o processamento da amostra (SCANZIANI et al., 1991). A SAM, é uma técnica bastante trabalhosa, necessita da manutenção de antígenos vivos, de uma equipe técnica treinada, e os anticorpos aglutinantes, quando detectados, não permitem a afirmação que o animal seja portador renal de leptospira (FAINE et al.,1999). A PCR, utilizada neste trabalho, apesar de ainda ser restrita a poucos laboratórios, demonstrou ser uma técnica rápida, de baixo custo, eficiente na identificação de portador renal e conseqüentemente de cães na fase de leptospirúria.

As manifestações clínicas inespecíficas da leptospirose encontradas no cão utilizado neste estudo mostram a necessidade de técnicas que possibilitem a rapidez no diagnóstico da doença e adoção, com a maior antecedência possível, de medidas adequadas de tratamento e saúde pública. A técnica da PCR, entre as utilizadas neste estudo, apresenta os requisitos necessários para a adoção das medidas citadas.

REFERÊNCIAS

- BOLIN C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging diseases of companion animas. *Semin, Vet. Med. Surg. Small. Anim.*, v.11, n.3, p.166-171, 1996.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.3, p.495-503, 1990.
- BROWN, P.D.; CARRINGTON, D.G., GRAVEKAMP, C. et al. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res. Microbiol.*, v.154, n.4, p.581-586, 2003.
- FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1982, 153p.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: MedSci, 1999, 326p.
- GIRIO, R.J.S. Abordagem clínica da leptospirose animal. In: Encontro Nacional em Leptospirose, 3.1993, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro, p.59, 1993.
- HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, v.73, n.4, p. 261-267, 2000.
- KOGIKA, M.M.; HAGIWARA, M.K.; MIRANDOLA, R.M.S. Alterações bioquímicas na leptospirose canina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 27, n. 2, p. 177-182, 1990.
- OLIVEIRA, R.C.; FREITAS, J.C.; SILVA, F.G. et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n.1, p. 111-113, 2005.
- PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; CHANG, C.F. et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires., *Mol. Cell. Probes.*, v.19, n.2, p.111-117, 2005.
- SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Ver. Microbiol.*, v.1, n.2, 1970.
- SCANZIANI, E.; LUINI, M.; FABBI, M. et al. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.50, p.229-232, 1991.
- THIERMANN, A.B. Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.10, p. 1659-1661, 1980.