

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC

CAROLINE DANTAS MEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS**

ILHÉUS-BAHIA

2009

CAROLINE DANTAS MEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação de mestrado apresentada a
Universidade Estadual de Santa Cruz como
parte das exigências para obtenção do título
de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Genética Animal
Orientador: Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau

ILHÉUS-BAHIA

2009

CAROLINE DANTAS MEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS**

Prof^a. Dr^a. Roberta Costa Dias
(UESC)

Prof. Dr. Hélio Langoni
(UNESP)

Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos que se fizeram presentes em minha caminhada, aos que me apoiaram, aos que foram solidários, aos que torceram por mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem.

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, Professor Doutor Amauri Arias Wenceslau, por sua orientação, paciência, experiência e confiança na execução deste trabalho.

Ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, George Rego Albuquerque, pelo apoio e orientações científicas sempre oportunas.

A minha mãe, por ter sido a maior colaboradora na minha caminhada pessoal e profissional. Obrigada por acreditar em mim.

A Iana Carolina da Silva, amiga incondicional de todas as horas, pelo apoio e incentivo constantes.

Aos colegas e estagiários do laboratório de Genética Veterinária, em especial Fábio Santos Carvalho e Janaína Maria Xavier Corrêa, pelo apoio e amizade conquistados durante este período.

Aos funcionários e técnicos do Hospital Veterinário da UESC, Antônia, Edvaldo, Fabiana, Márcia, Lita, Givaldo e Natanael, pela receptividade, carinho e amizade. Serei eternamente grata a todos.

A professora Roberta Costa Dias, pela ajuda e elucidação do trabalho nos momentos difíceis.

Ao professor Antônio Roberto da Silva Paixão por sua amizade, carinho e convívio agradável por todos esses anos de graduação e pós-graduação.

A professora Kátia Moema pelo exemplo constante de caráter, profissionalismo e amor aos animais.

Ao professor Hélio Langoni que gentilmente aceitou participar deste trabalho, fazendo parte da Banca examinadora.

A todos meus amigos, em especial Ana Paula Ramos, Adriana de Aquino, Cristiano Costa, Isaias Marcelino, João Pedro Figueredo, Gabriela Aquilino, Lucas Aquino, Ludymille Araújo, Michelle Lavinski, Robson e Vinicius Lessa.

A Solange Skromov pelo exemplo de docilidade, amizade e por propiciar momentos de descontração nas aulas de canto coral.

Aos Médicos Veterinários do Centro de Controle de Zoonoses de Ilhéus, Patrícia Sicupira e Pedro Leite, pelo apoio e receptividade na realização das coletas.

A Mônica, da SEPOG pela simpatia no atendimento a todas as solicitações.

Aos colegas e professores do curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UESC, que muitas vezes foram parceiros e amigos no desenvolvimento desta jornada.

Aos animais utilizados neste estudo, e em vários outros, que mesmo sem saber, contribuem com o desenvolvimento do conhecimento científico, sem os quais a realização desta dissertação não seria possível.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho.

Muito obrigada!

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco;
à medida que vamos adquirindo conhecimentos,
instala-se a dúvida.”

(Johann Goethe)

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose importante que ocorre de forma endêmica no mundo inteiro e pode afetar animais silvestres, domésticos e o homem, representando um sério problema para a saúde pública. Clinicamente os indivíduos infectados podem apresentar febre, sintomas intestinais, hepáticos e renais, caracterizadas por icterícia, vômito, falência renal, depressão, convulsões, conjuntivite e morte. Os cães, como animais de companhia, podem ser responsáveis pela transmissão da leptospirose aos humanos, principalmente às crianças. Apesar da ampla distribuição mundial, a leptospirose é mais frequente em regiões de clima temperado. No Brasil, inquéritos soro-epidemiológicos em vários estados têm revelado resultados variados quanto à ocorrência dos diferentes sorovares da leptospirose canina. O diagnóstico baseia-se principalmente nos achados clínicos, sorológicos e na detecção e isolamento da bactéria. Tendo em vista a importância da leptospirose em cães, não só pela gravidade da doença no animal como também pela sua importância em saúde pública, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial zoonótico da leptospirose canina no município de Ilhéus- Bahia, analisando-se amostras de sangue e urina de cães domiciliados e errantes do município, utilizando-se o diagnóstico molecular da doença através da PCR. Pelos resultados obtidos concluiu-se que os cães tanto errantes quanto domiciliados do município de Ilhéus- Bahia estão sujeitos a infecção por *Leptospira* sp. Este estudo mostrou a viabilidade do diagnóstico da leptospirose em amostras de sangue e urina de cães infectados naturalmente através da PCR. A técnica se mostrou uma ferramenta útil, rápida, eficaz e de baixo custo.

Palavras-chave: cães, diagnóstico molecular, *Leptospira* spp., zoonose.

DIAGNOSIS OF THE LEPTOSPIROSIS IN DOGS NATURALLY INFECTED

ABSTRACT

Leptospirosis is an important zoonosis that is endemic worldwide and can affect wildlife, domestic and man, representing a serious problem for public health. Clinically, infected individuals may develop fever, intestinal, liver and kidney symptoms, characterized by jaundice, vomiting, kidney failure, depression, convulsions, conjunctivitis and death. Dogs, as pets, may be responsible for transmission of leptospirosis to humans, especially for children. Despite the worldwide distribution, leptospirosis is most common in temperate regions. In Brazil, sero-epidemiological surveys in several states have shown mixed results regarding the occurrence of different serovars of canine leptospirosis. The diagnosis is mainly based on clinical, serological and the detection and isolation of the agent. Given the importance of leptospirosis in dogs, not only by the severity of the disease in animals but also for its importance in public health, the aim of this work was to evaluate the zoonotic potential of canine leptospirosis in the city of Ilheus, Bahia, analyzing samples of blood and urine of house and wandering dogs the city, using the molecular diagnosis by Polymerase Chain Reaction (PCR). From the results it is concluded that stray dogs as much as domiciled in the city of Ilheus, Bahia are subject to *Leptospira* spp. This study showed the feasibility of diagnostic methods in samples of blood and urine of dogs naturally infected by the PCR. The technique proved a useful tool, fast, effective and low cost.

Key words: dogs, molecular diagnosis, *Leptospira*, zoonosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado das variáveis analisadas para a determinação dos fatores de risco para a leptospirose em 200 cães provenientes do município de Ilhéus-Ba.....	28
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos da PCR obtidos a partir da extração de DNA de sangue de cães.

Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos da PCR obtidos a partir da extração de DNA de urina de cães.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
HV	Hospital Veterinário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Km ²	Quilômetros quadrados
mM	Milimol
MAT	Teste Microscópico de Aglutinação
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µm	Micrometro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Número Amostral
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RPM	Rotações Por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SESAB	Secretaria da Saúde do Estado da Bahia
Tris-HCl	Cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano
UESC	Universidade Estadual de santa Cruz
WHO	World Health Organization
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

	Resumo	viii
	Abstract	ix
	LISTA DE TABELAS	x
	LISTA DE FIGURAS	xi
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Aspectos históricos da leptospirose	4
2.2	Etiologia da leptospirose	5
2.3	Classificação da <i>Leptospira</i>	6
2.4	Transmissão da leptospirose	7
2.5	Patogenia da leptospirose	8
2.6	Epidemiologia da leptospirose	9
2.7	Sinais clínicos da leptospirose	12
2.8	Diagnóstico da leptospirose	13
2.9	Biologia molecular	15
3	OBJETIVOS	17
3.1	GERAL	17
3.2	ESPECÍFICOS	17
4	ARTIGOS	18
5	CAPÍTULO 1: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Leptospira spp.</i> EM CÃES ERRANTES E DOMICILIADOS INFECTADOS NATURALMENTE	19
	Resumo	19
	Abstract	20
5.1	INTRODUÇÃO	21
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	22
5.2.1	Área e animais de estudo	22
5.2.2	Análise estatística	23
5.2.3	Extração do DNA das amostras de sangue	23
5.2.4	Amplificação do DNA	24

5.2.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	24
5.2.6	Eletroforese dos produtos da PCR	25
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.4	CONCLUSÕES	29
5.5	REFERÊNCIAS	29
6	CAPÍTULO 2: DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Leptospira</i> spp. EM AMOSTRAS DE URINA DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE.....	36
	Resumo	36
	Abstract	37
6.1	INTRODUÇÃO	38
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	39
6.2.1	Área e animais de estudo	39
6.2.2	Extração do DNA das amostras de urina	39
6.2.3	Condições de amplificação do DNA	40
6.2.5	Eletroforese dos produtos de PCR	40
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.4	CONCLUSÃO	42
6.5	REFERÊNCIAS	42
7	CONCLUSÕES FINAIS	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXO	54
	APÊNDICES	55

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa aguda, de caráter sistêmico, que acomete o homem e os animais, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001; SACHSE; FREY, 2003).

A unidade taxonômica básica é o sorotipo ou sorovar, representado por uma amostra de referência. O agrupamento de sorovares é feito segundo suas características antigênicas. O termo Sorogrupo é adotado para indicar a natureza sorológica desses grupos (BRASIL, 1995; LETOCART et al., 1997).

Dependendo da espécie animal envolvida, condição vacinal ou social, o sorotipo da *Leptospira* pode variar. MODOLO et al., (2006) relataram a importância dos sorovares *canicola*, *pyrogenes*, *copenhageni*, *autumnalis* e *bratislava* em cães na área territorial urbana de Botucatu. Na cidade de Patos, na Paraíba, BATISTA et al., (2004) encontraram com maior frequência os sorovares *autumnalis*, *pomona*, *grippotyphosa* e *patoc*. Em Londrina, no Paraná, QUERINO et al., (2003) relataram a maior frequência para os sorovares *pyrogenes* e *icterohaemorrhagiae*.

A mortalidade é significativa e está relacionada tanto ao atraso no diagnóstico, devido à falta de infra-estrutura e da avaliação clínica adequada, quanto a outras razões como a patogenicidade inerente de algumas linhagens de *Leptospira* ou da resposta imunopatológica geneticamente determinada do hospedeiro (BHARTI et al., 2003).

A leptospirose tem sido descrita como uma zoonose de ampla distribuição geográfica devido à grande variedade de reservatórios potenciais da doença, associada à habilidade da *Leptospira* sobreviver por longos períodos no solo e na superfície da água, fazendo com que a leptospirose seja a zoonose mais comum do mundo. Sua ocorrência é favorecida pelas condições vigentes nas regiões de clima tropical e subtropical, onde a elevada temperatura e os períodos do ano com altos níveis pluviométricos favorecem o aparecimento de surtos epidêmicos de caráter estacional (BERAN; STEELE, 1994; BRASIL, 1995; SACHSE; FREY, 2003).

A transmissão para os humanos ocorre através do contato com animais domésticos e selvagens que agem como reservatório ou pelo ambiente, consumo de alimentos e água contaminados pela urina de roedores e de outros animais. A transmissão inter-humana é rara e de pouca importância prática (BRASIL, 1995; NASCIMENTO et al., 2004a). Os roedores em geral, comportam-se como portadores permanentes de vários sorovares de *Leptospira*. Isso faz com que ambientes por onde circulam tais animais estejam constantemente contaminados por esse agente (YASUDA et al., 1980).

Os cães, como animais de companhia, podem ser responsáveis pela transmissão da leptospirose aos seres humanos, principalmente para crianças. A leptospirose canina ocorre principalmente pelos sorovares *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni* e *canicola*, cujo curso pode variar de sub-clínico, agudo ou crônico (LETOCARD et al., 1999).

Segundo dados do Ministério da Saúde, das doenças relacionadas à contaminação pelas enchentes, a leptospirose oferece o maior perigo, por provocar alta mortalidade. Em 2005, registraram-se 3.605 casos da doença no Brasil, com 417 mortes. Em 2006, foram notificados 2.877 casos, com 236 mortes. Em 2007 foram 3.307 casos confirmados e em 2008, 3.306 casos, com 330 e 234 óbitos, respectivamente.

No período de 2005 a 2008 foram notificados no estado da Bahia 1259 casos suspeitos de Leptospirose e 791 casos confirmados, com 115 óbitos. O coeficiente de incidência do ano de 2008 foi de 1,2/100.000 habitantes e a letalidade foi de 12,8% (SESAB, 2008).

O espectro dos sintomas da leptospirose é bastante amplo, podendo apresentar um quadro subclínico ou de doença febril, anictérica, autolimitada, até quadros ictericos graves, a clássica síndrome de Weil, com alto potencial de letalidade (BRASIL, 1995; LEVETT, 2001; WHO, 2003).

Em humanos, os sintomas podem incluir febre, mialgia, icterícia, dor abdominal, anorexia, náusea, diarreia, oligúria, anúria, hemorragia, fotofobia, arritmia cardíaca, hipotensão, entre outros (WHO, 2003).

Os sintomas no cão se apresentam como doença aguda, febril, com sintomas intestinais, hepáticos e renais, caracterizadas por icterícia, vômito, falência renal, depressão, convulsões, conjuntivite (BRASIL, 1995; PINNEY, 1998).

O diagnóstico deve ser clínico-epidemiológico e laboratorial. A suspeita clínica deve ser confirmada por métodos laboratoriais específicos, uma vez que a leptospirose anictérica pode ser confundida com outras doenças como a dengue ou a gripe (FAINE, 1999; BRASIL, 2004).

A detecção do agente pode ser realizada por soroaglutinação microscópica (SAM), cultura, exame direto do sangue, líquor e urina através da microscopia de campo escuro, contraste de fase, imunofluorescência e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Métodos sorológicos podem falhar na detecção de infecções onde a *Leptospira* não provoque uma resposta imune capaz de reagir com os padrões conhecidos, e muitos hospedeiros que agem como reservatórios de *L. interrogans* podem ter baixos títulos de anticorpos no soro (LEVETT, 2001; SACHSE; FREY, 2003).

Uma das ferramentas mais poderosas em biologia molecular é a PCR. Desenvolvida em 1985 por Kary Mullis e colaboradores, atualmente é intensivamente utilizada em pesquisas (NICHOLAS, 1999). A PCR é um método rápido, sensível e específico que possibilita o diagnóstico a partir de uma pequena amostra de DNA (BAL et al., 1994).

O ano de 2007 marcou o centenário da descoberta do agente causador da leptospirose, *Leptospira interrogans*. Até agora, os obstáculos genéticos impostos pela doença tem dificultado a identificação dos genes responsáveis pela sua virulência (RISTOW et al., 2007).

A leptospirose é uma doença sócio-econômica de amplo espectro e difícil diagnóstico diferencial sendo importante minimizar a incidência da doença em humanos e animais através do desenvolvimento de um método diagnóstico rápido, sensível e de baixo custo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da leptospirose

Diversas doenças com características infecciosas ictericas, com disfunção renal, foram observadas e documentadas até o final do século XVIII, contudo suas causas eram desconhecidas (JOUGLARD, 2005).

Vários relatos sobre uma síndrome semelhante à leptospirose foram descritos, como aconteceu no Cairo, em 1812 e em Paris, em 1883. Adolf Weil Heidelberg descreveu uma síndrome apresentando icterícia profunda e prejuízo da função renal em 1886, na Alemanha (FAINE et al., 1999).

Stinson, em 1907, foi o primeiro a visualizar o microrganismo através da coloração por prata, constatando a presença de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente falecido. As espiroquetas possuíam ganchos em suas extremidades, e Stinson as denominou de *Spirochaeta interrogans* por causa da sua forma semelhante a um ponto de interrogação. Inada e colaboradores isolaram bactéria em 1915, estabelecendo que *Leptospira icterohaemorrhagiae* era o agente causador da doença descrita por Weil (TIFFANY; MARTORANA, 1945; FAINE, 1999).

Nos animais, a leptospirose foi descrita por volta de 1850, embora sua etiologia fosse desconhecida. Contudo, não foi identificada como uma doença de animais domésticos até o século seguinte, sendo relatada primeiramente nos cães. Alguns anos mais tarde, um novo gênero *Leptospira* foi proposto e os roedores foram identificados como portadores da bactéria. Em 1922, o primeiro caso de leptospirose humana associado à exposição ao rato foi relatado (NOGUCHI, 1918; TIFFANY; MARTORANA, 1945; STEELE, 1957; TORTEN, 1979).

No Brasil, durante muitos anos os estudos se desenvolveram mais intensamente no sul, particularmente em São Paulo, porém foi na Amazônia que se fez o reconhecimento inicial da doença nos país (LEÃO et al., 1997).

Em 1917, MacDowell reconheceu clinicamente a presença da leptospirose humana no Brasil, na ocorrência de um surto da doença em Belém do Pará, até então denominada icterícia epidêmica ou "*icterus epidemicus*". Enquanto isso, *Leptospira icterohaemorrhagiae* foi relatada em roedores da cidade do Rio de Janeiro (ARAGÃO, 1917).

O primeiro relato de leptospirose humana na cidade de São Paulo foi descrito em 1930, onde o sangue de um paciente foi inoculado em cobaias e a doença foi reproduzida experimentalmente (SANTA ROSA et al., 1970).

O estudo da leptospirose canina iniciou-se no Rio de Janeiro com Dacorso Filho, que em 1940 isolou o agente e identificou-o como sorovar *icterohaemorrhagiae* (SANTA ROSA et al., 1970; FREIRE et al., 2007).

Em 1955 foi o sorovar *serjoe* foi descrito em um cão na Iugoslávia. Em 1957, foi relatado, na Inglaterra predominância dos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *canicola* (CORREA; CORREA, 1992).

Em 1970, uma experiência de nove anos de estudo sobre leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo foi publicada, onde foram examinados mais de 21 mil soros de humanos, bovinos, suínos, eqüinos, ovinos, caninos, caprinos e bubalinos (SANTA ROSA et al., 1970).

2.2 Etiologia da leptospirose

A leptospirose é causada por bactérias da ordem *Spirochetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. São espiroquetas de forma helicoidal, de aproximadamente 0,1µm de diâmetro por 4 a 20µm de comprimento, com extremidades usualmente encurvadas e com grande número de flagelos de pequena amplitude, visualizados somente pela microscopia de campo escuro ou de contraste de fase. A penetração ativa no hospedeiro se dá devido à forma helicóide e a movimentação dos flagelos periplasmáticos (FAINE; STALLMAN, 1982; LEÃO et al., 1997; BINDER et al., 1998; FAINE, 1999).

São bactérias microaerófilas e apresentam crescimento ótimo entre 28 e 30°C, utilizando ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono e energia, produzindo catalase e oxidase (LEVETT, 2001).

2.3 Classificação da *Leptospira*

Até meados dos anos 90, o gênero *Leptospira* era dividido em dois grandes grupos compreendendo cepas saprófitas isoladas do ambiente, *Leptospira biflexa* e, cepas patogênicas, *L. interrogans* baseadas em características antigênicas uma vez que, morfológicamente, as leptospiros são indistinguíveis entre si (JOHNSON; HARRIS, 1967; BRASIL, 1995; LETOCART et al., 1997; LEVETT, 2001). A diferenciação era baseada pela capacidade de *L. biflexa* crescer a 13°C, na presença de 8-azaguanina e também por não formar células esféricas em solução de NaCl a 1 M (FAINE; STALLMAN, 1982).

A bactéria não possui muita resistência fora do organismo do hospedeiro, sendo muito sensíveis à acidez, aos anti-sépticos, aos desinfetantes comuns, ao cloro livre e à excessiva salinidade, bem como à aridez do solo e à luz solar direta, que as destroem em pouco tempo. Todavia, podem sobreviver por tempo relativamente longo na água e no solo suficientemente úmido com pH neutro ou ligeiramente alcalino. O período de sobrevivência na água varia segundo a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição. Já foi constatada, experimentalmente, a permanência de leptospiros viáveis em água por até 180 dias (BRASIL, 1995; LEÃO et al., 1997).

A unidade taxonômica básica é o sorotipo ou sorovar, representado por uma amostra de referência. O agrupamento de sorovares é feito segundo suas características antigênicas. O termo sorogrupo é adotado para indicar a natureza sorológica desses grupos (BRASIL, 1995; LETOCART et al., 1997).

Muitos sorovares estudados são representados por somente uma única cepa referência e, como mais cepas são estudadas, o número de espécies tende a aumentar (LEVETT, 2001).

Atualmente, dois tipos de classificação estão sendo usadas: uma genética e outra baseada nos determinantes antigênicos. Ambas reconhecem espécies patogênicas e saprófitas. A reclassificação das leptospiros com base no genótipo é taxonomicamente correta. Entretanto, gera confusão para os microbiologistas e clínicos, que estão habituados ao sistema fenotípico corrente de classificação em sorogrupos e sorovares. A existência de *L. interrogans* e *L. biflexa* como espécies

sensu stricto no sistema de classificação genotípica gera ainda mais equívocos de nomenclatura. É importante que a classificação empregada esteja de acordo com a metodologia utilizada: nomenclatura fenotípica para classificação sorológica; nomenclatura genotípica para classificação molecular (RIEDIGER, 2007).

Segundo LEVETT (2001), a classificação genética é problemática e incompatível com o sistema de sorogrupo que ainda necessita ser mantido até que um sistema de identificação mais simples com base no DNA seja desenvolvido e validado.

A classificação em espécies genômicas ou genomospécies do gênero *Leptospira* está baseada no grau de homologia do DNA. O gênero está dividido em 17 espécies definidas: *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kirshneri*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *Turneria parva* (proposta), *Leptonema illini*, *L. genomospécie 1*, *L. genomospécie 2*, *L. genomospécie 3*, *L. genomospécie 4*, *L. genomospécie 5*, com pelo menos, 70% de homologia do DNA e cuja seqüência contém uma divergência de, pelo menos, 5% de bases não pareadas (KAUFMANN et al., 2006)

Esta classificação coexiste com a antiga classificação sorológica na qual o antissoro era utilizado para estabelecer parentesco entre as amostras isoladas (DIKKEN; KMETY, 1978).

2.4 Transmissão da leptospirose

As leptospirosas excretadas através da urina dos animais doentes ou de portadores podem sobreviver por semanas ou meses em águas, solos, alimentos se o meio for favorável (LEÃO et al., 1997).

A transmissão para os humanos ocorre através do contato com animais domésticos e selvagens que agem como reservatório ou pelo ambiente, consumo de alimentos e água contaminados pela urina de roedores e de outros animais. A transmissão pode ocorrer por contato direto com sangue, tecidos, urina e outros excretas de animais infectados, ou, por via indireta, que é a mais comum, através de contato com água ou solo úmido e lamacento contaminados com a urina de animais portadores. Também pode fazer-se, ocasionalmente, pela ingestão de água e

alimentos contaminados por leptospiras patogênicas (BRASIL, 1995; LEÃO et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2004a).

Em relação à propagação indireta, existe a possibilidade de vetores artrópodes desempenharem algum papel em relação transmissão, já que as leptospiras encontram-se presentes na corrente sanguínea durante o período agudo inicial da doença. O sorovar *grippotyphosa* foi isolado de carrapatos da espécie *Dermacentor marginatus* em um estudo experimental na Rússia. Van der Hoeden (1958) isolou o sorovar *canicola* de *Rhipicephalus sanguineus*, em Israel, conseguindo transmitir a doença a animais normais através da picada dos carrapatos infectados experimentalmente. Todavia, este tipo de transmissão dificilmente viria a representar um risco maior para o homem (KREPKOGORSKAIA; REMENTSOVA, 1957; LINS et al., 1986).

A transmissão inter-humana é excepcional, podendo advir do contato direto com a urina leptospírica de um doente ou até mesmo por relações sexuais ou por via transplacentária, da mãe doente ao feto na fase inicial ou septicêmica da doença, ocorrência esta bem conhecida, em bovinos e em animais infectados experimentalmente (LINS et al, 1986; LEÃO et al, 1997).

Os cães são considerados como a segunda fonte de infecção mais importante para os humanos, perdendo apenas para os roedores, possivelmente por coabitarem, principalmente nos grandes centros urbanos, além de poder albergar leptospiras vivas na urina durante meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico (FAINE et al., 1999; BROD et al., 2005). Animais infectados assintomaticamente fornecem um risco potencial para a persistência de focos de leptospirose servindo como fonte contínua de contaminação ambiental (OLIVEIRA et al., 2004).

Os cães podem adquirir a infecção pela convivência com outros cães contaminados, bem como pela estreita relação que ocasionalmente podem ter com ratos que urinam em áreas comuns (JOUGLARD; BROD, 2000).

2.5 Patogenia da leptospirose

As leptospiras penetram ativamente no organismo através de lesões cutâneas, ou pelas mucosas, oral, nasofaríngea, conjuntival, esofágica e,

possivelmente, a vaginal, mesmo íntegras. A mucosa gastrointestinal é uma via de penetração excepcional, já que os leptospiros dificilmente podem ultrapassar a barreira ácida do estômago (LEÃO et al., 1997). A inalação de aerossóis também pode transportar o microrganismo direto para os pulmões (IBARRA et al., 2003).

Ao atingir a corrente sangüínea, a bactéria replica-se, indo se localizar em diferentes órgãos ou sistemas. Representa o 1º estágio da doença, ou fase septicêmica, que dura em torno de 7 dias. Uma vez na corrente sanguínea e circulação linfática o microrganismo é transportado rapidamente a todos os órgãos. Dessa forma, 48 horas após o início da disseminação, a espiroqueta pode ser isolada de qualquer sítio, incluindo o líquido cérebro espinhal. Em seguida, começa a 2ª fase, chamada imune, devido ao aparecimento de anticorpos específicos (LEÃO et al., 1997; IBARRA et al., 2003).

Fundamentalmente, a patologia decorre ou de infiltrado inflamatório do parênquima, localizado ou difuso, processos degenerativos, alterações vasculares sistêmicas, edema endotelial, aumento da permeabilidade capilar, anoxia dos tecidos bem como das membranas celulares (LEÃO et al., 1997).

Quanto maior a especificidade do sorotipo para a espécie, maior o grau de patogenicidade. Quando o sorotipo é específico para o hospedeiro, há doença clínica mais severa e maior fase de leptospirúria (WOHL, 1996).

O período de incubação da doença é de 7 a 12 dias, podendo variar de 2 a 20 dias (BRASIL, 2000).

2.6 Epidemiologia da leptospirose

A leptospirose é uma antropozoonose de ampla distribuição geográfica, prevalecendo, porém, nas zonas tropicais e subtropicais, onde os fatores ecológicos e climáticos são mais propícios à sobrevivência da bactéria, particularmente quando favorecidos por condições precárias de higiene e de saneamento básico (LEÃO et al., 1997; LEVETT, 2001; ROMERO et al., 2003).

Acomete mamíferos, aves, répteis e invertebrados. Vários autores relataram a ocorrência da leptospirose em diversas espécies, como bovinos, cães, ovinos, eqüinos e suínos (SCHMIDT et al., 2002; HERRMANN et al., 2004; DELBEN et al., 2004; PESCADOR et al., 2004; TESSEROLI et al., 2005; MAGAJEVSKI et al., 2007;

LANGONI et al., 2008). Levantamentos sorológicos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies sinantrópicas e silvestres na epidemiologia da doença, como porco-monteiro (*Sus scrofa*), búfalos (*Bubalus bubalis*), quati (*Nasua nasua*), veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), veado-mateiro (*Mazama americana*), capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e animais de vida livre como ratos (*Rattus norvegicus*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) (LANGONI et al., 1999; MATHIAS et al., 1999; GIRIO et al., 2004; CORRÊA et al., 2004; LANGONI et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Muitas espécies domésticas, bem como a maioria das espécies silvestres, podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação do microrganismo na natureza. A eliminação da *Leptospira* pela urina dos portadores ocorre por períodos de tempo que podem variar de poucas semanas a vários meses, entre os animais domésticos, e por toda vida no caso dos roedores (WEBSTER et al., 1995).

A doença exibe um caráter sazonal, que coincide com os períodos de intensa precipitação pluviométrica, com conseqüentes enchentes, ocorrendo um aumento do risco de infecção em humanos e animais, devido a maior exposição das mucosas e da pele com a água contaminada, já que esta realiza o transporte e a disseminação do organismo patogênico, o que torna comum a ocorrência de surtos epidêmicos (SAKATA et al., 1992; WHO, 2003; PAPPACHAN et al., 2004). Em um estudo realizado em Salvador, Bahia, com 1.016 pacientes, o aumento na precipitação pluviométrica mostrou relação com aumento do número de casos de leptospirose humana no mês subsequente (COSTA et al., 2001). Mesmo em áreas consideradas endêmicas, a leptospirose apresenta uma característica sazonal, cuja incidência aumenta, habitualmente, nos meses em que as precipitações são mais abundantes (LEÃO et al., 1997; PAPPACHAN et al., 2004).

Alguns estudos demonstram que os maiores índices de infecção canina se concentraram nos meses de chuva (ÁVILA et al., 1998). Segundo Yasuda et al., (1980), a ocorrência da leptospirose em cães em São Paulo sofreu influência sazonal onde, verão e outono apresentaram o maior número de animais com sorologia positiva. Isso pode ser explicado pela ocorrência de chuvas abundantes nas épocas de verão, que facilita a propagação do agente.

Em países desenvolvidos a leptospirose é considerada reemergente, relacionada principalmente com atividades de lazer e esportivas ao ar livre, como a canoagem, a natação, a pesca em água doce, o *rafting*, viagens e o ecoturismo

(BOLIN, 1996; LEVETT, 2001; MORGAN et al., 2002; GROBUSH et al., 2003; SEJVAR et al., 2003; DEY et al., 2004; BOLAND et al., 2004; NAKAMURA et al., 2006).

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica e constitui um problema de saúde pública. A manutenção do agente é favorecida pelo clima tropical associado principalmente ao pauperismo, a proliferação de roedores, o acúmulo de lixo, o excesso de cães errantes, as enchentes e ao crescimento desordenado dos centros urbanos com aumento das favelas e construções nas periferias, com mínimo ou nenhum saneamento básico, o que favorece a instalação de um quadro endêmico (KO et al., 1999; JOUGLARD, 1999; FIGUEIREDO et al., 2001; COSTA et al., 2001; McBRIDE et al., 2005), fazendo com que a ocorrência da leptospirose esteja intimamente relacionada à situação sócio-econômica e sanitária da população, apresentando, portanto, incidências distintas entre as diferentes classes sociais.

A leptospirose é considerada também como uma doença de risco ocupacional, atingindo diferentes classes profissionais, como trabalhadores em canaviais, abatedouros, arrozais, tratadores de animais, fazendeiros e médicos veterinários. Em relação aos serviços de saneamento, estão expostos à infecção os trabalhadores das redes de abastecimento de água e de esgotos, como também os da limpeza pública, coletores de lixo e garis. Essas atividades, quando executadas, na ausência de recursos tecnológicos e de equipamentos de segurança, por mão-de-obra desqualificada e mal remunerada, aumentam ainda mais o risco de infecção (ALMEIDA et al., 1994; LEÃO et al., 1997; CAMPAGNOLO et al., 2000; LANGONI et al., 2008).

A susceptibilidade à infecção humana é igual para ambos os sexos em todas as idades, quando estão igualmente expostos às fontes de contágio. O homem, por razões ocupacionais, está usualmente mais exposto à enfermidade que a mulher, razão pela qual costuma predominar no sexo masculino (LEÃO et al., 1997). Em relação à idade, a doença acomete todas as faixas etárias, tendo maior incidência em indivíduos entre 15 e 45 anos (PLANK; DEAN, 2000).

A fonte de infecção canina ainda não está estabelecida. Os principais reservatórios da espiroqueta são constituídos pelos roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*. Assim, sugere-se que estes animais sejam a fonte mais importante de infecção para os cães (BLAZIUS et al., 2005).

2.7 Sinais clínicos da leptospirose

A leptospirose acomete, praticamente, todos os animais domésticos, silvestres e o homem, provocando ou não a manifestação de sintomas (WEBSTER et al., 1995).

A sintomatologia é variável, com distintos graus de severidade. O espectro dos sintomas é bastante amplo, podendo apresentar um quadro subclínico ou de doença febril, anictérica, autolimitada, até quadros ictericos graves, a clássica síndrome de Weil, com alto potencial de letalidade (BRASIL, 1995; LEVETT, 2001; WHO, 2003).

Caracteriza-se por apresentar sintomas muito parecidos com os de outras doenças como a dengue e a gripe, o que torna difícil distingui-las clinicamente, por isso muitas vezes não há procura de assistência médica. A notificação, portanto, representa apenas uma pequena parcela, de aproximadamente 10% do número real de casos no Brasil (NASSI et al., 2003; TESSEROLLI et al., 2005).

Cerca de 10% dos casos de leptospirose se apresentam como uma síndrome icterica febril, cuja evolução clínica é rápida e progressiva (LEVETT, 2001), com início agudo de febre elevada e mialgias, por vezes com exantema e conjuntivite associados. Pode ocorrer a instalação de alterações hepáticas e renais, como icterícia e insuficiência renal, podendo levar a um quadro hemorrágico relacionado a fenômenos de vasculite, trombocitopenia, com expressões variáveis e até mesmo manifestações hemorrágicas digestivas como hematemesa, melena e/ou enterorragia. As manifestações clínicas variam nos termos da severidade e da sintomatologia (FEIGIN; ANDERSON, 1975; COSTA et al., 2001; SAMBSIAVA et al., 2003).

O início da leptospirose anictérica é abrupto e é caracterizado pela febre, dor de cabeça, mialgia, prostração e às vezes, colapso circulatório. A fase septicêmica dura de 3 a 7 dias, com febre elevada, dor de cabeça intensa e ininterrupta, anorexia, náusea e dor abdominal (SAMBSIAVA et al., 2003).

A persistência de leptospiros nos rins pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais a extensas lesões, caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal (FAINE et al., 1999).

Os sinais clínicos da leptospirose canina dependem de fatores como idade, estado imunológico e patogenicidade do sorovar envolvido. O período de incubação é de 5 a 15 dias e, nos casos severos, a doença tem um estabelecimento repentino, caracterizado por fraqueza, anorexia, vômitos, quase sempre acompanhado de conjuntivite. Neste estágio, o diagnóstico é difícil, sendo que os sinais tornam-se mais pronunciados em alguns dias, ocorrendo dispnéia e sede acentuada. Quando percutida a região lombar, pode o animal demonstrar dor, o mesmo acontecendo à palpação do abdômen (LEÃO et al., 1997; SANTIM et al., 2006).

Os sintomas no cão podem se apresentar de forma aguda, febril, com sinais intestinais, hepáticos e renais, caracterizados por icterícia, vômito, falência renal, depressão, convulsões, conjuntivite, letargia, depressão, anorexia, poliúria, polidipsia, diarreia e mialgia (PINNEY, 1998; ADIN et al., 2000).

Dependendo do sorovar envolvido, a sintomatologia pode variar. O sorovar *icterohaemorrhagiae* pode levar a morte em 24 a 48 horas. Os cães que sobrevivem a esse período inicial podem apresentar a síndrome ictero-hemorrágica, com hipertermia, prostração, hemorragias difusas, especialmente no pulmão e no sistema digestório, insuficiência renal, observada por diminuição da diurese ou pela presença de albuminúria, podendo ocorrer também uremia, desidratação e óbito (LEÃO et al., 1997; ADIN et al., 2000).

O sorovar *canicola* pode provocar infecção subclínica ou crônica e muitas vezes os animais podem mostrar-se assintomáticos enquanto o sorovar *pomona* pode provocar doença subclínica (GREENE, 1990).

Problemas reprodutivos podem ocorrer seguindo a infecção. Deve-se sempre considerar a leptospirose como um diferencial em todos os casos do aborto ou de mortalidade perinatal onde nenhum dos microrganismos patogênicos suspeitos usuais pode ser identificados (ANDRÉ-FONTAINE, 2006).

A mortalidade aproxima-se de 10%. Nos casos fatais, a morte advém em 5 a 10 dias de doença (LEÃO et al., 1997).

2.8 Diagnóstico da leptospirose

O diagnóstico precoce da leptospirose é crucial para a intervenção terapêutica apropriada e prevenção da instalação de formas sintomatológicas graves

(RIEDIGER, 2007). A doença constitui um sério problema médico e de saúde pública. Na maioria dos casos, a história epidemiológica, os sinais e sintomas clínicos da doença não permitem o diagnóstico, sendo necessária a confirmação laboratorial (FAINE, 1982). Reações sorológicas e moleculares foram descritas para o diagnóstico da leptospirose tanto em humanos como em animais (LUCCHESI et al., 2004; BROD et al., 2005; OOTEMAN et al., 2005; ADESIYUN et al., 2006; BOMFIM et al., 2007).

O diagnóstico pode ser realizado por diferentes técnicas laboratoriais baseadas na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al., 1999), porém todos os métodos apresentam inconvenientes. A soroaglutinação 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, que os testes sorológicos devem ser realizados levando em consideração dados epidemiológicos, bem como as informações obtidas na anamnese e no exame físico (BOLIN, 1996). É a técnica mais recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e tem como desvantagem a falta de sensibilidade em detectar anticorpos antes da segunda semana de doença uma vez que os títulos máximos são alcançados durante a terceira semana (RIBEIRO, 2003).

Cultura, exame direto através da microscopia de campo escuro, imunofluorescência e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também podem ser utilizados. Métodos sorológicos podem falhar na detecção de infecções onde a leptospira não provoque uma resposta imune capaz de reagir com os padrões conhecidos, e muitos hospedeiros podem apresentar baixos títulos de anticorpos (LEVETT, 2001; SACHSE; FREY, 2003).

A microscopia de campo escuro consiste na observação da motilidade típica da leptospira em amostras clínicas de sangue, líquido cérebro espinhal, urina ou fluido peritoneal. Artefatos na amostra podem ser confundidos com leptospirosas, gerando dúvidas no resultado do exame. Trata-se de um método simples, mas que pode resultar em falso negativo quando há poucas bactérias na amostra. Quando correlacionado com parâmetros clínicos pode ajudar no diagnóstico precoce da

leptospirose, porém não deve ser usado isoladamente (SAMBASIVA et al., 2003). Entretanto, essa técnica apresenta 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).

A prova de imunoperoxidase indireta, utilizando soro hiperimune com anticorpos contra sorovares de leptospiras, tem sido utilizada para o diagnóstico da leptospirose em órgãos de animais infectados (SCANZIANI et al., 1991).

As técnicas de diagnóstico da leptospirose atualmente disponíveis apresentam baixa sensibilidade e ou especificidade. Por isso, tem havido um grande esforço no sentido de desenvolver testes rápidos e eficientes, baseados em técnicas de biologia molecular (NASSI et al., 2003).

Uma das ferramentas mais poderosas em biologia molecular é a PCR. Desenvolvida em 1985 por Kary Mullis e colaboradores, atualmente é intensivamente utilizada em pesquisas (NICHOLAS, 1999). A PCR é um método rápido, sensível e específico que possibilita o diagnóstico a partir de amostras pequenas de DNA (BAL et al., 1994). 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). A principal limitação da PCR é a incapacidade de identificar o sorovar infectante. Apesar de não ser 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 *primers*, 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).

KEE et al., (1994) demonstraram que a PCR, comparado a SAM, é um método eficaz, diagnosticando a doença antes do desenvolvimento de anticorpos ou quando os títulos estão baixos e curso clínico confuso.

2.9 Biologia molecular

A disponibilidade de seqüências genômicas completas tem possibilitado o estudo de mudanças no conteúdo gênico e nucleotídico durante a evolução de linhagens de bactérias patogênicas e saprófitas (REGO et al., 2007).

Recentes avanços na tecnologia do DNA podem fornecer uma nova abordagem no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas de alta sensibilidade e rapidez. A PCR está sendo amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas causadas por microrganismos de crescimento lento ou fastidioso, como a leptospirose humana ou animal, podendo ser usado em combinação com outros testes sorológicos melhorando a sensibilidade do diagnóstico da leptospirose na primeira fase da doença (KEE et al., 1994; FONSECA et al., 2006; WANGROONGSARB et al., 2005).

Foram descritos como alvos da amplificação genes codificadores de rRNA 16S ou 23S (FUKUNAGA; MIFUCHI, 1989; BARIL et al., 1992; MERIEN et al., 1992; ZHANG et al., 1993) ou elementos repetitivos no genoma (WOODWARD et al., 1991; ZUERNER; 1995). GRAVEKAMP et al., (1993) desenvolveram os *primers* denominados G1/G2 referente ao gene *secY*, localizado no locus S10-*spc-α* de todas as espécies de leptospirosas patogênicas, excetuando *L. kirschneri*.

As ferramentas de biologia molecular, oferecerem grandes vantagens em relação às limitações dos métodos clássicos de cultivo e inoculação em animais, porém estes métodos ainda não podem ser abandonados, pois através deles é que é possível o conhecimento da identidade antigênica dos sorovares presentes em uma determinada região (FAINE et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo geral do estudo foi utilizar a técnica da PCR para o diagnóstico da leptospirose em amostras clínicas de cães.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Aperfeiçoar a técnica de extração de DNA total em amostras de sangue e urina de cães;
2. Otimizar a técnica da PCR para o diagnóstico da leptospirose em amostras de sangue e urina de cães infectados naturalmente;
3. Verificar a presença de *Leptospira* sp em amostras de sangue e urina;
4. Realizar a técnica de PCR com os *primers* G1 e G2 que amplificam a região do gene secY de leptospiros patogênicas.

4 ARTIGOS

Os resultados obtidos serão apresentados em forma de artigo científico, o qual será submetido ao periódico "*Ciência Animal Brasileira*". Desta forma, os artigos estão formatados conforme exigência dos periódicos científicos em que serão publicados.

5 CAPÍTULO 1

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Leptospira spp.* EM CÃES ERRANTES E DOMICILIADOS INFECTADOS NATURALMENTE

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira spp.* Nos cães, os sinais clínicos da leptospirose podem depender de fatores como idade, estado imunológico e patogenicidade do sorovar e os animais podem apresentar sinais agudos ou subclínicos, mantendo-se assintomáticos. O diagnóstico precoce é crucial para a adoção terapêutica apropriada e prevenção da instalação de formas sintomatológicas graves. Diversas técnicas laboratoriais baseadas na detecção do agente ou do material genético podem ser utilizadas. A soroaaglutinação microscópica é a técnica mais recomendada pela OMS e é a mais utilizada em todo o mundo. Sua desvantagem é a falta de sensibilidade nas semanas iniciais da doença. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) está sendo extensivamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas demonstrando eficácia no diagnóstico da doença antes do desenvolvimento de anticorpos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica da PCR com os *primers* G1 e G2, que amplificam o fragmento de 285 pb da região do gene *secY* da *Leptospira spp.*, em 200 amostras de sangue de cães domiciliados e errantes provenientes do município de Ilhéus-Ba. Nove animais (4,5%) apresentaram resultados considerados positivos para leptospirose. A PCR gerou banda específica, visível e compatível aos 285 pares de base (pb) da *Leptospira SP* amplificada pelos *primers*.

Palavras-chave: diagnóstico molecular, DNA, infecção.

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Leptospira* spp. IN STRAY DOGS AND ADDRESS NATURALLY INFECTED

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* spp. In dogs, clinical signs of leptospirosis may depend on factors such as age, immune status and pathogenicity of the serovar and the animal may show signs or sub-acute and remained asymptomatic. Early diagnosis is crucial for the adoption of appropriate therapy and preventing the onset of severe symptomatic forms. Several laboratory techniques based on detection of the agent or genetic material can be used. The microscopic agglutination test is the most often recommended by WHO and is widely used around the world. Its disadvantage is the lack of sensitivity in the early weeks of the disease. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is being extensively used in the diagnosis of infectious diseases shown to be effective in diagnosing the disease before the development of antibodies. This study aimed to evaluate the PCR technique with primers G1 and G2, which amplify the fragment of 285 bp gene region secY of *Leptospira* spp in blood samples of domiciled and stray dogs from the municipality of Ilhéus-Ba. Nine animals (4.5%) presented results that were positive for leptospirosis. The PCR produced specific band, visible and compatible to 285 base pairs (bp) of *Leptospira* sp amplified by primers.

Keywords: molecular diagnosis, ADN, infection.

5.1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp. No Brasil, é considerada uma doença endêmica e constitui um sério problema de saúde pública. A manutenção do agente em regiões urbanas e rurais é favorecida pelo clima tropical associado à situação sócio-econômica e sanitária da população (SAKATA et al., 1992; KO et al., 1999; JOUGLARD, 1999; COSTA et al., 2001; WHO, 2003; PAPPACHAN et al., 2004; McBRIDE et al., 2005).

Diversas espécies domésticas, sinantrópicas e silvestres podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação da bactéria no ambiente. A eliminação da *Leptospira* pela urina dos portadores ocorre por períodos de tempo que podem variar de poucas semanas a vários meses, entre os animais domésticos, e por toda vida no caso dos roedores (WEBSTER et al., 1995; LANGONI et al., 1999; MATHIAS et al., 1999; GIRIO et al., 2004; CORRÊA et al., 2004; DELBEN et al., 2004; HERRMANN et al., 2004; PESCADOR et al., 2004; TESSEROLI et al., 2005; MAGAJEVSKI et al., 2007; SILVA et al., 2009).

A doença exibe um caráter sazonal que coincide com os períodos de intensa precipitação pluviométrica e suas conseqüentes enchentes, o que aumenta o risco de infecção em humanos e animais, devido a maior exposição das mucosas e da pele com a água contaminada principalmente pela urina de roedores (SAKATA et al., 1992; WHO, 2003; PAPPACHAN et al., 2004).

Nos cães, os sinais clínicos da leptospirose podem depender de fatores como idade, estado imunológico e virulência do sorovar e os animais podem apresentar sinais agudos caracterizados por febre, icterícia, vômito, depressão e anorexia, sinais ictero-hemorrágicos, com prostração, hemorragias difusas, especialmente no pulmão e no sistema digestório, insuficiência renal, desidratação e óbito, ou até mesmo infecção subclínica ou crônica mantendo-se, assim, assintomáticos (PINNEY, 1998; ADIN et al., 2000; SANTIM et al., 2006).

O diagnóstico precoce é crucial para a adoção da terapia apropriada e prevenção da instalação de formas sintomatológicas graves e diferentes técnicas laboratoriais baseadas na detecção do agente ou do material genético podem ser

utilizadas (RIEDIGER, 2007; FAINE et al., 1999; SANTA ROSA, 1970). A técnica mais recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é a sorologia microscópica (SAM) com antígenos vivos, sendo a mais utilizada em todo o mundo. Sua desvantagem é a falta de sensibilidade em detectar anticorpos nas duas semanas iniciais da doença (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) está sendo extensivamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas causadas por microrganismos de crescimento lento ou fastidioso (KEE et al., 1994; WANGROONGSARB et al., 2005; FONSECA et al., 2006), demonstrando eficácia no diagnóstico da doença antes do desenvolvimento de anticorpos ou quando os títulos estão baixos e curso clínico confuso (KEE et al., 1994). TEIXEIRA et al., (2008) demonstraram a importância da biologia molecular ao relatar um caso clínico em que um cão, com sintomatologia sugestiva de leptospirose, apresentou sorologia negativa e, em contrapartida, PCR positiva. Sua limitação está na incapacidade de identificar o sorovar infectante, porém, pode diferenciar leptospirosas patogênicas de espécies saprófitas (BRANGER et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica da PCR com os *primers* G1 e G2, que amplificam o fragmento do gene *secY* de 285 pb da *Leptospira* spp, em amostras de sangue de cães provenientes do município de Ilhéus.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área e animais de estudo

Foram analisados cães do município de Ilhéus, localizado no litoral sul do Estado da Bahia (14° 47' 55" de latitude sul, 39° 02' 01" de longitude oeste), no nível do mar e possui área territorial de 1.840,991 Km². O clima é tropical e o índice de precipitação pluviométrica média anual está entre 1600 - 1800 mm. A vegetação consiste predominantemente em Mata Atlântica. A população estimada é de 219.710 habitantes, de acordo com o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2008 (IBGE, 2008).

A amostra foi calculada com base na população total de cães do município a partir da população humana. Para o cálculo da proporção cão/homem, foi utilizada a

relação 1:10, que redundou em um total de 22.000 animais. O cálculo da amostra foi executado com o programa EpiInfo 6.4 (DEAN e ARNER, 2007), considerando-se um nível de confiança de 95%, a possibilidade de detecção da doença de 50% (correspondente a doenças de ocorrência desconhecida em determinada população) e um erro estatístico de 7%, resultando no N amostral de 196 que foi aumentado para 200. As informações obtidas junto aos proprietários foram inseridas em uma planilha eletrônica elaborado no programa de computador Microsoft Office Excel.

Metade do número amostral (100 animais) foi proveniente da rotina de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (HV-UESC). As amostras dos animais errantes foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilhéus-Ba. A coleta foi realizada de forma aleatória e independentemente do quadro clínico do animal, sexo ou idade. O sangue foi obtido assepticamente por venopunção da jugular ou cefálica após contenção adequada do animal, utilizando-se seringas de 5 ml. Em seguida, o sangue foi transferido para tubo de ensaio com tampa identificado contendo 0,5 mL de anticoagulante EDTA. O sangue foi mantido em freezer a -20° C, até o momento da extração de DNA total.

Para determinação das variáveis associadas à leptospirose no grupo de animais domiciliados atendidos no HV-UESC foi utilizada uma entrevista com dados epidemiológicos com os proprietários. Os dados referentes ao sexo, idade, raça e fatores de risco foram preenchidos no momento da coleta de sangue. No caso das amostras dos animais errantes recolhidos pelo CCZ, apenas o sexo, a presença de sintomatologia clínica e a idade estimada foram computados.

5.2.2 Análise estatística

Os resultados obtidos após o estudo das variáveis foram submetidos à análise estatística através do Qui-quadrado (X^2) utilizando-se do programa SPSS para estimação de risco e o programa EpiInfo 6.4 (DEAN e ARNER, 2007) para tabelas de contingência.

5.2.3 Extração do DNA das amostras de sangue

Logo após o descongelamento, 500 mL de sangue foi colocado em um *ependorf* junto a 500 µL de água miliQ. As amostras foram homogeneizadas,

centrifugadas 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 µL o Tampão de Extração (250 µL Tris – HCL 10mM + 250 µL EDTA 0,5M + 5 µL Proteinase K 100 µg/µL + 10 µL Triton X – 100). Cada amostra foi levada ao vórtex e aquecida em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se 300 µL Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5 %, vórtex e levou-se ao banho-maria a 50°C por 30 minutos novamente.

Adicionou-se Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico e homogeneizou-se a amostra manualmente. Aguardou-se 2 minutos para centrifugar a 14000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf* com o auxílio de uma pipeta.

A lavagem foi repetida com 130 µL de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf* com o auxílio de uma pipeta.

Precipitou-se o DNA com 100 µL de Acetato de Amônio 5 M e 900 µL de etanol a 100%. Agitou-se manualmente aguardando 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado com a pipeta e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 95%. Centrifugou-se novamente a 14000 por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, secou-se o pellet em temperatura ambiente e este foi eluído em 500 µL de TE. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da PCR.

5.2.4 Amplificação do DNA

O sistema utilizou *primers* específicos para amplificação de um fragmento do gene *secY* do genoma das espécies patogênicas de *Leptospira* spp., exceto *L. kirschneri* (GRAVEKAMP *et al.*, 1993). Os *primers* foram sintetizados por empresa especializada.

5.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O sistema de PCR selecionado foi submetido a etapas de otimização para confirmação da concentração ótima de MgCl₂ e da temperatura ideal de anelamento dos oligonucleotídeos.

Os *primers* utilizados na reação de amplificação do gene *secY* tinham as seguintes seqüências nucleotídicas: G1[direto] - 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3'; G2 [reverso] - 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3'. O DNA extraído de todas as amostras clínicas foi amplificado conforme protocolo de PCR descrito anteriormente (GRAVEKAMP et al., 1993), com algumas modificações.

A amplificação do DNA foi realizada num volume final de 35 µl. A mistura de reação consistiu em 4µL de Tampão Taq 10X, 3µL de MgCl₂, 3µL de cada iniciador (G1 e G2), 1µL de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot- RS). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para PCR para 16 µl. A seguir foram adicionados 19 µl de DNA extraído.

Para a primeira reação de PCR foi utilizado um termociclador MJ96G-Biocycler. O primeiro ciclo consistiu de desnaturação a 95°C por 5 minutos, anelamento dos *primers* a 68°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os 34 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a 94°C por 1m in30s, anelamento dos *primers* a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma etapa final de 5 minutos a 72°C.

A segunda reação, consistiu em 4µL de Tampão Taq polimerase 10X, 3 µL de MgCl₂, 4µL de cada *primer* (G1 e G2), 1,5 µL de dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1 U de Taq DNA Polimerase, 2,0 µL de água para PCR e 16 µl do DNA molde produto da primeira amplificação. O primeiro ciclo consistiu de desnaturação a 95°C por 5 minutos, anelamento dos *primers* a 68°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os 34 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a 94°C por 1min30s, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma etapa final de 5 minutos a 72°C conferiu extensão completa dos *primers*.

Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle negativo de amplificação (5 µl de água ultrapura) e um controle positivo de amplificação (5 µl de DNA de um animal positivo).

5.2.6 Eletroforese dos produtos da PCR

Alíquotas dos produtos da PCR e marcador de peso molecular 50 pb (Ludwing Biotec) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Bioagency) a 2%. Os produtos foram então separados por eletroforese horizontal utilizando TAE

1X como tampão de corrida, sob 80 V por 45 minutos. Em seguida, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo, exposto à luz ultravioleta em transiluminador (L-PIX Loccus Biotecnologia) para revelação dos fragmentos separados e comparação do tamanho dos fragmentos do produto da PCR com aqueles gerados pelo marcador de peso molecular. O gel foi fotodocumentado e a imagem foi digitalizada. A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na identificação visual das bandas no gel de agarose.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas técnicas de diagnóstico baseadas na detecção do material genético da *Leptospira* estão sendo empregadas, entre elas está a PCR que é um método rápido, sensível e específico possibilitando o diagnóstico a partir de uma pequena amostra de DNA, entretanto, pode apresentar variações de sensibilidade e especificidade dependendo de alguns fatores como o tipo, a conservação e o tempo de estocagem da amostra biológica, os iniciadores utilizados e os reagentes empregados (BAL et al., 1994; KRITSKI; MELO, 1997; VELOSO et al., 2000).

Dos 200 cães avaliados neste estudo, 100 domiciliados e 100 errantes, nove (4,5%) apresentaram resultados considerados positivos para leptospirose, sendo cinco animais domiciliados e quatro errantes, provenientes do CCZ-Ilhéus, Bahia. A PCR das amostras de sangue dos animais positivos gerou banda específica, visível e compatível aos 285 pares de base (pb) da *Leptospira* amplificada pelos *primers* G1 e G2, indicando a presença da bactéria na circulação sanguínea (Figura 1).

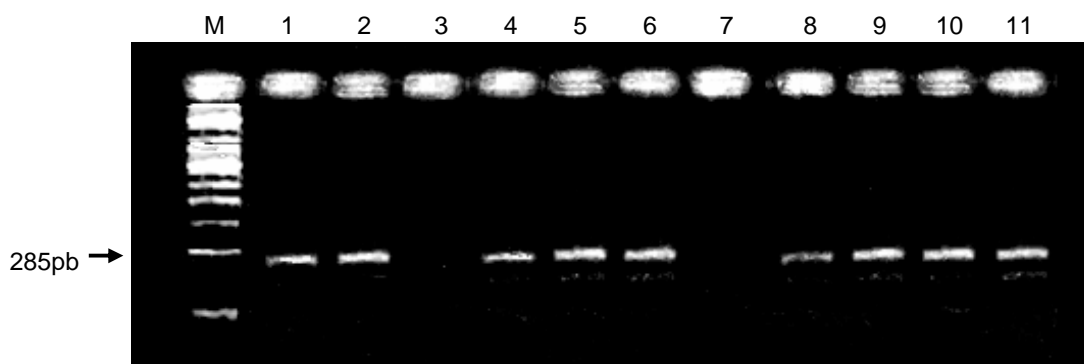


Fig. 1. Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos da PCR. M: Marcador molecular 50pb; 1-2-4-5-6: animais domiciliados positivos; 8-9-10-11: animais errantes positivos; 3-7: animais negativos.

No Brasil, existem poucos estudos relacionados à prevalência da leptospirose em cães através da PCR. Levantamentos sorológicos em cães errantes indicam que o maior percentual (85%) foi observado por Viegas et al., (2001) em Salvador, Bahia. Ávila et al., (1998) encontraram 34,8% no Município de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Percentuais inferiores (2,66%) foram relatados no mesmo estado (JOUGLARD et al., 2000). Em estudos mais recentes, a sorologia para leptospirose em cães errantes encontrada na Bahia foi de 28,6 % (HENTGES et al., 2008), em Santa Catarina, 10,5% (BLAZIUS et al., 2005), na Paraíba, 20% (BATISTA et al., 2004). Magalhães et al. (2006) observaram a prevalência de 13,1% para leptospirose em cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência de leptospirose em cães domiciliados (5%) e cães errantes (4%). Os resultados obtidos no presente trabalho refutam os obtidos por Viegas et al., (2001), Garcia e Martins (2002) e Blazius et al., (2005), onde testes sorológicos demonstraram que cães de rua têm incidência muito mais elevada de infecções causadas por *Leptospira* do que os cães domiciliados. De acordo com a entrevista aos proprietários, há indícios de que grande parte dos animais domiciliados tem a mesma probabilidade de infecção que os animais errantes do município devido aos hábitos e cultura dos mesmos.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos pela análise das variáveis que apresentaram significância estatística.

As variáveis relacionadas ao ambiente e condições sanitárias dos animais errantes não puderam ser contempladas no presente trabalho devido à metodologia empregada, considerando que o CCZ não possuía os dados sobre os animais. Entretanto, sabe-se que animais errantes estão sujeitos a diversos fatores de risco como o livre contato com outros cães, contato com roedores, lixo e lama, de acordo com o ambiente em que vivem.

Não houve significância estatística entre a frequência de animais positivos para a leptospirose em relação ao sexo ($p= 0,455$) e idade ($p=0,644$).

Animais sem raça definida apresentaram um risco 1,19 vezes maior de infecção em relação aos animais de raça. O fato pode ser explicado pelo fato de que esses animais, geralmente, têm mais acesso à rua, o que aumenta o risco de

infecção pelo contato direto ou indireto com outros animais ou através do acesso a áreas alagadiças (QUERINO et al., 2003; BATISTA et al., 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que a presença e/ou contato com roedores ($p= 0,362$) e o acesso a rua ($p= 0,113$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa, devido, talvez, ao número pequeno da amostra, no entanto, todos os animais positivos tiveram acesso a essas variáveis. É provável que o hábito de caçar roedores e o acesso a rua sejam fatores que estejam interligados, favorecendo a disseminação da leptospirose entre os cães (QUERINO et al., 2003). Não houve animais positivos entre os cães que não tinham acesso à rua.

Tabela 1. Resultado das variáveis analisadas para a determinação dos fatores de risco para a leptospirose em 200 cães provenientes do município de Ilhéus-Ba.

Características	Cães positivos	Cães negativos	Significância estatística (p)	RP (razão de prevalência)
Suspeita clínica	47%	0,55%	<0,0001	86,12
Prostração	50%	0,5%	<0,0001	21,22
Icterícia	70%	1,17%	<0,001	49,25

Os trabalhos de levantamento soroepidemiológicos de leptospirose em cães, em vários estados brasileiros, mostram uma grande variabilidade em relação à frequência. Esse fato pode ser explicado pela multiplicidade de fatores que influenciam a ocorrência da doença, tais como clima, sendo mais elevada em regiões tropicais, índice pluviométrico e condições sanitárias, como a coleta de lixo deficiente, o acúmulo de lama e a elevada população de roedores (ALVES et al. 2000; BLAZIUS et al., 2005). Os cães errantes e domésticos podem, pelo seu estreito convívio com o homem, servir de importante fonte de infecção, participando na epidemiologia da doença (GENOVEZ, 1996; FARRINGTON; SULZER, 1982).

Resultados negativos em animais 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 da doença.

5.4 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, conclui-se que os cães, tanto errantes quanto domiciliados, do município de Ilhéus - Bahia estão sujeitos a infecção por *Leptospira* spp, podendo servir de importante fonte de infecção para o homem e para outros animais. Este estudo mostrou a viabilidade do diagnóstico da leptospirose em amostras de sangue de cães infectados naturalmente através da PCR. A técnica se mostrou uma ferramenta útil, rápida, eficaz e de baixo custo, podendo ser implantada na rotina dos laboratórios, permitindo, assim, que medidas adequadas de tratamento e profilaxia sejam adotadas com maior antecedência.

5.5 REFERÊNCIAS

ADIN, C. A.; COWGILL, L. D. Treatment outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 3, p. 371-375, 2000.

ALVES, C. J.; ANDRADE, J. S. L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z. M.; AZEVEDO, S. S.; SANTOS, F. A. Avaliação dos níveis de aglutinina anti-*Leptospira* em cães no Município de Patos – PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p.17-21, 2000.

ÁVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 28, p. 107-110, 1998.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1894-1898, 1994.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; VASCONCELOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; LIMA, F. S.; NETO, J. O. A. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 131-136, 2004.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, F. A. L.; LIMA, F. S.; ARAÚJO NETO, J. O. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 179-185, 2005.

BLAZIUS, D. R.; ROMÃO, P. R. T.; BLAZIUS, E. M. C.; SILVA, O. S. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira spp* na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 1952-1956, 2005

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**, v. 243, n. 2, p. 437-445, 2005.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 189-193, 2004.

COSTA, E.; COSTA, Y. A.; LOPES, A. A.; SACRAMENTO, E.; BINA, J. C. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 261-267, 2001.

DEAN, A. G.; ARNER, T. **EpiInfo: Epidemiology of program office**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>>. Acesso em: Ago 2009.

DELBEN, A. C. B.; FREIRE, R. L.; SILVA, C. A.; MÜLLER, E. E.; DIAS, R. A.; NETO, J. S. F.; FREITAS, J. C. Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Austrália: MediSci, 1999. 272p.

FARRINGTON, N.P.; SULZER, K. R. Canine Leptospirosis in Puerto Rico. **International Journal of Zoonoses**, v. 9, n. 1, p. 45-50, 1982.

FONSECA, C.; FREITAS, T. V. L.; CALO, R. E.; SPINOSA, C.; ARROYO SANCHES, M. C.; SILVA, M. V.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 9, p. 1699-1707, 2006.

GENOVEZ, M. E. Leptospirose em cães. **Pet Vet**, v. 1, n. 1, p. 6-9, 1996.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G. J. J. M.; EVERARD, C. O. R.; HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1691-1700, 1993.

HENTGES, A.; RECUERO, A. L. C.; STARK, C.; SILVEIRA, D. R.; JORGE, S.; MARTINS, P. L.; BROD, C. S.; FERNANDES, C. P. H. Anticorpos anti *Leptospira* em soros de cães errantes. In: **XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação**. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2008.

HERRMANN, G. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; AMARAL HADDAD, J. P. A.; RESENDE, R.; RODRIGUES, R. O.; LEITE, R. C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, p. 443-448, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso 20 Jul 2009.

JOUGLARD, S. D. D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, p. 181-185, 2000.

JOUGLARD, S. D. D. Prevalência da leptospirose canina, fatores de risco e constituição da população no meio rural do município de Pelotas, RS. 1999. (Tese mestrado Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS - Brasil.

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

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet, London**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KRITSKI, A. L.; ROSSETTI, M. L.; BONFIM, G.; CASTELO, A.; MELLO, F. C. Q. Reação em Cadeia da Polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. **J Pneumologia**, v. 23, n. 1, p. 33-42, 1997.

LANGONI, H.; FAVA, C. D.; CABRAL, K. G.; SILVA, A. V.; CHAGAS, S. A. P. Aglutininas antileptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, 1999.

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

MAGAJEVSKI, F. S.; GÍRIO, R. J. S.; MEIRELLES, R. B. Pesquisa de *Leptospira* em fetos de vacas abatidas no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 74, n. 2, p. 67-72, 2007.

MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J. A.; MOREIRA E. C.; WILKE, V. M. L.; HADDAD, J. P. A.; MENESES J. N. C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.167-174, 2006.

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S.; DUARTE, J. M. B. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 1, p. 112-114, 1999.

McBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.

PAPPACHAN, M.; SHEELA, M.; ARAVINDAN, K. Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. **Journal of Epidemiology and Community Health, California**, v. 58, p. 1054-1055, 2004.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINE, L.G.; LORETTI, A.P.; JÚNIOR, E.W.; FRANTZ, F.J.; DRIEMEIER, D. Aborto eqüino por *Leptospira sp.* **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 271-274, 2004.

PINNEY, C. C. German Shorthaired Pointers: Everything about purchase, care, nutrition, breeding behavior, and training. **Barrons Educational Series Inc.** 1998. 120p.

QUERINO, A. M. V.; DELBEM, A. C. B.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, F. G.; MÜLLER, E. E.; FREIRE, R. L.; FREITAS, J. C. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina – PR. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.

RIEDIGER, I. N. **Comparação dos diagnósticos sorológico e molecular da leptospirose humana na região metropolitana de Curitiba, Paraná Universidade Federal do Paraná.** 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

SAKATA, E. E. et al. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 217-21, 1992.

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; SILVA, A. S.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 29-30, p. 19-27, 1970.

SANTIM, K. et al. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em cães clinicamente sadios e em cães com suspeita clínica de leptospirose. **Clínica Veterinária**, n. 60, p. 48-52, 2006.

SILVA, E. F.; SEYFFERT, N.; JOUGLARD, S. D. D.; ATHANAZIO, D. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; BROD, C. S. Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 174-176, 2009.

TESSEROLI, G. L.; ALBERTI, J. V. A.; AGOTTANI, J. V. B.; FAYZANO, L.; WARTH, J. F. G. Soroprevalência para leptospirose em cães de Curitiba, Paraná. **Revista Acadêmica, Curitiba**, v. 3, n. 4, p. 35-38, 2005.

TEIXEIRA, M. A.; GONÇALVES, M. L. L.; RIEDIGER, I. N.; PROSSER, C. S.; SILVA, S.F.C.; BIESDORF, S.M.; MOSKO, P.R.E.; MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico da leptospirose aguda em um cão. **Clínica Veterinária**, n. 73, p. 44-48, 2008.

VELOSO, I. F.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E.; MOREIRA, E. C. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p.339-343, 2000.

VIEGAS, S.; TAVARES, C. H. T.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, A. R.; MENDONÇA, F. F.; SANTOS, M. F. P. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na Cidade de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produ o Animal**, v. 2, n. 1, p. 21-30. 2001.

WANGROONGSARB, P.; YASAENG, S.; PETKANACHANAPONG, W.; NAIGOWIT, P.; HAGIWARA, T.; KAWABATA, H.; KOIZUMI, N. Applicability of polymerase chain reaction to diagnosis of leptospirosis. **Journal of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 28, p. 43-47, 2005.

WEBSTER, J.P.; ELLIS, W.A.; MACDONALD, D.W. Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. **Epidemiology and Infection**, v. 114, n. 1, p. 195-201, 1995.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003. 122p.

6 CAPÍTULO 2

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira* spp. EM AMOSTRAS DE URINA DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE

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. As técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas no diagnóstico de doenças infecciosas causadas por bactérias de crescimento lento ou não cultiváveis. A PCR é uma das técnicas mais utilizadas, sendo um método rápido, sensível e específico, podendo diagnosticar a doença antes do desenvolvimento dos títulos de anticorpos ou quando os títulos estão baixos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilidade da PCR no diagnóstico da *Leptospira* spp na urina de 15 cães provenientes do município de Ilhéus-Ba, com suspeita clínica de leptospirose, utilizando-se o par de *primers* G1 e G2. Não houve amplificação nas amostras de urina que foram armazenadas a -20°C. Amostras processadas imediatamente após coleta produziram bandas específicas compatíveis aos 285 pb da *Leptospira* amplificadas pelos *primers*. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a PCR é um método de diagnóstico eficaz, sendo recomendado o processamento da amostra no mesmo dia da coleta da urina.

Palavras-chave: PCR, *Leptospira*, DNA, infecção.

MOLECULAR DETECTION OF *Leptospira* spp IN URINE SAMPLES FROM DOGS NATURALLY INFECTED

ABSTRACT

Leptospirosis is an important zoonosis caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* spp. The diversity and specificity of symptoms may complicate the final diagnosis and is often necessary to use laboratory tests. The techniques of molecular biology can be used in the diagnosis of infectious diseases caused by bacteria slow-growing or not cultivable. PCR is one of the most used, and a rapid, sensitive and specific and can diagnose the disease before the development of antibody titers, or when the bonds are low. The aim of this study was to evaluate the usefulness of PCR in the diagnosis of *Leptospira* spp in the urine of 15 dogs from the city of Ilhéus-Ba, with clinical suspicion of leptospirosis, using the primer pair G1 and G2. No amplification was detected in the urine samples that were stored at -20°C. Samples processed immediately after harvest produced specific bands compatible to 285 bp of *Leptospira* amplified by primers. Based on the results obtained, it can be concluded that PCR is an effective method of diagnosis, and recommended sample processing on the same day of urine collection.

Keywords: PCR, *Leptospira*, ADN, infection.

6.1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que pode acometer humanos, animais silvestres e muitas espécies domésticas (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2004).

No Brasil, assume caráter epidêmico relacionado, principalmente, às precárias condições de saneamento básico associado à conseqüente 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 (BROD et al., 2005). No meio urbano, a grande fonte de infecção para o homem e para o cão é o contato com roedores ou com a urina contaminada. No ambiente rural, as principais fontes de infecção estão relacionadas principalmente a roedores e outros animais silvestres.

O diagnóstico de doenças infecciosas com detecção de microrganismo de crescimento lento ou daqueles que não são cultiváveis se torna possível através 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 (BAL et al., 1994; MOLINA; TOBO, 2004).

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 confuso. 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 (BAL et al., 1994; KEE et al., 1994; LEVETT, 2001; SACHSE; FREY, 2003).

A comparação dos resultados obtidos entre a análise da urina e do soro através da PCR e da sorologia, através da 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 (BAL et al., 1994). A utilização da PCR em urina de cães pode ser útil no diagnóstico precoce da leptospirose (AKUZAWA et al., 2001).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilidade da 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.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Área e animais de estudo

Foram incluídos, nesse estudo, 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, prostração e/ou icterícia. A urina, na quantidade de 15 mL foi coletada através de sonda uretral estéril, transferida para tubos tipo Falcon, com capacidade para 50 mL identificados. Metade da urina coletada foi congelada e outra foi processada imediatamente.

6.2.2 Extração do DNA das amostras de urina

Após inversões repetidas do tubo Falcon, alíquotas de 2 mL foram retiradas com pipeta automática e transferidas para tubos tipo *ependorf* de 2,0 mL. Após dez minutos de centrifugação a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 100 µL de água miliQ. Centrifugou-se as amostras novamente. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 µL o Tampão de Extração (250 µL Tris – HCL 10mM + 250 µL EDTA 0,5M + 5 µL Proteinase K 100 µg/µL + 10 µL Triton X – 100). Cada amostra foi levada ao vórtex e aquecida em banho-maria a 50°C por 60 minutos. Adicionou-se Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico e homogeneizou-se a amostra manualmente. Centrifugou-se as amostras a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf* com o auxílio de uma pipeta. Precipitou-se o DNA com 100 µL de Acetato de Amônio 5 M e 900 µL de etanol a 100%. Agitou-se manualmente. As amostras foram incubadas a -20°C por

30 minutos. Após esse período, foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com a pipeta e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 14000 por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, secou-se o pellet em temperatura ambiente e este foi eluído em 600 µL de Tampão TAE (Ludwing Biotec). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da PCR.

6.2.3 Condições de amplificação do DNA

Para cada amostra, preparou-se um mistura de reagentes (Mix) em um microtubo para capacidade para 200µL que consistiu em 4 µL de Tampão Taq, 3 µL de MgCl₂, 3 µL de cada *primer* (G1 e G2), 1 µL de dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 0,5 µL de *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot- RS). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para 20 µL. A seguir foram adicionados 15 µL de DNA extraído. O sistema utilizou *primers* específicos para amplificação de um fragmento do gene *secY* do genoma das espécies patogênicas de *Leptospira* spp., exceto *L. kirschneri* (GRAVEKAMP *et al.*, 1993). Os *primers* foram sintetizados por empresa especializada e possuíam as seguintes seqüências nucleotídicas: G1[direto] - 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3'; G2 [reverso] - 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3'.

Para a PCR foi utilizado um termociclador MJ96G-Biocyler. O primeiro ciclo consistiu de desnaturação a 95°C por 5 minutos, anelamento dos *primers* a 68°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os 34 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a 94°C por 1min30s, anelamento dos *primers* a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma etapa final de 5 minutos a 72°C conferiu extensão completa dos *primers*.

6.2.4 Eletroforese dos produtos de PCR

A visualização do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0 % utilizando-se tampão de corrida TAE 1 X. Os produtos foram então separados por eletroforese horizontal, sob 80 V por 45 minutos. Em seguida, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo, exposto à luz ultravioleta em

transiluminador (L-PIX Loccus Biotecnologia) para revelação dos fragmentos separados e comparação do tamanho dos fragmentos do produto da PCR com aqueles gerados pelo marcador de peso molecular. O gel foi fotodocumentado e a imagem foi digitalizada. A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na identificação visual das bandas no gel de agarose.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 15 cães analisados, com quadro clínico sugestivo de leptospirose, 2 (13,3%) apresentaram resultados considerados positivos, sendo animais domiciliados.

As amostras de urina congeladas e descongeladas antes do processamento produziram resultados negativos uma vez que *Leptospira* pode sofrer lise durante a estocagem em meios ácidos ou pelo contato com substâncias inibidoras na própria urina tais como uréia e creatinina (LUCCHESI et al., 2004; BOOM et al., 2004). Além disso, existe a possibilidade de que a alíquota utilizada não apresentasse a bactéria uma vez que a sua eliminação pela urina é intermitente (FAINE, 1982).

A realização da PCR logo após a coleta da urina resultou em bandas específicas compatíveis aos 285 pb da *Leptospira* (Figura 2).

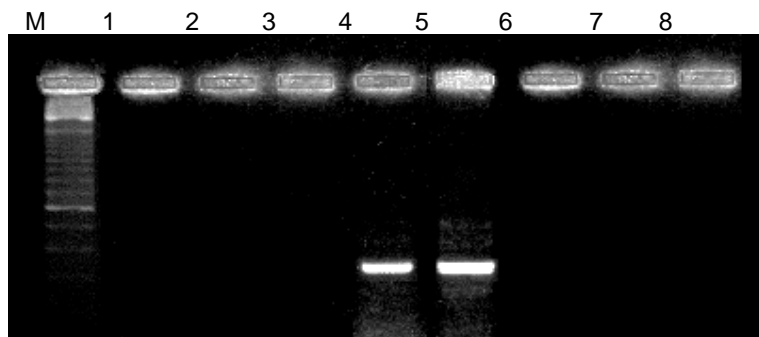


Fig. 2. Eletroforese em gel de agarose 2,0 % dos produtos da PCR. M: Marcador molecular; 1-2-3-6-7: animais negativos; 4-5: animais positivos.

Isso pode ser explicado pelo fato de que algumas bactérias, inclusive a *Leptospira*, podem sofrer lise durante a estocagem a baixas temperaturas e seu ácido nucléico pode ser perdido junto ao sobrenadante após a centrifugação

utilizada nas fases iniciais de extração do DNA para concentração dos microrganismos (LUCCHESI et al., 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam os obtidos por Riediger (2007) que demonstram a sensibilidade e especificidade do conjunto de iniciadores G1/G2 na análise de amostras de urina no diagnóstico da leptospirose.

6.4 CONCLUSÃO

Conclui-se, com este trabalho, que a PCR pode ser utilizada em amostras de urina como um método de diagnóstico da leptospirose canina. O método pode ser considerado rápido, de baixo custo e eficiente no diagnóstico na fase de leptospirúria. O congelamento pode provocar a lise das leptospiras, sendo recomendado o processamento da amostra no mesmo dia da coleta da urina. 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.

6.5 REFERÊNCIAS

AKUZAWA, M.; TANAKA, M.; MURAKAMI, T.; OISHI, A.; DEGUCHI, E.; MISUMI, K.; FUJIKI, M.; YASUDA, N.; SUGIMURA, T.; FUSHUKU, S. PCR for detecting *Leptospira* in canine urine and its clinical applications, **Journal Japan Veterinary**, v.54, n.º. 4, p.288-292, 2001.

BAL, A. E; GRAVEKAMP, C; HARTSKEERL, 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**. 32:1894-1898, 1994.

BHARTI, A. R; NALLY J. E; RICALDI, J. N et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**. 3:757-771. 2003.

BROD, C. S, ALEIXO, J. A., JOUGLARD, S. D; FERNANDES, C. P. H; TEIXEIRA, J. L; DELLAGOSTIN, O. A. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a

serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 294-300, 2005.

FAINE, S; ADLER, B; BOLIN, C; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, MediSci, Melbourne, Austrália, 1999. 296p.

FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. 2nd ed. World Health Organization, Genève. 1982. 171p.

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

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G. J. J. M.; EVERARD, C. O. R.; HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1691-1700, 1993.

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

KRITSKI, A. L.; ROSSETTI, M. L.; BONFIM, G.; CASTELO, A.; MELLO, F. C. Q. Reação em Cadeia da Polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. **J Pneumologia**, v. 23, n. 1, p. 33-42, 1997.

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

LUCCHESI, P. M.; ARROYO, G. H.; ETCHEVERRIA, A. I.; PARMA, A. E.; SEIJO, A. c. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 131-134, 2004.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004.

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; SILVA, A. S.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 29-30, p. 19-27, 1970.

SACHSE, K.; FREY, J. PCR Detection of Microbial Pathogens. **Humana Press**. 2003. 334 p.

VELOSO, I. F.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E.; MOREIRA, E. C. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p.339-343, 2000.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Conclui-se, com este trabalho, que a técnica da PCR desenvolvida se mostrou eficaz e de baixo custo para o diagnóstico da *Leptospira* spp. em amostras de sangue e urina de cães, possibilitando rapidez no diagnóstico da leptospirose canina. Os cães, tanto errantes quanto domiciliados, do município de Ilhéus - Bahia podem servir de importante fonte de infecção da leptospirose para o homem e para outros animais. Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a proficiência da PCR para o diagnóstico precoce da leptospirose canina e, com isso, a adoção de medidas de tratamento e saúde pública poderão ser aplicadas com maior antecedência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN, A. A. et al. **Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implication for vaccine and public health.** Journal of Veterinary Medicine Series B, v. 53, p. 91-99. 2006.

ADIN, C. A; COWGILL, L. D. **Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998).** Journal of The American Veterinary Medical Association, v. 216, n. 3, p. 371. 2000.

ALMEIDA, L. P. et al. **Levantamento soroepidemiológico de Leptospirose em Trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região Sul do Brasil.** Revista de Saúde Pública, v. 28, p. 76-81, 1994.

ANDRÉ-FONTAINE, G. **Canine leptospirosis.** Do we have a problem? Veterinary microbiology, v. 117, n. 1, p. 19-24. 2006

ÁVILA, M. O. et al. **Aglutininas antileptospíricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, ano de 1995.** Ciência Rural, v. 28, p. 107-110, 1998.

ARAGÃO H. B. **Sobre a presença do *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro.** Brasil-Médico, v. 31, p. 329-330. 1917.

BAL, A. E. et al. **Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis.** Journal of Clinical Microbiology, v. 32, p. 1894-1898, 1994.

BATISTA, C. S. A. et al. **Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 41, p. 131-136, 2004.

BARIL, C. et al. **Scattering of the rRNA genes on the physical map of the circular chromosome of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*.** J. Bacteriol. v. 174:7566–7571. 1992.

BERAN, G. W; STEELE, J. H. **Handbook of zoonoses.** Boca Raton. CRC. 1994. 640p.

BHARTI, A. R. et al. **Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance.** Lancet Infectious Diseases, v. 3, p. 757-771, 2003.

BLAZIUS, D. R. et al. **Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira spp* na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil.** Cad Saúde Públ, v. 21, p. 1952-1956, 2005

BOLAND, M. et al. **A Cluster of Leptospirosis Cases in Canoeists following a Competition on the River Liffey.** Epidemiology and Infection, v. 132, p. 195-200, 2004.

BOLIN, C. A. **Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals.** Semin. vet. Med. Surg, v.11, p. 166-171, 1996.

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.

BOMFIM, M. R. Q.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; KOURY, M. C. **Detection of pathogenic *Leptospira* spp. in urine samples from naturally infected cattle using a nested PCR assay.** The Veterinary Journal, v. 174, p. 001-012, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Doenças infecciosas e parasitárias:** guia de bolso. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 217p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Doenças infecciosas e parasitárias:** aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle. Guia de bolso. 2. ed. Brasília, Ministério da Saúde; Fundação Nacional da Saúde, 2000. 215p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. COÓDERNAÇÃO DE CONTROLE DE ZONOSSES ANIMAIS. PROGRAMA NACIONAL DE LEPTOSPIROSE. **Manual de leptospirose.** 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98p.

BROD, C. S. et al. **Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38, p. 294-300, 2005.

CAMPAGNOLO, E. R. et al. **Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine.** Journal American Veterinary Medical Association, v. 216, p. 676-682, 2000.

CORRÊA, S. H. R. et al. **Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 41, p. 189-193, 2004.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica Científica, 1992. 843p.

COSTA, E. et al. **Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 34, n. 3, p. 261-267, 2001.

DELBEM, A. C. B. et al. **Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004.

DEY, S. et al. **Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis.** *Vet. Microbiol*, v. 103, p. 99-106, 2004.

DIKKEN, H; KMETY, E. **Serological typing methods of leptospire.** In: BERGAN, T; NORRIS, J. R. *Methods in Microbiology*, Academic Press, 1978.

FAINE, S; STALLMAN, N. D. **Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 32, p. 461-463, 1982.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**, MediSci, Melbourne: Austrália, 1999. 296 p.

FEIGIN, R. D; ANDERSON, D. C. **Human leptospirosis.** *CRC Critical Review in Clinical laboratory Sciences*, v. 5, p. 413-467, 1975.

FIGUEIREDO, C. M. et al. **Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, p. 331–338, 2001.

FREIRE, I. M. A. et al. **Distribuição dos serovares de leptospira em caninos clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro.** *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Rio de Janeiro, v.14, n.2, p.83-85, 2007.

FONSECA, C. et al. **Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis.** *Tropical Medicine and International Health*, v. 11, n. 9, p. 1699-1707, 2006.

FUKUNAGA, M; MIFUCHI, I. **Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes.** *The Journal of Bacteriology*. v. 171, p. 5763–5767. 1989.

GRAVEKAMP, C. et al. **Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers.** *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 1691–1700. 1993.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia, Saunders, 1990, 1738p.

GIRIO, R. J. S. et al. **Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.

GROBUSH, M. P. et al. **Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic.** *Journal of Travel Medicine*, Zurich, v. 10, n. 1, p. 55-58, 2003.

HEINEMANN, M. B. et al. **Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction.** *Australian Veterinay Journal*, v. 77, n.1, p. 32-34, 1999.

HERRMANN, G. P. et al. **Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, p. 443-448, 2004.

IBARRA, C; ESPINOZA, C; CORNEJO, R. **Enfermedad de Weil, presentación de un caso clínico.** *Clínica y Ciencia*, Santiago del Chile, v. 1, n. 6, p. 25-32, nov. 2003.

JOHNSON, R. C; HARRIS, V. G. **Differentiation pathogenic and saprophytic *Leptospira*.** *Journal of Bacteriology*, v. 94, p. 27-31, 1967.

JOUGLARD, S. D. D. **Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira* spp. por seqüenciamento do 16S rDNA e análise de VNTR.** Tese (Doutorado) – 71 f. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

JOUGLARD, S. D. D; BROD, C. S. **Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS.** *Arquivos Do Instituto Biológico*, v. 67, p. 181-185, 2000.

JOUGLARD, S. D. D. **Prevalência da leptospirose canina, fatores de risco e constituição da população no meio rural do município de Pelotas, RS.** 1999. Tese (Mestrado) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS - Brasil.

KEE, S. H. et al. **Detection of leptospiral DNA by PCR.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KO, A. I. et al. **Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil.** *The Lancet*, London, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KREPKOGORSKAIA, T. A; REMENTSOVA, M. M; **Isolation of *Leptospira* strains from the tick *Dermacentor marginatus* removed from big horned cattle.** *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, v. 28, n. 2, p. 93-94, 1957.

LANGONI, H. et al. **Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n. 3, p. 190-199, 2008.

LANGONI, H. et al. **Agglutininas antileptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, p. 305-307, 1999.

LEÃO, R. N. Q. et al. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico.** Belém: Cejup: UEPA: Instituto EvandroChagas, 1997, 886p.

LETOCART, M; BOERLIN, P; BOERLIN-PETZOLD et al. **Genetic structure of the genus *Leptospira* by multilocus enzyme electrophoresis.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 231-238, 1999.

LETOCART, M; BARANTON, G; PEROLAT, P. **Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR.** Journal of Clinical Microbiology, v. 35, n. 1, p. 248-253, 1997.

LEVETT, P.N. **Leptospirosis.** Clinical Microbiology Reviews. 14: 296–326, 2001.

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

LINS, Z. C; LOPES, M. L; MAROJA, O. M. **Epidemiologia das leptospiroses com particular referência a Amazônia brasileira.** In: Instituto Evandro chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e a medicina tropical. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública,1986.

LUCCHESI, P. M. A. **Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 37, n. 2, p:131-134, 2004.

MAGAJEVSKI, F. S.; GÍRIO, R. J. S.; MEIRELLES, R. B. **Pesquisa de *Leptospira* em fetos de vacas abatidas no Estado de São Paulo.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 67-72, 2007.

MATHIAS, L. A; GIRIO, R. J. S; DUARTE, J. M. B. **Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil.** Journal of Wildlife Diseases, v. 35, n. 1, p. 112-114, 1999.

McBRIDE, A. J. A. et al. **Leptospirosis.** Current opinion in infectious diseases, v.18, p. 376-386, 2005.

MERIEN, F. et al. **Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples.** Journal of Clinical Microbiology, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

MODOLO, J. R. et al. **Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, n. 5, p. 598-604, 2006.

MORGAN, J. et al. **Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois.** Clinical Infectious Diseases, v. 34, p. 1593-1599, 2002.

NASCIMENTO, A. L. T. O; KO, A. I; MARTINS, E. A; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. **Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis.** Journal of Bacteriology, v. 186, p. 2164–2172, 2004a.

NASSI, F. et al. **Diagnóstico de leptospirose utilizando Nested-PCR.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 34, n. 1, p. 90-92, 2003.

NAKAMURA, M. et al. **Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the Northern part of Okinawa Main Island.** Journal of Veterinary Medical Science, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 83-85, 2006.

NICHOLAS, F. W. **Introdução à genética veterinária.** Porto Alegre: Artmed, 1999. 326p.

NOGUCHI, H. **Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido).** The Journal of Experimental Medicine, v. 27, 575-592, 1918.

OLIVEIRA, S. J; PIRES NETO, J. A. S. **Aspectos etiológicos e diagnóstico nas leptospiroses.** Revista CFMV, v. 10, p. 36-46, 2004.

OOTEMAN, M. C.; VAGO, A. R.; KOURY, M. C. **Potencial application of lowstringency single specific-PCR in the identification of *Leptospira* in serum of patients with suspected of leptospirosis.** Canadian Journal of Microbiology, v. 50, p. 1073-1079, 2005.

PAPPACHAN, M; SHEELA, M; ARAVINDAN, K. **Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala.** Journal of Epidemiology and Community Healthy, California, v. 58, p. 1054-1055, 2004.

PESCADOR, C. A. et al. **Aborto equino por *Leptospira sp.*** Ciência Rural. v. 34, n. 1, p. 271-274, 2004.

PINNEY, C, C. **German Shorthaired Pointers: Everything About Purchase, Care, Nutrition, Breeding Behavior, and Training.** Barrons Educational Series Inc. 1998. 120p.

PLANK, R.; DEAN, D. **Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans.** Microbes and Infection, v.2, p.1265-1276, 2000.

RISTOW, P. et al. **The OmpA-Like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence.** PloS Pathogens, v. 3, p. 894- 903, 2007.

QUERINO, A. M. et al. **Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina – PR.** Ciências Agrárias, Londrina, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.

REGO, N. et al. **Genômica comparativa e evolutiva de *Leptospira*.** Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde. Rio de Janeiro, v.1, n.2, p. 322-329, 2007.

RIEDIGER, I. N. **Comparação dos diagnósticos sorológico e molecular da leptospirose humana na região metropolitana de Curitiba, Paraná.** 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

RIBEIRO, M. **Contribuição ao imunodiagnóstico da leptospirose humana: ênfase ao uso de anticorpos monoclonais**. 2003. 164 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROMERO, E. C; BERNARDO, C. C. M; YASUDA, P. H. **Human Leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 45, n. 5, p. 245-248, 2003.

SACHSE, K; FREY, J. **PCR Detection of Microbial Pathogens. Methods in Molecular Biology**, Humana Press, 2003. 334p.

SAKATA, E. E; YASUDA, P. H; ROMERO, E. C. **Sorovares de *Leptospira interrogans* isoladas de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 34, p. 217-221, 1992.

SANTA ROSA, C. A. et al. **Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 29/30, p. 19-27, 1970.

SANTIM, K. et al. **Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em cães clinicamente saudáveis e em cães com suspeita clínica de leptospirose**. Clínica Veterinária, n. 60, p. 48-52, 2006.

SAMBIAVA R. R. et al. **Leptospirosis in India and the rest of the world**. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 7, p. 178-193, 2003.

SCANZIANI, E. et al. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. Research in Veterinary Science, v. 50, p.229-232, 1991.

SCHMIDT, V; AROSI, A; SANTOS, A. R. **Levantamento sorológico da leptospirose em caprinos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brasil**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 32, p. 609-612, 2002.

SEJVAR, J. et al. **Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000**. Emerging Infectious Diseases, v. 9, p. 702-707, 2003.

SESAB. **Secretaria da Saúde do Estado da Bahia**. Disponível em: < <http://www.saude.ba.gov.br/>> Acesso em: Jul de 2008.

SILVA, E. F. et al. **Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul**. Revista Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 29, n. 2, p. 174-176, 2009.

STEELE, J. H.; MILDRED, M. P. H.; GALTON, M. **Leptospirosis as a world problem**. Veterinary Medicine, v.3, n.11, p.517-527, 1957.

TESSEROLI, G. L. et al. **Soroprevalência para leptospirose em cães de Curitiba, Paraná**. Revista Acadêmica, Curitiba, v.3, n.4, p. 35-38, 2005.

TIFFANY, E. J; MARTORANA, N. F. **Leptospirosis in New York City: Serological Survey**. American Journal of Hygiene, v. 36, p. 195-204, 1942.

TORTEN, M; STOENNER, H; KAPLAN, W. **Handbook Series in Zoonoses**. CRC Press Inc: Boca Raton, Flórida 33431, v. 1. n. 1, p. 339-363, 1979.

VELOSO, I. F. et al. **A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 3, p.339-343, 2000.

WANGROONGSARB, P. et al. **Applicability of polymerase chain reaction to diagnosis of leptospirosis**. Journal of Tropical Medicine and Parasitology, v. 28, p. 43-47, 2005.

WEBSTER, J. P; ELLIS, W. A; MACDONALD, D. W. **Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms**. Epidemiol Infect, v. 114, n. 1, p. 195-201, 1995.

WOHL, J. S. **Canine Leptospirosis**. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v. 18, n. 11, 1996.

WOODWARD, M. J. et al. **Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype *bovis***. The Veterinary Record, v.128, n.12, p.282-283, 1991.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003, 122p.

YASUDA, P. H; SANTA-ROSA, C. A; MYERS, D. M. **The isolation of leptospires from stray dogs in the city of São Paulo, Brazillian**. Journal of Zoonoses, v. 7, p. 131-134, 1980.

ZHANG, Y; LI, S; DAI, B. **Amplified 23S rRNA gene of 52 strains of *Leptospira* and detection of leptospiral DNA in 55 patients by PCR**. Journal of West China University of Medical Sciences, v.24, n.3, p.262-267, 1993.

ZUERNER, R. L; ALT, D; BOLIN, C. A. **IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensu lato* serovars**. Journal of Clinical Microbiology. v.33, n. 12, p.3284–3289. 1995.

ANEXO

Ficha nº. _____ Data: ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO

Nome: _____ RG: _____

Endereço: _____

Município: _____ Tel.: _____

Área: Urbana Rural

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

Nome: _____ Raça: _____

Idade: _____ Peso: _____ Kg Sexo: M F

Alimentação: _____

Ração à granel: Sim Não Ambiente: _____

FATORES DE RISCO

Lavouras Carcaças de animais Água, lama
Lixo Água de rio, córrego Outras* : _____
* Especificar

COLETA DE LIXO

Inexistente Adequado Deficiente Ignorado

SANEAMENTO BÁSICO

Tratamento da água deficiente Tratamento adequado
Local de captação com a presença de animais
Local de captação com presença de esgoto
Poço mal construído / mal protegido Caixa d'água, cisterna sem proteção

MORADIA

Tipo de rua: _____

Localização: _____

Presença de roedores: S N

APÊNDICES

Tabela 2. Protocolo para extração de DNA do sangue

Etapas do protocolo de extração de DNA do sangue

1. Descongelamento do sangue
 2. Transferir 500 mL de sangue para um *eppendorf* junto a 500 µL de água miliQ
 3. Homogeneizar as amostras
 4. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos
 5. Descartar o sobrenadante
 6. Adicionar 500 µL o Tampão de Extração
 7. Vortexar e aquecer em banho-maria a 50°C por 30 minutos
 8. Retirar do banho-maria e adicionar 300 µL Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5 %
 9. Vortexar e aquecer em banho-maria a 50°C por 30 minutos novamente
 10. Adicionar Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico e homogeneizar manualmente
 11. Centrifugar a 14000 rpm por 6 minutos
 12. Transferir o sobrenadante para outro *eppendorf* com o auxílio de uma pipeta
 13. Repetir a lavagem com 130 µL de clorofórmio
 14. Centrifugar a 14000 rpm por 8 minutos
 15. Transferir o sobrenadante para outro *eppendorf* com o auxílio de uma pipeta
 16. Precipitar o DNA com 100 µL de Acetato de Amônio 5M e 900µL de etanol a 100%
 17. Agitar as amostras manualmente e aguardar 2 minutos
 18. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos
 19. Descartar o sobrenadante com a pipeta
 20. Lavar o precipitado com 1 mL de etanol 95%
 21. Centrifugar a 14000 por 15 minutos e descartar-se o sobrenadante
 22. Secar o *pellet* em temperatura ambiente e este foi eluir em 500 µL de TE
 23. Armazenar em freezer a -20°C até o momento da PC R
-

Tabela 3. Protocolo para extração de DNA da urina

Etapas do protocolo de extração de DNA

1. Descongelar a urina
2. Homogeneizar e transferir 2mL para 5 tubos tipo *ependorf*
3. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos
4. Descartar o sobrenadante e o ressuspender o *pellet* em 100 µL de água miliQ
5. Centrifugar as amostras novamente e descartar o sobrenadante
6. Adicionar 500 µL o Tampão de Extração
7. Vortexar e aquecer em banho-maria a 50°C por 60 minutos
8. Adicionar Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico e homogeneizar manualmente
9. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos
10. Transferir o sobrenadante para outro *ependorf* com o auxílio de uma pipeta
11. Precipitar o DNA com 100 µL de Acetato de Amônio 5 M e 900 µL de etanol a 100%
12. Agitar manualmente
13. Incubar -20°C por 30 minutos
14. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min e descartar o sobrenadante com a pipeta
15. Lavar o precipitado com 500 µL de etanol 70%
16. Centrifugar novamente a 14000 por 15 minutos
17. Descartar o sobrenadante e secar o *pellet* em temperatura ambiente
18. Eluir em 600 µL de Tampão TAE
29. Armazenar em freezer a -20°C até o momento da PCR

Tabela 4. Solução de amplificação

Reagente	1ª Reação	2ª Reação
Água	1,5 µL	3,5 µL
Tampão da Taq	4,0 µL	4,0 µL
MgCl ₂	3,0 µL	3,0 µL
dNTPs	1,0 µL	1,0 µL
Primer G1	3,0 µL	4,0 µL
Primer G2	3,0 µL	4,0 µL
Taq DNA polimerase	0,5 µL	0,5 µL
DNA alvo	19,0 µL	5,0 µL

Tabela 5. Condições do termociclador

Ciclo	Temperatura	Tempo
1 ciclo		
Desnaturação	95°C	5 min
Anelamento	68°C	1 min
Extensão	72°C	1 min
33 ciclos		
Desnaturação	95°C	1 min
Anelamento	68°C	1 min
Extensão	72°C	1 min
Ciclo final		
Desnaturação	95°C	1 min
Anelamento	68°C	1 min
Extensão final	72°C	5 min

Tabela 6. *Primers* utilizados para amplificação do gene *secY* de *Leptospira* spp

Primer	Sequência
Direto	G1 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3'
Reverso	G2 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3'.

Tabela 7. Tampão de Extração

Reagente	Quantidade
Tris – HCL 10 mM	250 µL
EDTA 0,5M	250 µL
Proteinase K 100 µg/µL	5 µL
Triton X – 100	10 µL