

# DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LEPTOSPIROSE EM SUÍNOS ABATIDOS CLANDESTINAMENTE NO MUNICÍPIO DE ITABUNA, BA\*

## MOLECULAR DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS IN PIGS SLAUGHTERED ILLEGALLY IN THE MUNICIPALITY OF ITABUNA, BA.

Taline Novais Santos<sup>1</sup>, Fábio Santos Carvalho<sup>2</sup>, Rodrigo Alves Bezerra<sup>2</sup>, Amauri Arias Wenceslau<sup>3</sup>, George Rego Albuquerque<sup>3</sup> e Roberta Costa-Dias<sup>3</sup>

**ABSTRACT.** Santos T.N., Carvalho F.S., Bezerra R.A., Wenceslau A.A., Albuquerque G.R. & Costa-Dias R. [**Molecular diagnosis of Leptospirosis in pigs slaughtered illegally in the Municipality of Itabuna, BA**]. Diagnóstico molecular de leptospirose em suínos abatidos clandestinamente no município de Itabuna-BA. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 33(4):195-199, 2011. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, BA 415 km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. E-mail: roberta\_costa\_dias@hotmail.com

Leptospirosis is a disease that affects wild animals, domestic and synanthropic throughout the country and causing social and economic problems. The genus *Leptospira* is divided into two major groups as comprising saprophytic species *Leptospira biflexa* and pathogenic as *L. interrogans*. The basic taxonomic unit is the *serotype*. Swine leptospirosis is an important source of infection for humans and other animals and contacts swine leptospirosis diagnosis can be performed by disease epidemiology, clinical signs of the animals and confirmed by laboratory tests. The technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) is specific, sensitive and rapid diagnosis of leptospirosis, an important diagnostic tool as well as for epidemiological investigations. The objective of this work is to analyze by PCR the presence of DNA of *L. interrogans* in the blood of pigs. We collected blood from 72 pigs at slaughter illegal in the Municipality of Itabuna, BA. Blood samples were between 3 and 5 mL and were stored in tubes with anticoagulant, identified and kept under refrigeration until the time of DNA extraction. After the PCR could detect the presence of DNA fragments with those found in pathogenic strains of leptospirosis, including the *L. interrogans*. Of the samples examined, 14 were positive, with a percentage of 19, 44% were positive.

KEY WORDS. *Leptospira interrogans*, PCR, swine, zoonoses, Southern Bahia.

**RESUMO.** A Leptospirose é uma doença que acomete animais silvestres, sinantrópicos e domésticos de todo o território nacional e que causa problemas sociais e econômicos. O gênero *Leptospira* é dividido em dois grandes grupos compreendendo espécies saprófitas, como a *Leptospira biflexa* e, patogê-

nicas como a *L. interrogans*. A unidade taxonômica básica é o “sorotipo”. A Leptospirose suína é uma importante fonte de infecção para humanos e outros animais contactantes e o diagnóstico pode ser realizado através do perfil epidemiológico da doença, sinais clínicos dos animais e confirmados por dife-

\*Recebido em 2 de julho de 2010.

Aceito para publicação em 26 de dezembro de 2010.

<sup>1</sup>Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Ilhéus, BA 45662-900, Brasil. - bolsista IC/UESC.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UESC, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Ilhéus, BA 45662-900. – bolsista CAPES.

<sup>3</sup>Médico-veterinário, DSc. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Ilhéus, BA 45662-900. E-mail: wenceslau@uesc.br, gralbu@uesc.br, roberta\_costa\_dias@hotmail.com

rentes métodos laboratoriais. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é específica, sensível e rápida para o diagnóstico da Leptospirose, sendo uma importante ferramenta de diagnóstico, bem como para investigações epidemiológicas. Objetivou-se, com este trabalho, analisar através da PCR, a presença de DNA da *Leptospira interrogans* no sangue de suínos. Foram coletados sangue de 72 suínos no momento do abate clandestino no Município de Itabuna-BA. As amostras de sangue tinham entre 3 e 5 mL e foram acondicionadas em tubos com anticoagulante, identificadas e mantidas sob refrigeração até o momento da extração do DNA. Após a realização da PCR foi possível detectar a presença de fragmentos de DNA compatíveis com os encontrados em cepas patogênicas de leptospirose, inclusive da *L. interrogans*. Das 72 amostras examinadas, 14 foram positivas, com um percentual de 19,44% de positivos.

**PALAVRAS-CHAVE.** *Leptospira interrogans*, PCR, Suínos, Zoonose.

## INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma doença zoonótica que acomete animais silvestres, sinantrópicos e domésticos de todo o território nacional e que causa problemas sociais e econômicos. As condições físico-químicas e sócio-econômico-culturais, presentes no Brasil, são favoráveis à disseminação desta enfermidade (Homma & Possas 2000).

Anteriormente o gênero *Leptospira* spp. era dividido em dois grandes grupos compreendendo espécies saprófitas como *Leptospira biflexa* e patogênicas como *L. interrogans* (Faine & Stallman 1982). Em 2001, Levette reclassificou, por genotipagem, as leptospirose em genomespécies, não correspondendo às duas espécies anteriores, já que os sorovares patogênicos e não patogênicos podem ocorrer dentro de uma mesma espécie. As genomespécies aceitas são: *Leptospira interrogans* sensu strictu, *L. nogushi*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. biflexa*, *L. fainei*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. weilli*, *L. inadai*, *L. parva* e *L. alexanderi*.

Os sorovares de leptospirose mais comumente encontradas no suíno são: *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. gryppotyphosa*, *L. bratislava* (Soto et al. 2007). Nesta espécie animal, a Leptospirose provoca transtornos reprodutivos como abortos, mumificação, natimortos e nascimento de leitões fracos, (Ellis 1989, Ramos et al. 2006).

Os suínos são reservatórios de leptospirose por terem um longo período de leptospiremia e conseguem eliminá-las pela urina por período superior a um ano (Freitas et al. 2004). Estes se infectam através do contato com água ou alimentos contaminados, com urina, fetos abortados e descargas uterinas de animais portadores. Os ratos tem sido frequentemente fonte de infecção para os suínos (Soto et al. 2007). A infecção pode ser por via oral, digestiva, pele lesada, via conjuntiva ou através da mucosa (Santa Rosa et al. 1980).

A Leptospirose é considerada uma doença de risco ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais. No Brasil um dos primeiros relatos de uma possível transmissão da Leptospirose suína ao homem foi feito por Guida et al. (1959), em um surto de leptospirose suína.

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

PCR é um teste molecular que é cada vez mais utilizado no diagnóstico de infecções microbianas, atendendo aos requisitos de sensibilidade, especificidade e rapidez. A vantagem do tempo reduzido de execução faz desta técnica uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce da Leptospirose (Homma & Possas 2000).

Santa Rosa et al. (1969) em seu estudo sobre a prevalência da Leptospirose em suínos no Brasil, encontraram cinco estirpes de leptospirose, sendo um sorovar *icterohaemorrhagiae* e quatro pertencentes ao sorovar *hyos*. Freitas et al. (2004) em Londrina, no Paraná, isolaram *Leptospira* sorovar *canicola* em amostras de fígado, obtidas em abatedouros, de fêmeas suínas naturalmente infectadas.

No Estado da Bahia, Doria & Martins (1975), realizando provas de hemoaglutinação em 272 amostras de suínos encontraram uma prevalência de 51,5% de positivos para o sorotipo *pomona*. Cordeiro et al. (1975) evidenciaram 5,29% de reagentes positivos, com predominância do sorotipo *pomona*.

Miraglia et al. (2008), realizando testes de PCR em rins de suínos no Estado de São Paulo, revelaram 8% de positivos, demonstrando que a PCR é mais uma ferramenta para o diagnóstico rápido e prático da Leptospirose.

Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2005 registraram-se 3.605 casos da doença em humanos no Brasil, com 417 mortes. Em 2006, foram 2.777

casos, com 236 mortes. Na Bahia, em 1999, foram notificados 344 casos de Leptospirose humana, sendo 296 (86,0%) concentrados na região metropolitana de Salvador, dos quais 273 (79,4%) foram confirmados e 30 resultaram em óbitos, representando um coeficiente de Incidência de 2,1/100.000 hab. e letalidade de 11%, aumentando no período de chuva (Homma & Possas 2000).

Objetivou-se com este trabalho analisar, pela PCR, a prevalência de *L. interrogans* e a presença da cepa da *L. icterohaemorrhagiae* nos suínos abatidos clandestinamente no município de Itabuna, BA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e Amostragem

Foram coletadas amostras de 3-5 mL de sangue de 72 suínos, no momento do abate clandestino no Município de Itabuna, BA, que foram acondicionadas em tubos com o anticoagulante EDTA, identificadas, mantidas sob refrigeração e levadas ao laboratório de Genético Animal do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz. O município de Itabuna está situado na latitude 14° 47' Sul e 39° 16' 48'' de latitude Oeste, na mesorregião sul Baiana e na microrregião Ilhéus-Itabuna. Possui uma área total de 443,198 Km<sup>2</sup>, sendo o 5° município baiano em população residente (210.604 habitantes, segundo contagem populacional de 2007 do IBGE). O clima é quente e úmido com temperatura média anual de 29° C e período principal das chuvas entre os meses de setembro e março.

### Extração do DNA

Utilizou-se 300 µL de sangue que foi colocado em *ependorf*, juntamente com 500 µL de água *milliQ*. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas 8.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se tampão de extração (Tris – HCL 10mM + EDTA 0,5 M, Proteinase K 100 µg/µL e 1% de 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 SDS 0,5 %, homogeneizou-se e levou-se ao banho-Maria, a 50 °C por 30 minutos novamente. O DNA foi extraído com Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico. Centrifugou-se 10.000 rpm por 10 minutos. A lavagem foi repetida com clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 17.000 rpm por 10 minutos. Precipitou-se o DNA com Acetato de Amônio 5 M e etanol a 100%. As amostras foram centrifugadas a

10.000 g por 10 minutos, e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 95%. Centrifugou-se novamente a 17.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi eluído em 50 µL de TE. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C até a realização da PCR.

### PCR

Na PCR foram utilizadas 0,2 µM dos *primers*: G1 [direto] 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3' e G2 [reverso] 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3' (Gravekamp et al., 1993); 1,6 x Tampão da Taq; 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de dNTP; 2 U de Taq Polimerase. As condições termocíclicas foram: desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento a 55 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, num total de 35 ciclos. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído de cão positivo para leptospirose. Todos os produtos da amplificação foram analisados por separação em gel de agarose a 2% seguido de coloração com brometo de etídio e visualização em luz ultravioleta.

Os *primers* utilizados foram G1 e G2 que são derivados da Biblioteca genômica da *L. icterohaemorrhagiae* (cepa RGA), que amplifica fragmentos de DNA-alvo e estirpes pertencentes a todas as espécies descritas atualmente e pertencentes à *Leptospira* spp. patogênica, pela classificação genômica que se baseia na homologia de DNA e não segue as distinções e agrupamentos com base nas semelhanças antigênicas (Gravekamp et al. 1993). Os fragmentos amplificados podem apresentar-se entre 100 e 1400 pares de bases conforme o número de estirpes da *Leptospira* spp. presentes na amostra (Oliveira et al. 2003). O controle positivo utilizado foi isolado a partir de um canino que apresentava sintomatologia da doença e que foi positivo para diferentes estirpes da *Leptospira* spp. na PCR, processo este semelhante ao utilizado por Shimabukuro et al. (2003) que utilizaram DNA de *Leptospira* isolado em hamster como controle positivo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas 14 amostras positivas, das 72 analisadas, dando um total de 19,44% de positivos para *L. interrogans*. O fragmento amplificado da apresentou aproximadamente 285 pares de bases (Figura 1).

A técnica de PCR vem sendo empregada com o objetivo de detectar as cepas patogênicas de *Leptospira* spp., favorecendo a realização de diagnóstico precoce da doença em animais e em humanos. O

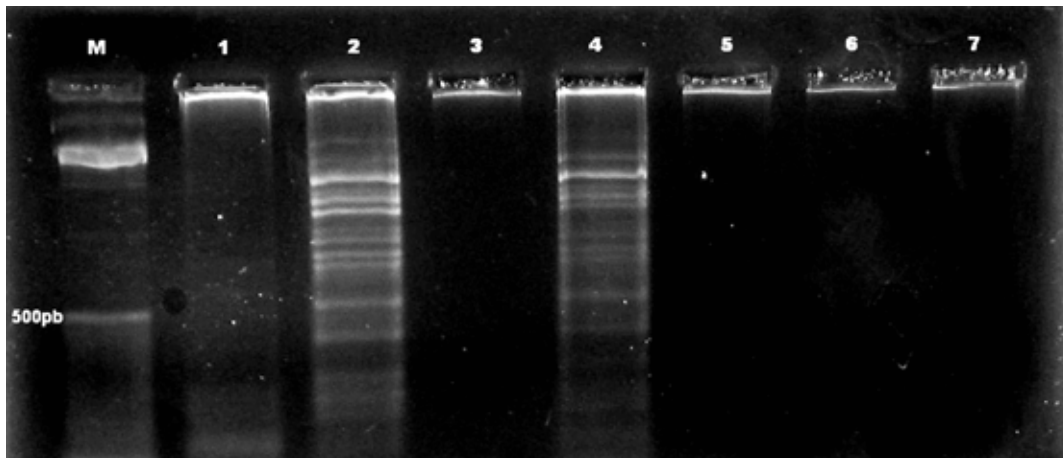


Figura 1. Gel de agarose 2% apresentado os amplificados de *Leptospira* spp. M- marcador molecular; 1- controle negativo; 2- controle positivo; 4- animal positivo; 3, 5, 6 e 7 - animais negativos.

diagnóstico molecular tem se destacado em relação às técnicas sorológicas devido a sua sensibilidade e capacidade de detecção rápida dos patógenos. No entanto, fatores como seleção dos *primers*, o método de extração do DNA utilizado e tipo de amostra clínica analisada podem interferir no resultado (Gravekamp et al. 1993).

Nos trabalhos de Larsson et al. (1984) estudando 500 suínos abatidos, provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, verificaram um percentual de 8,40% de animais soropositivos; Faria et al. (1989), observaram uma frequência de 7,70% de animais soropositivos entre as 610 matrizes, provenientes de 63 granjas tecnificadas das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova, no Estado de Minas Gerais. Já Shimabukuro et al. (2003), utilizando técnica molecular e sorológica, em amostra de sangue e tecido renal, encontraram uma prevalência de 54,5% de animais soropositivos e 2,08% de positividade na PCR. As divergências entre os resultados encontrados são decorrentes da técnica de diagnóstico empregada, assim como do tipo, a origem e controle higiênico-sanitário dos animais utilizados na pesquisa.

Neste trabalho as amostras analisadas foram oriundas de suínos abatidos clandestinamente e provenientes de criatórios sem nenhuma medida higiênico-sanitária e sob condições precárias. Os animais alimentavam-se de todo tipo de material orgânico disponível e estavam em constante contato com animais sinantrópicos e cães, que também podem ser acometidos pela Leptospirose e funcionar como reservatórios. Estes aspectos também representam um importante fator de risco para contaminação de pessoas que estão em constante contato com esses animais.

A Leptospirose é considerada doença de risco ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais, como criadores, tratadores, magarefes e outros que estejam em contato com esses animais (Bastos 2006, Mérien & Artharid 2005). Essas atividades geralmente são executadas na ausência de recursos tecnológicos e de equipamentos de segurança, por mão-de-obra desqualificada e mal remunerada, o que aumenta ainda mais o risco da infecção ser contraída (Almeida et al. 1994).

Na cidade de São Paulo, Guida (1959), identificaram em uma granja suinícola dois tratadores soropositivos para o sorovar *canicola*, porém sem sintomas aparentes. Girio et al. (1987), também em granjas do Estado de São Paulo identificaram sete tratadores reagentes para os sorovares *pomona* e *icterohaemorrhagiae* que apresentavam febre, mialgia, cefaléia, anorexia e icterícia. Na Colômbia, Uribe et al. (2003), encontraram 3,9% e 9,8% dos funcionários e granjas e abatedouros respectivamente, reagentes para os sorovares patogênicos da *Leptospira*.

É importante salientar que a PCR pode ser utilizada como um suporte na saúde pública, viabilizando diagnóstico rápido e preciso da Leptospirose, auxiliando no controle profilático e tratamento de animais e pacientes humanos.

## CONCLUSÃO

Foi possível diagnosticar pela PCR a presença da cepa patogênica da *L. interrogans*, sendo uma boa ferramenta para diagnosticar esse microrganismo de forma rápida e eficaz.

**Agradecimentos.** A Universidade Estadual de Santa Cruz pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida L.P., Martins L.F.S. & Brod C.S. Levantamento soropidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. *Rev. Saude Pub.*, 28:76-81, 1994.
- Bastos M. Leptospirose. Disponível em: <<http://www.cca.ufes.br/caklbacteri.htm>>. Acesso em: 14 Mar. 2006.
- Cordeiro F., Barbosa M., Ramos A. & Godoy A.M. Aglutinina anti-*Leptospira* em soro de suíno criados em regime semi-selvagem no interior do estado da Bahia. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 27:59-62, 1975.
- Dória J.D. & Martins M.A.S. Leptospirose III. Aglutininas anti-*Leptospira* em soro suíno (*Sus domesticus*) no Estado da Bahia. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, 14:25-28, 1975.
- Ellis W.A. *Leptospira australis* infection in pig. *Pig Vet. J.*, 22:83-92, 1989.
- Faine S. & Stallman N.D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson, 1907) Wenion 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger, 1914) Noguchi 1918. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32:462-463, 1982.
- Faria J.E., Santos J.L., Múcio F.B., Dale R. & Salcedo J.H.P. Frequência de aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de suínos das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 41:381-388, 1989.
- Freitas J.E., Silva F.G., Oliveira R.C., Delbem A.C.B., Muller E.E., Alves L.A. & Teles P.S. Isolation of *Leptospira* spp. from dogs, bovine and swine naturally infected. *Cienc. Rur.*, 34:853-856, 2004.
- Girio R.J.S., Mathias L.A., Castania V.A. & Carvalho A.C.F.B. Ocorrência de surtos de leptospirose suína e humana em três propriedades do Município de Viradouro - SP. *Cienc. Vet.*, 1:52-53, 1987.
- Gravekamp C., Van de Kemp H., Franzen M., Carrington D., Schoone G.J., Van Eys G.J., Everard C.O., Hartskeerl R.A. & Terpstra W.J. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *Gen. Microbiol.*, 139:1691-1700, 1993.
- Guida V.O. Leptospirose suína provocada pela *L. canicola* em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 26:49-54, 1959.
- Homma A. & Possas C.A. *Estado da Arte e Prioridades para Pesquisa em Leptospirose: oficina de trabalho*. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2000. 258p.
- Larsson C.E., Yasuda P.H., Santa Rosa C.A. & Costa E.O. Leptospirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios dos estados de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. S. Paulo*, 21: 43-50, 1984.
- Levett P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Vet.*, 14:296-326, 2001.
- Mérien F. & Artharid A.B. Leptospirosis a zoonotic under-monitoring in New Caledinia and in the Pacific. *Prev. Vet. Med.*, 200:45-50, 2005.
- Miraglia F., Moreno A.M., Gomes C.R., Paixão R., Liuson E., Morais Z. M., Maiorka P., Seixas F.K., Dellagostin O.A. & Vasconcellos S.A. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 39:501-507, 2008.
- Oliveira M.A.A., Caballero O.L., Vago A.R., Harskeerl R.A., Romanha A.J., Pena S.D.J., Simpson A.J.G. & Koury M.C. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *J. Med. Microbiol.*, 52:127-135, 2003.
- Ramos A.C.F., Souza G.N. & Lilenbaum W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenol.*, 66:1021-1025, 2006.
- Santa Rosa C.A., Castro A.F.P., Silva A.S. & Teruka J.M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29:19-27, 1969.
- Santa Rosa C.A., Sulzer C.R., Yanaguita R.M. & Silva A.S. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of sorovars *canicola*, *pyrogenes*, and *grippotyphosa*. *Int. J. Zoon.*, 7:40-43, 1980.
- Shimabukuro F.H., Domingues P.F., Langoni H., Silva A.V., Pinheiro J.P. & Padovani C.R. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. *Braz. J. Vet. Res. An. Scienc.*, 40:243-253, 2003.
- Soto F.R.M., Vasconcellos S.A., Pinheiro S.R., Bernasi F. & Camargo R.S. Leptospirose suína: uma revisão. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 74:379-395, 2007.
- Uribe A.O., León G.G., Arango B.R. & Prada V. Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colômbia. *Arch. Med. Vet.*, 35:205-213, 2003.
- WHO. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Geneva, World Health Organization Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003. 122p.