

## **AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR FRENTE A QUATRO TÉCNICAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Leptospira interrogans* SOROVAR POMONA EM SÊMEN BOVINO EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADO**

**EVALUATION OF THE SENSIBILITY OF PCR USING FOUR METHODS OF DNA EXTRACTION FROM BULL SEMEN EXPERIMENTALLY CONTAMINATED WITH *Leptospira interrogans* SEROVAR POMONA**

**F. S. MAGAJEVSKI<sup>1</sup>, R. J. S. GÍRIO<sup>2</sup>**

### **RESUMO**

Este estudo procurou avaliar a sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) frente a quatro técnicas de extração de DNA em sêmen bovino experimentalmente contaminado com de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, já que há uma grande preocupação quanto à qualidade sanitária desse material em centrais de inseminação artificial em todo o mundo. Os “primers” utilizados foram o Lep 1 e o Lep 2, e as técnicas de extração empregadas foram por lise enzimática com proteinase K, terra diatomácea, lise por fervura-fenol e DNAzol, sendo a primeira técnica recomendada por apresentar o melhor resultado custo/benefício, com o sêmen diluído a 1:3 com TE. Esses resultados alertam para o fato de que a escolha correta do método de extração de DNA é fundamental para o sucesso da pesquisa de agentes pela técnica de PCR.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leptospirose. Bovinos. Sêmen. PCR

### **SUMMARY**

Because of the great concern about the sanitary quality of semen in artificial insemination centers all around the world, this study was aimed at evaluating the sensibility of polymerase chain reaction (PCR) using four methods for extraction of DNA in bovine semen experimentally contaminated with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. The primers were Lep 1 and Lep 2, and the techniques of extraction were enzymatic lysis with proteinase K, diatomaceous earth, boiling phenol lysis, and DNAzol. The first method was more effective and showed the best results when semen was diluted 1:3 in TE. These results evidence that choosing the correct DNA extraction procedure is essential to success in the search for etiological agents by PCR.

**KEY-WORDS:** Leptospirosis. Bovine. Semen. PCR.

---

<sup>1</sup> Doutora em Medicina Veterinária Preventiva, FCAV, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Jaboticabal, Via de acesso Pro. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP cep:14884-900. E-mail: f\_magajevski@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Professor titular, Doutor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp, 14884-900, Jaboticabal, SP.

## INTRODUÇÃO

A presença de *Leptospira* spp. em sêmen de touros, infectados natural e experimentalmente, já foi demonstrada, indicando a possibilidade de transmissão da leptospirose bovina pela monta natural ou pela inseminação artificial (SLEIGHT & WILLIAMS, 1961; RODINA & BALASHOV, 1971). Touros, com e sem sinais clínicos da doença, podem apresentar leptospirosas no sêmen. Assim, esse material, quando não recebe controle rigoroso, pode ser um importante veículo de transmissão da leptospirose bovina (BROD et al., 1995).

A prova de soroglutinação microscópica (SAM) é o teste mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose, sendo escolhido como padrão pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2007). Thiermann (1994) ressalta que, apesar da padronização desse teste, há dificuldade de obter resultados concordantes entre os diferentes laboratórios. É uma técnica laboriosa e exige o uso de leptospirosas vivas como antígenos (CHAPPEL et al., 1998). Resultados negativos na SAM não garantem que o animal esteja livre da infecção renal, visto ser possível o isolamento de bactérias a partir da urina de animais não reagentes (BLENDEN, 1975).

Nos últimos anos a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma importante ferramenta na detecção de agentes patogênicos. O método é rápido e extremamente sensível, podendo teoricamente detectar uma única molécula de DNA em poucas horas. Outra grande vantagem da técnica de PCR decorre do fato de não ser necessária a viabilidade dos patógenos para a realização do teste, o que permite a inativação e o armazenamento das amostras, bem como a aplicação da técnica em amostras mal conservadas (GILLESPIE, 1990; GINGERAS et al., 1990; PAUL, 1990). Kee et al. (1994) conseguiram detectar *L. interrogans* no sangue de *Merionis unguiculatus* dois dias após a infecção experimental, enquanto anticorpos só foram detectados pela SAM sete dias pós-infecção. A PCR, para diferenciação de sorogrupos de *Leptospira*, pode proporcionar uma alternativa mais rápida ao teste sorológico em laboratórios de referência (BAROCCHI et al., 2001).

O par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), Lep 1 e Lep 2, foi sintetizado à partir da sequência do gene 16S rRNA de *L. interrogans* sorovar Canicola determinada por Fukunaga et al. (1990). A técnica de PCR, quando utilizada com esse par de oligonucleotídeos iniciadores, revelou ser específica para *Leptospira* spp. não amplificando o DNA de outras bactérias como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola* e *Treponema pallidum* (MERIEN et al., 1992). Esses primers foram capazes de amplificar um fragmento de 330 pares de base (bp) a partir do DNA de 30 sorovares de *Leptospira* spp., independentemente de serem de espécies apatogênicas ou patogênicas, devido provavelmente ao fato dos genes de rRNA serem altamente conservados entre as bactérias (HEINEMANN et al., 1999).

A técnica de PCR vem sendo utilizada com sucesso em vários estudos relacionados com leptospirose, já

tendo detectado o agente em diversos materiais, como sêmen (MASRI et al., 1997; HEINEMANN et al., 1999; HEINEMANN et al., 2000; SCARCELLI et al., 2001), urina (VAN EYS et al., 1989; MASRI et al., 1997; CETINKAYA et al., 2000; MAGAJEVSKI et al., 2005), humor aquoso (FABER et al., 2000) e ovócitos (MAGAJEVSKI 2007).

Vários autores têm descrito bons limiares de detecção de leptospirosas pela técnica de PCR. Heinemann et al. (2000) observaram um limiar de detecção de 100 bactérias por mL para o sêmen bovino. Em urina, Cetinkaya et al. (2000) detectaram até cinco leptospirosas por mL do material. Veloso et al. (2000) atentam para o fato de que o procedimento de extração do DNA do material que se deseja avaliar e os primers utilizados podem propiciar diferentes resultados.

Masri et al. (1997) avaliaram três diferentes métodos de extração de DNA de leptospirosas em sêmen bovino: método de extração apenas com fenol-clorofórmio, proteinase K (PK) em 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) seguido de fenol-clorofórmio, e fenol-clorofórmio seguido de 1% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Tanto em sêmen experimentalmente contaminado quanto em sêmen oriundo de touros infectados, apenas as amostras submetidas ao método de extração com CTAB apresentaram resultados compatíveis com outras técnicas de diagnóstico. Esse mesmo método de extração foi utilizado com sucesso para detectar leptospirosas em urina de animais infectados.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar quatro diferentes técnicas de extração de DNA para a PCR, para detecção de *Leptospira* no sêmen bovino, utilizando os primers Lep 1 e Lep 2.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra, de sêmen bovino, empregada para contaminação experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona foi colhida de um touro da raça Nelore, em serviço junto a uma central de inseminação artificial pelo método da vagina artificial. O animal não apresentava título de anticorpos séricos contra *Leptospira* spp. por meio da prova de SAM e o seu sêmen não apresentou resultado positivo no cultivo de *Leptospira* spp. (BRASIL, 1995).

A fim de determinar a menor concentração de DNA bacteriano que a técnica de PCR pode detectar, o sêmen bovino foi experimentalmente contaminado com diferentes concentrações de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, de modo a se obter  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  bactérias por mL de sêmen. Para a obtenção dessas concentrações de leptospirosas no material foi utilizada uma cultura pura diluída a  $10^{-2}$ , pois nessa diluição foi observada a melhor distribuição das leptospirosas para sua contagem na câmara de Petroff-Hausser. Para a obtenção da concentração de  $10^4$  leptospirosas por mL de sêmen, foi adicionado 1,29  $\mu$ L da cultura diluída a  $10^{-2}$  a 1 mL de sêmen puro, e a partir daí obtiveram-se as demais diluições.

Foram testadas quatro técnicas de extração de DNA do sêmen: lise enzimática por proteinase K, extração por terra diatomácea ou método rápido alternativo, lise

por fervura-fenol e com DNAzol. Para as extrações utilizou-se sêmen puro, sêmen diluído 1:3 com TE<sup>3</sup> e diluído 1:5 com TE.

A extração de DNA realizada pela lise enzimática com proteinase K foi seguida de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico a partir de 300 µL de cada amostra, os passos seguintes da extração do DNA foram realizados basicamente como descrito por Sambrook et al., 1989. Para a extração de DNA com terra diatomácea adicionaram-se 200 µL de sêmen a 40 µL da suspensão carreadora e 1,0 mL do tampão de lise D (BOOM et al., 1990). A extração por fervura com fenol foi adaptada de Richtzenhain et al. (2002). A extração de DNA com o reagente comercial DNAzol (invitrogen®) foi adaptada de Chomczynski (1993).

O primer utilizado foi aquele proposto por Merien et al. (1992), correspondendo aos nucleotídeos 38 a 57 (5'GGCGGCGCTCTTAAACATG3') e 348 a 369 (5'TTCCCCCATTGAGCAAGATT3') da estrutura primária do gene 16 S do rRNA da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola.

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 500 µL, com volume final de 50 µL. A mistura de reação consistiu em 18,7 µL de água ultrapura, 5,0 µL de tampão de reação 10 x (500mM KCl; 15mM MgCl<sub>2</sub>; 100mM tris-HCl, pH 9,0), 8,0 µL da mistura de dNTPs (200mM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 4,0 µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol/µL), 0,3 µL de *Taq* DNA-polimerase (5 unidades por µL) e 10 µL da amostra de DNA extraído, levando-se a mistura para a termocicladora. O ciclo de amplificação empregado foi aquele preconizado por Merien et al., 1992, acrescentando-se um passo inicial, no qual as amostras foram submetidas à temperatura de 94 °C por 5 minutos.

A visualização do produto amplificado (330 pares de base) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0 % (m/v) corado com brometo de etídio, utilizando-se tampão de corrida TBE 0,5 X (0,04M tris-borato e 0,001M EDTA, pH 8,0), segundo Sambrook et al. (1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de extração utilizadas neste trabalho apresentaram resultados diferentes entre si, concordando com os trabalhos de Masri et al. (1997) e Veloso et al. (2000). A extração de DNA com proteinase K e DNAzol apresentaram os melhores resultados quando o sêmen estava diluído a 1:3 com TE. No entanto, o limiar de detecção encontrado por meio dessas técnicas foi de 10<sup>3</sup>, discordando de Merien et al. (1992), que obtiveram limiar de detecção de 10<sup>1</sup> bactérias por mL de sêmen, e de Heinemann et al. (1999), que detectaram 10<sup>2</sup> leptospiros por mL. Na diluição 1:5 o menor número que pôde ser detectado foi 10<sup>4</sup> leptospiros por mL de sêmen; já na diluição 1:3 foi possível detectar até 10<sup>3</sup> leptospiros por mL de

sêmen. Embora os resultados apresentados pelas duas técnicas de extração tenham sido semelhantes, no momento da pesquisa a relação custo/benefício foi favorável a utilização da proteinase K. A técnica de fervura:fenol na diluição do sêmen a 1:3 foi de 10<sup>4</sup>, estando abaixo do limiar encontrado pelas técnicas de extração com proteinase K e DNAzol.

Embora Masri et al. (1997) tenham considerado a extração de DNA por fenol-clorofórmio seguido de 1% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) melhor que por proteinase K, neste estudo optou-se por trabalhar com os materiais mais comumente utilizados nos laboratórios da região\* onde a pesquisa foi realizada, deixando-se de lado a técnica com CTAB.

O limiar de detecção de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona por PCR, a partir do DNA extraído com proteinase K, DNAzol e fervura-fenol, de amostras de sêmen puras (sem diluição) foi de 10<sup>4</sup> leptospiros por mL, já com a utilização de terra diatomácea não foi possível detectar DNA de leptospiros no PCR de amostras de sêmen não diluídas com TE.

O método de extração de DNA por terra diatomácea de amostras de sêmen diluído com TE e experimentalmente contaminado não foi eficiente, estando o limiar de detecção acima de 10<sup>4</sup> leptospiros por mL, ou mesmo não sendo possível a sua detecção por essa técnica de extração.

## CONCLUSÃO

A padronização e a escolha correta da técnica de extração do DNA e do primer para a reação em cadeia da polimerase, são fundamentais no sucesso da pesquisa de agentes patogênicos, principalmente em materiais densos, viscosos e com possíveis inibidores como o sêmen. No presente experimento a técnica de extração de DNA por meio da lise com proteinase K, foi a que apresentou o melhor resultado custo/benefício.

## REFERÊNCIAS

- BAROCCHI, M. A., KO, A. I., FERRER, S. R., FARIA, M. T., REIS, M. G., RILEY, L. W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.1, p.191–195, 2001.
- BLENDEN, D.C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirose. In: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Reunion Interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis*. Argentina, 1975. p.160-168. (Publicación Científica, 316)
- BOOM, R., SOL, C. J. A., SALIMAS, M. M. M., JANSEN, C. L. Rapid and simple method for

<sup>3</sup> Diluidor TE pH 7,4: Tris HCl 10mM, EDTA (Ethylenediaminetetracetic acid-sal) 1mM

\* Unesp, Campus Jaboticabal; Instituto Biológico São Paulo, USP São Paulo.

- purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de controle de zoonoses e animais peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília, 1995. 98p.
- BROD, C. S., MARTINS, L. F. S., NUSSBAUM, J. R., FEHLBERG, M. F. B., FURTADO, L. R. I., ROSADO, L. R. I. Leptospirose bovina na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.14, n.84, p.15-20, 1995.
- CETINKAYA, B., ERTAS, H. B., ONGOR, H., MUZ, A. Detection of leptospira species by polymerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. **Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi**, v.24, n.2, p.123-130, 2000.
- CHAPPEL, R. J., PRIME, R. W., MILLAR, B. D., JONES, R. T., CUTLER, R. S., ADLER, B. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar *pomona* slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. **Veterinary Microbiology**, v.62, p.235-242, 1998.
- CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p.532-537, 1993.
- FABER, N. A., CRAWFORD, M., LEFEBVRE, R. B., BUYUKMIHCI, N. C., MADIGAN, J. E., WILLITS, N. H. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2731-2733, 2000.
- FUKUNAGA, M., HORIE, I., OKUZAKO, N., MIFUCHI, I. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene for *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.2, p.366, 1990.
- GILLESPIE, D. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.217-233, 1990.
- GINGERAS, T. R., RICHMAN, D. D., KWOH, D. Y., GUATELLI, J. C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.235-251, 1990.
- HEINEMANN, M. B., GARCIA, J. F., NUNES, C. M., MORAIS, Z. M., GREGORI, F., CORTEZ, A., VASCONCELLOS, S. A., VISINTIN, J. A., RICHTZENHAIN, L. J. Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 1, p. 32 – 34, 1999.
- HEINEMANN, M. B., GARCIA, J. F., NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M., VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.261-267, 2000.
- KEE, S., KIM, I., CHOI, M., CAANG, W. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.4, p.1035-1039, 1994.
- MAGAJEVSKI, F. M., GÍRIO, R. J. S., MATHIAS, L. A., MYASHIRO, S., GENOVEZ, M. E., SCARCELLI, E. P. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.434-437, 2005.
- MAGAJEVSKI, F. S. **Leptospira spp. e Brucella spp. em fetos e oócitos colhidos de vacas no momento do abate**. Jaboticabal, SP. 2007. 83 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- MASRI, S. A., NGUYEN, P. T., GALE, P., HOWARD, C. I., JUNG, S. C. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.61, n.1, p.15-20, 1997.
- MERIEN, F., AMOURIAX, P., PEROLAT, P., BARATON, G., SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.
- OIE - Organização Mundial de Sanidade Animal. Disponível em :<[http://www.oie.int/eng/in\\_index.htm](http://www.oie.int/eng/in_index.htm)>. Acesso em: 25 abr. 2007.
- PAUL, P. S. Applications of nucleic acid probes in veterinary infectious diseases. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.409-417, 1990.
- RICHTZENHAIN, L. J., CORTEZ, A., HEINEMANN, M. B., SOARES, R. M., SAKAMOTO, S. M., VASCONCELLOS, S. A., HIGA, Z. M. M., SCARCELLI, E. P., GENOVEZ, M. É. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 139-147, 2002.
- RODINA, V. N., BALASHOV, N. G. Leptospirosis infection of animals transmitted through insemination. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 19, 1971, Mexico. **Proceedings...** v.2, p.707-708.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 957p.

SCARCELLI, E., GENOVEZ, M. E., PIATTI, R. M., GIRIO, R. J. S., CARDOSO, M. C. V., MIYASHIRO, S., CASTRO, V. Detecção de *Leptospira* spp. em sêmen eqüino pela técnica da reação da polimerase em cadeia. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo. **Anais...** p.102.

SLEIGHT, S. D., WILLIAMS, J. A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.138, p.151-152, 1961.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American**

**Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.722-725, 1994.

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

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.