

## Detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino por eletroforese capilar fluorescente

Francisca Elda Ferreira DIAS<sup>1</sup>  
Sérgio Morais AOKI<sup>2</sup>  
Lígia Garcia MESQUITA<sup>3</sup>  
Caris Maroni NUNES<sup>3</sup>  
José Fernando GARCIA<sup>3</sup>

1 - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP  
2 - Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu - SP  
3 - Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba - SP

### Correspondência para:

JOSÉ FERNANDO GARCIA  
Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal  
Universidade Estadual Paulista  
Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia  
16050-680 - Araçatuba - SP  
jfgarcia@terra.com.br

Recebido para publicação: 06/07/2004  
Aprovado para publicação: 01/06/2005

### Resumo

Este estudo pretendeu avaliar o limiar de detecção da técnica de PCR aliada à eletroforese capilar para diagnóstico da *Leptospira pomona* em sêmen bovino. Doses inseminantes livres de patógenos foram contaminadas experimentalmente com *Leptospira pomona* em escalas que variavam de  $10^0$  a  $10^7$  bactérias/ml e submetidas à extração de DNA pelo método de fenol/clorofórmio. Após a reação de PCR, a visualização dos fragmentos foi realizada em três tipos de eletroforese: agarose 2% sob luz UV, acrilamida 8% corado com prata e eletroforese capilar fluorescente. A detecção de DNA de *Leptospira pomona* em sêmen bovino através de eletroforese capilar fluorescente foi possível a partir de concentração de  $10^2$  bactérias/ml. Nos métodos de eletroforese em agarose 2%, observou-se limite de detecção de  $10^4$  bactérias/ml e em gel de poliacrilamida 8% o limite de detecção foi de  $10^2$  bactérias/ml. A eletroforese capilar demonstrou ser uma alternativa eficaz e rápida na detecção de DNA de *Leptospira* em sêmen bovino podendo ser uma valiosa ferramenta para controle de qualidade do sêmen produzido em centrais de inseminação artificial dada a facilidade de automação desse processo.

### Palavras-chave:

Sêmen Bovino.  
*Leptospira*.  
PCR.  
Eletroforese Capilar.

### Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por uma espiroqueta, classificada na família Leptospiraceae, gênero *Leptospira*. Entre as várias doenças ligadas à reprodução, a leptospirose participa como uma das grandes responsáveis pela baixa produtividade do rebanho bovino, afetando de modo significativo a pecuária de um país, sua importância não é somente devida aos prejuízos econômicos e na cadeia de produção animal, mas também como causa de riscos à saúde humana<sup>1,2</sup>.

As perdas reprodutivas causadas pela *Leptospira interrogans* em bovinos, nas suas fases aguda e crônica, são caracterizadas principalmente por: aborto, infertilidade, retenção placentária, queda na produção de

leite, mastite e infecção renal<sup>3</sup>.

O diagnóstico definitivo da infecção por *Leptospira* spp é usualmente dado pelo isolamento e cultivo do agente infeccioso, o que pode demandar de semanas, ou na detecção de sua presença por métodos imunológicos, com variáveis sensibilidade e especificidade<sup>4,5,6</sup>.

Nos últimos anos, técnicas moleculares de diagnóstico embasadas na metodologia de PCR, constituíram importante avanço na detecção rápida de patógenos em diferentes tipos de amostras<sup>7</sup>. Diversos patógenos podem ser detectados com sucesso quando diagnosticados por PCR: Parvovirus canino<sup>8</sup>, Herpesvirus 1 bovino<sup>9,10,11</sup>, *Chlamydia psittaci* em amostras clínicas de aviário<sup>12</sup> e *Staphylococcus aureus* no leite<sup>13</sup> entre outros são exemplos disso.

Recentemente, a técnica de reação em

cadeia pela polimerase (PCR) começou a ser aplicada para a detecção de agentes infecciosos no sêmen de bovinos, tornando-se uma alternativa eficiente e promovendo o diagnóstico rápido e específico<sup>4,9,10</sup>. Trabalhos recentes<sup>14,15</sup>, demonstraram a viabilidade do diagnóstico de *Leptospira* por PCR no sêmen bovino.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR, aliada à eletroforese capilar, para detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino contaminado experimentalmente.

### Materiais e Métodos

O presente experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal, localizado na Faculdade de Odontologia de Araçatuba curso de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

#### Cepas padrão de *Leptospira pomona*

Cepas de *Leptospira pomona* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório IRFA-Química e Biotecnologia Industrial Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil. As bactérias foram inativadas pelo calor a 100 °C por 15 minutos. A concentração de bactérias foi determinada no laboratório de origem, pela contagem de células bacterianas em campo escuro.

#### Sêmen bovino

Amostras de sêmen bovino empregado para contaminação experimental com *Leptospira pomona* foram obtidas de um touro da raça Nelore da Central de Inseminação Artificial Lagoa da Serra, localizada no município de Sertãozinho, Estado de São Paulo. O sêmen foi testado por sorologia ou cultivo e apresentava resultado negativo para o agente em questão. Realizou-se a contagem de espermatozoides na amostra utilizando a câmara de Neubauer e procedeu-se a diluição em solução salina 0,9 % estéril para o volume final de 500 mL, conteúdo aproximadamente

$3 \times 10^7$  espermatozoides/ml (que constitui a dose inseminante padrão). Para determinar a menor concentração de DNA bacteriano capaz de ser detectada através da técnica de PCR, a contaminação experimental foi obtida por diluições serial em base 10 ( $10^7$  a  $10^0$  bactérias/ml) de *Leptospira pomona*.

#### Extração de DNA

A extração do DNA das suspensões contendo bactérias e sêmen bovino foi realizada segundo protocolo descrito Heinemann et al.<sup>15</sup> com algumas modificações. As amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 1 hora. Em seguida resuspendeu-se o sedimento em 410 L de tampão de lise contendo 50 mL de lisozima (20 mg/mL), 50 mL de proteinase K (20 mg/mL), 50 ml de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10 % e 260 ml de Acetato de Sódio 0,2 M e incubou-se a 56 °C. A integridade do DNA purificado foi constatada por eletroforese em gel de agarose 2 % empregando brometo de etídeo como revelador<sup>16</sup>.

#### Amplificação do DNA por PCR

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam 330 pares de base (pb) em *Leptospira* sp (LF-5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3' - marcado com substância fluorescente HEX e LR-5' TCCCCCATTTGAGCAAGATT 3) previamente descritos<sup>17</sup>.

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 50 mL contendo 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 2,5mM cloreto de magnésio; 1,25mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs); 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador LF e LR; 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). Além disso, foram utilizados em cada experimento controles negativos contendo todos os reagentes exceto DNA para monitoramento de possíveis contaminações. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 40 seg, 55°C por 40seg, 72°C por 40seg e extensão final 72°C por 5 minutos realizada

em termociclador PTC-100 (MJ-Research® - USA).

#### Análise dos Produtos de PCR

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, gel de poliacrilamida 8% corado com prata<sup>16</sup> e por eletroforese capilar em equipamento automático de análise de fragmentos de DNA (ABI-310 Applied Biosystem®).

### Resultados e Discussão

Recentemente, técnicas de PCR para detecção de bactérias patogênicas vêm sendo bastante utilizadas por sua precisão e sensibilidade. Estas vantagens permitem identificação extremamente específica, permitindo distinguir os diferentes genótipos de bactérias<sup>1,14,15,18,19,20</sup>.

A figura 1 apresenta os resultados da amplificação por PCR para detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino infectado experimentalmente com diferentes diluições desta bactéria. Para determinar o limite de detecção de *Leptospira* através da PCR foi realizada diluição seriada na base 10 em amostra de sêmen bovino livres de *Leptospira*, sendo possível detectar até a diluição contendo 10<sup>2</sup> bactérias/ml. Este resultados são semelhantes aos obtidos por Heinemann<sup>5</sup> cujo limiar de detecção foi 10 bactérias/ml em diluições desta bactéria em cultivo puro e sêmen contaminado experimentalmente.

A visualização dos produtos de PCR foi realizada através de três sistemas eletroforéticos: agarose 2 % (Figura 1A), acrilamida 8 % (Figura 1B) e eletroforese capilar em equipamento automático de análise de fragmentos de DNA-ABI310-Applied Biosystem® (Figura 1C). Através dos oligonucleotídeos iniciadores LF e LR observou-se a amplificação de um fragmento de 330 pares de base (bp) do DNA de *Leptospira pomona*.

Utilizando os métodos de eletroforese tradicionais (agarose 2% e

poliacrilamida 8%), foi possível detectar até a concentração de 10<sup>4</sup> bactérias/ml e 10<sup>2</sup> bactérias/ml em cada método respectivamente. Já através da eletroforese capilar foi possível detectar até a concentração de 10<sup>2</sup> bactérias/ml, sendo que este método mostrou-se mais rápido, prático e mais sensível podendo ser utilizado simultaneamente para a detecção não só de bactérias, mas também outros agentes microbianos que possam concorrer na infecção as amostras de sêmen.

A detecção do DNA de bactérias patogênicas após reação de PCR é rotineiramente realizada por gel de eletroforese. Porém o gel de eletroforese é regularmente pouco sensível e requer longo tempo para separação o que impõe limitações a total eficiência das técnicas de PCR para análise rápida, específica e automatizada<sup>21</sup>. Segundo Song, Mobley e Vo-Dinh<sup>22</sup> a alta velocidade e sensibilidade são os mais importantes fatores a serem considerados na detecção de bactérias porque a presença de até mesmo um único organismo patogênico pode resultar em infecção.

A eletroforese capilar pode ser uma alternativa na detecção de DNA de *Leptospira pomona*, tendo se mostrado uma maneira eficaz e rápida de detecção destes patógenos, quando comparado aos sistemas de eletroforéticos tradicionais. Além disso o acoplamento de outros patógenos a um teste rápido utilizando essa metodologia, pode constituir-se numa excelente ferramenta para o controle de qualidade sanitário em centrais de inseminação artificial e de transferência de embriões.

### Conclusões

Podemos concluir que a eletroforese capilar é uma valiosa ferramenta na detecção de *Leptospira pomona* por permitir rapidez e sensibilidade, vantagens estas que poderão no futuro ser adicionada aos métodos convencionais de detecção de patógenos no sêmen bovino podendo vir a constituir um

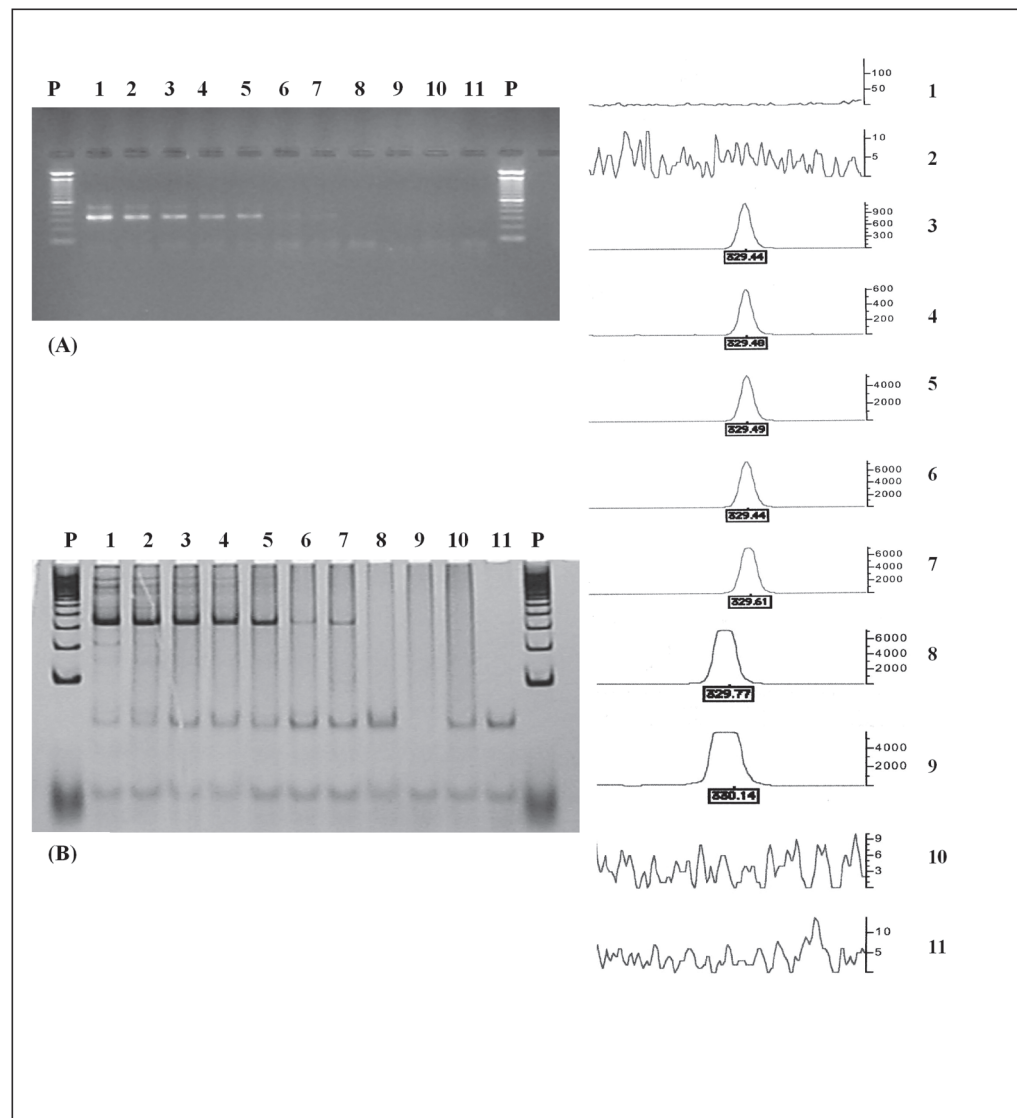


Figura 1 – Análise por três sistemas eletroforéticos da amplificações por PCR em amostras de sêmen infectadas experimentalmente com *Leptospira pomona*: A e B - agarose 2% e Acrilamida 8% respectivamente P) Marcador Molecular 100bp; 1) Controle positivo; 2 a 9) Diferentes diluições (respectivamente  $10^7$  a  $10^9$  bact/ml); 10) Sêmen não contaminado; 11) Controle negativo sem DNA, Figura C- Eletroforese Capilar-1 a 8) Eletroforectogramas diferentes às diluições de  $10^7$  a  $10^9$  bact/ml e 9) Controle positivo; 10) Sêmen não contaminado; 11) Controle negativo sem DNA

recurso a mais no diagnóstico de agentes infecciosos, para assegurar a produção de sêmen livre de *Leptospira* em centrais de inseminação artificial.

### Agradecimentos

A Fundação de Apoio a Pesquisa do

Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº01/05486-1); Sérgio Oliveira do Laboratório IRFA-Química e Biotecnologia Industrial Ltda pelo fornecimento das bactérias e à Central de Inseminação Artificial Lagoa da Serra Ltda pelo fornecimento das amostras de sêmen.

## Detection of *Leptospira pomona* in bovine semen by fluorescent capillary eletrophoresis

### Abstract

This study was performed in order to evaluate the detection limit of PCR with fluorescent capillary electrophoresis for *Leptospira pomona* diagnosis in bovine semen. Negative bovine semen samples were artificially contaminated with *Leptospira pomona* ( $10^0$  to  $10^7$  bacteria/ml) and DNA was extracted by phenol/chloroform protocol. DNA fragments visualization was done by three electrophoresis methods: under UV light in 2 % agarose gel, silver staining 8% polyacrylamide gel and fluorescent capillary electrophoresis. The detection limit of capillary electrophoresis for *Leptospira pomona* was  $10^2$  bacteria/ml. Under UV light, in 2 % agarose gel, the detection limit was of  $10^4$  bacteria/ml while for silver stained 8 % polyacrylamide gel it was  $10^2$  bacteria/ml. PCR with fluorescent capillary electrophoresis is an efficient and rapid diagnostic test for DNA detection of *Leptospira* in bovine semen and this can be an important tool for herd and semen sanitary control in artificial insemination centers.

### Key-words:

Semen Bovine.  
*Leptospira*.  
PCR.  
Capillary Eletrophoresis.

### Referências

- 1 RICHTZENHAIN, L. J. et al. A multiplex PCR for detection of *Brucella* spp and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary of Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.
- 2 BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary of Microbiology**, v. 90, p. 435-446, 2002.
- 3 RODRIGUES, A. L. B. et al. Sobrevivência da *Leptospira interrogans* sorovariedade *pomona* em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 4, p. 636-643, 2003.
- 4 MASRI, S. A. et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp in bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 15-20, 1997.
- 5 HEINEMANN, M. B. **Detecção de *Leptospira* spp em sêmen bovino através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 1995. p. 48 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- 6 CICERONI, L. et al. Differentiation of leptospire of the serogroup *pomona* by monoclonal antibodies, pulsed-field gel eletrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 37-44, 2002.
- 7 AL-SOUD, W. A. et al. Sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by the polymerase chain reaction. **Journal of Microbiology Methods**, v. 32, p. 217-224, 1998.
- 8 PEREIRA, C. A. D. et al. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary of Microbiology**, v. 75, p. 127-133, 2000.
- 9 ROCHA, M. A. et al. A high sensivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary of Microbiology**, v. 63, p. 1-11, 1998.
- 10 SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-921, 1994.
- 11 MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary of Microbiology**, v. 75, p. 145-153, 2000.
- 12 HEWINSON, G. R. et al. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. **Veterinary of Microbiology**, v. 54, p. 155-166, 1997.
- 13 KHAN, M. A. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, n. 7, p. 807-813, 1998.
- 14 HEINEMANN, M. B. et al. Detection of *leptospire*s in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 1, p. 32-34, 1999.

15 HEINEMANN, M. B. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary of Microbiology**, v. 73, p. 261-267, 2000.

16 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 956 p.

17 MÉRIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

18 LEAL-KLEVEZAS, D. S. et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3087-3090, 1995.

19 AMIN, A. S.; HAMDY, M. E. R.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella* *Militensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Veterinary of Microbiology**, v. 85, p. 37-44, 2001.

20 MANTEROLA, L. et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Veterinary of Microbiology**, v. 92, p. 65-72, 2003.

21 SMITS, C. B. et al. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. **Journal of Virology Methods**, v. 85, p. 65-73, 2000.

22 SONG, J. M.; MOBLEY, J.; VO-DINH, T. Detection of bacterial pathogen DNA using an integrated complementary metal oxide semiconductor microchip system with capillary array electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 501-508, 2003.