

AHOH-233 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 238-239, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc093>

Molecular identification of *Leptospira* spp. in urine samples from female water buffaloes. Preliminary results

Rosaura Pérez-Gil^{1*}, Héctor Nava-Trujillo²

¹ Centro Diagnóstico Veterinario Rosaura Pérez-Gil, Araure, Venezuela.

² Division of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia MO, USA

*Corresponding author: rperezgil@gmail.com

ABSTRACT

Animal leptospirosis is a zoonotic disease that affects multiple domestic and wild species. It causes generalized vasculitis, which in pregnant females results in placentitis and triggers abortion. Furthermore, it causes hemoglobinuria, icterus (jaundice), and congestion in different mucosa. The objective of this study was to establish whether the occurrence of hemoglobinuria and changes in the pigmentation of the vaginal mucosa was associated with the presence of *Leptospira* spp. DNA in the urine. Therefore, 38 urine samples from lactating female buffaloes showing hemoglobinuria, alterations in the pigmentation of the vaginal mucosa, history of abortion, and low-weight calves were evaluated. Additionally, hematocrit

Identificación molecular de *Leptospira* spp. en muestras de orina de búfalas de agua hembras. Resultados preliminares

Rosaura Pérez-Gil^{1*}, Hector Nava-Trujillo²

¹ Centro Diagnóstico Veterinario Rosaura Pérez-Gil, Araure, Venezuela.

² División de Ciencias Animales, Universidad de Missouri, Columbia MO, EE. UU.

*Autor de correspondencia: rperezgil@gmail.com

RESUMEN

La leptospirosis animal es una enfermedad zoonótica que afecta a múltiples especies domésticas y salvajes. Provoca vasculitis generalizada, que en mujeres embarazadas provoca placentitis y desencadena el aborto. Además, provoca hemoglobinuria, ictericia y congestión en diferentes mucosas. El objetivo de este estudio fue establecer si la aparición de hemoglobinuria y cambios en la pigmentación de la mucosa vaginal se asociaban con la presencia de *Leptospira* spp. ADN en la orina. Por lo tanto, se evaluaron 38 muestras de orina de búfalas lactantes que mostraron hemoglobinuria, alteraciones en la pigmentación de la mucosa vaginal, antecedentes de aborto y terneros de bajo peso. Además, el hematocrito se determinó

was determined by blood centrifugation in a capillary tube, and the presence of hemoparasites was determined by staining of blood smears. The DNA of *Leptospira* spp. was detected by PCR using two pairs of primers for the markers G1-G2, derived from a sequence from the genomic library of *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, strain RGA, which was described by Gravekamp et al. (1993). Additionally, Internal 1 and Internal 2 were derived from the sequence of the gene encoding the LipL32 protein and specific to identify pathogenic leptospira, described by Haake et al. (2000). Data analysis was performed with R (Fisher's exact test). The hematocrit mean was 21%, and all females were negative for hemoparasites (*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp., and *Trypanosoma* spp.). The percentage of *Leptospira* spp. DNA-positive samples with at least one of the markers used was 63%. The marker G1-G2 detected more positive samples in comparison with the marker Internal 1-Internal 2 (60.5% vs 7.9%, $p < 0.0001$ respectively). A significant association was observed between the mucosa's appearance and the presence of *Leptospira* spp. DNA in urine when the G1-G2 was used ($p < 0.0001$). In the case of females with icteric vaginal mucosa, the percentage of positive samples (85%, 17/20, $p = 0.001227$) was higher than that in buffaloes with normal mucosa (26.66%, 4/15). In addition, in females with icteric vaginal mucosa, the odds of a positive sample for *Leptospira* spp. DNA (using the G1-G2 marker) were 14 (95% CI: 2.3427-119.1974) times more than in females with normal vaginal mucosa. There was no significant difference in the percentage of positive samples between buffaloes grouped as icteric mucosa, and congestive mucosa ($p = 0.4529$), nor between the females grouped as congestive and normal mucosa ($p = 0.2451$). When the Internal 1-2 marker was used, there was no association between the appearance of the mucosa and the percentage of buffaloes with *Leptospira* spp. DNA in the urine ($p = 0.1714$). The presence of hemoglobinuria was not associated with *Leptospira* spp. DNA in the urine, regardless of the marker used for its detection ($p > 0.05$). In conclusion, the data from this study indicates that the G1-G2 marker was more efficient in determining the presence of *Leptospira* spp. DNA in urine, and using this marker, the icteric vaginal mucosa is associated with *Leptospira* spp. DNA in urine, thus suggesting that this clinical sign should be considered suggestive of the disease.

Keywords: *Leptospira*, PCR, icterus, water buffaloes.

mediante centrifugación de la sangre en un tubo capilar y la presencia de hemoparásitos se determinó mediante tinción de frotis de sangre. El ADN de *Leptospira* spp. se detectó mediante PCR utilizando dos pares de cebadores para los marcadores G1-G2, derivados de una secuencia de la biblioteca genómica de *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, cepa RGA, que fue descrita por Gravekamp et al. (1993). Además, Internal 1 e Internal 2 se derivaron de la secuencia del gen que codifica la proteína LipL32 y son específicos para identificar leptospiras patógenas, descrito por Haake et al. (2000). El análisis de los datos se realizó con R (prueba exacta de Fisher). La media del hematocrito fue del 21% y todas las hembras resultaron negativas para hemoparásitos (*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. y *Trypanosoma* spp.). El porcentaje de muestras de ADN *Leptospira* spp. positivas con al menos uno de los marcadores utilizados fue del 63%. El marcador G1-G2 detectó más muestras positivas en comparación con el marcador Interno 1-Interno 2 (60,5% vs 7,9%, $p < 0,0001$ respectivamente). Se observó una asociación significativa entre la apariencia de la mucosa y la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en la orina cuando se utilizó el G1-G2 ($p < 0,0001$). En el caso de hembras con mucosa vaginal icterica, el porcentaje de muestras positivas (85%, 17/20, $p = 0,001227$) fue mayor que en búfalas con mucosa normal (26,66%, 4/15). Además, en hembras con mucosa vaginal icterica, las probabilidades de una muestra positiva para ADN de *Leptospira* spp. (utilizando el marcador G1-G2) fue 14 (IC 95%: 2,3427-119,1974) veces más que en hembras con mucosa vaginal normal. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de muestras positivas entre las búfalas agrupadas como mucosa icterica y mucosa congestiva ($p = 0,4529$), ni entre las hembras agrupadas como mucosa congestiva y normal ($p = 0,2451$). Cuando se utilizó el marcador Interno 1-2 no hubo asociación entre la apariencia de la mucosa y el porcentaje de búfalos con *Leptospira* spp. ADN en orina ($p = 0,1714$). La presencia de hemoglobinuria no se asoció con *Leptospira* spp. ADN en orina, independientemente del marcador utilizado para su detección ($p > 0,05$). En conclusión, los datos de este estudio indican que el marcador G1-G2 fue más eficiente para determinar la presencia de *Leptospira* spp. ADN en orina, y utilizando este marcador, se asocia la mucosa vaginal icterica con *Leptospira* spp. ADN en orina, lo que sugiere que este signo clínico debe considerarse sugestivo de la enfermedad.

Palabras clave: *Leptospira*, PCR, ictericia, búfalos de agua.