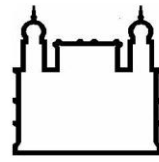




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DAS LEPTOSPIRAS ISOLADAS DOS PACIENTES
ATENDIDOS NO HOSPITAL COUTO MAIA**

ALCINÉIA OLIVEIRA DAMIÃO

**Salvador – Bahia – Brasil
2015**

ALCINÉIA OLIVEIRA DAMIÃO

**Caracterização das Leptospiras isoladas dos pacientes atendidos no Hospital
Couto Maia**

CPqGM

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**CARACTERIZAÇÃO DAS LEPTOSPIRAS ISOLADAS DOS
PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL COUTO MAIA**

ALCINÉIA OLIVEIRA DAMIÃO

Orientador: Prof^o Dr^o Mitermayer Galvão dos Reis

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Patologia Humana, como pré-
requisito obrigatório para
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2015

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Damião, Alcinéia Oliveira
D158c Caracterização das leptospiros isoladas dos pacientes atendidos no Hospital
Couto Maia / Alcinéia Oliveira Damião. - 2015.
41 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de Patologia
e Biologia Molecular.

Dissertação (Mestrado de Patologia) – Universidade Federal da Bahia,
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. Leptospirose. 2. Sorogrupo. 3. Hemorragia. I. Título.

CDU 616.986

**“CARACTERIZAÇÃO DAS LEPTOSPIRAS ISOLADAS DOS PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL
COUTO MAIA”**

ALCINEIA OLIVEIRA DAMIÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO

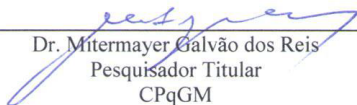
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Ceuci de Lima Xavier Nunes
Professora Adjunta
Escola Bahiana de Medicina



Dr. Juarez Pereira Dias
Professor Assistente
Escola Bahiana de Saúde Pública



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq

FAPESB

NIH

BioManguinhos

“Simplicidade é o
comportamento de quem
começa a ser sábio.”

Antonio Sergio Ferraudo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr^o Mitermayer Galvão por ter me concedido a oportunidade de ingressar no mestrado e pela dedicação e orientação.

A Dr^a Janet Lindow, Dr^o José Hagan e Dr^o Albert Ko, pela contribuição científica na elaboração deste trabalho.

A Eliana Reis pelo incentivo e disposição em sempre querer ajudar.

A todos os amigos do LPBM/CPqGM (equipe de Meningite, HCV, Dengue, Oncologia, etc.) que conquistei durante esses quase 8 anos de Fiocruz, pelo apoio, amizade, convívio, palavras de conforto e pelo aprendizado de trabalhar em equipe com compromisso e respeito. Em especial: Soraia Cordeiro, Theomira Azevedo, Rita de Cassia, Silvana Paz.

A todos os colegas da equipe de Lepto e Dengue, os atuais e os antigos, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente em especial a: Elsio Wunder, Claudio Figueira, Andreia Carvalho, pessoas que contribuíram para o meu crescimento científico.

A Cleiton Guimarães e Rosane Passos pela ajuda em diversos aspectos administrativos.

Aos professores do Curso de Patologia pelos ensinamentos.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz) pela estrutura e recursos disponíveis para realização desse trabalho.

Ao Hospital Couto Maia por aceitar participar da realização da vigilância para leptospirose e aos seus pacientes por aceitarem participar do estudo e doarem o seu material biológico.

Aos professores que compõe essa banca que gentilmente aceitaram avaliar este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado

A equipe da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM/FIOCRUZ), pela ajuda nas consultas e formatação do trabalho.

Nada disso seria possível sem o apoio:

Da minha família, pelo incentivo, palavras de conforto e presença em todos os momentos de minha vida.

Dos meus pais Antonio Mota e Valdilene Oliveira, pelo apoio e incentivo na minha vida pessoal e acadêmica.

Das minhas irmãs Valdinéia Damião e Aldinéia Damião pela amizade e companheirismo.

Da minha sobrinha Ludmila Damião pelo momentos de descontração e alegria.

E acima de tudo e de todos agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me dar forças a cada dia para finalizar este trabalho e seguir a minha jornada.

DAMIÃO, Alcinéia Oliveira. Caracterização das leptospiras isoladas dos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia. 100 f. II. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com 1,2 milhões de casos registrados a cada ano. De 1996 a 2013, o grupo de pesquisa de leptospirose do CPqGM, realiza uma vigilância ativa no Hospital Couto Maia em Salvador-Ba, onde foi recrutado 4612 casos suspeitos para leptospirose. Destes 4612 foi confirmado o diagnóstico de 1853 (40%) utilizando pelo menos um dos três métodos de diagnóstico (MAT, Hemocultura, qPCR). Dentre os casos confirmados, 1759 (95%) foram confirmados pelo MAT. A sensibilidade do MAT foi diferente entre as amostras aguda e convalescente, sendo 60% na fase aguda e 97% na fase convalescente. O sorogrupo Icterohaemorrhagiae foi o mais prevalente (90%) dos casos confirmados para MAT. Durante o período do estudo foram coletadas 1133 hemoculturas e destas 203 (18%) foram positivas, sendo possível isolar leptospiras de 93/203 (45%) das hemoculturas, as quais foram soro-agrupadas com soros heterólogos de coelho. A concordância entre o sorogrupo encontrado no MAT e na soro-agrupagem foi de 80%. Os achados mostram que existe uma concordância significativa entre o sorogrupo encontrado pelos dois métodos, o que indica que o painel de cepas utilizado no MAT apresenta uma ótima cobertura para os sorogrupos prevalentes na região. A predominância de um sorogrupo facilitou quanto a tomadas de decisões para prevenção e controle, assim como facilita para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e vacinas mais direcionados.

Palavras-chave: Leptospirose, Sorogrupo, MAT, Hemocultura, Icterohaemorrhagiae.

DAMIÃO, Alcinéia Oliveira. Characterization of isolated leptospires of patients seen at the Hospital Couto Maia. 100 f. II. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Leptospirosis is a re-emerging zoonotic disease of global importance, with 1,2 million cases reported each year. Diagnosis of leptospirosis is often difficult given the nonspecific disease presentation. In order to compare the performance of the two gold standard diagnostic tests for leptospirosis, the group enrolled 4612 patients with suspected leptospirosis during active surveillance at the state infectious disease reference hospital, Hospital Couto Maia, in Salvador, Bahia between 1996 and 2013. Of these, was confirmed *Leptospira* infection in 1853 (40%) using at least one of three diagnostic methods (microagglutination (MAT), blood culture, and qPCR). Was confirmed 1759 (95%) cases using only the MAT assay, and identified the serogroup Icterohaemorrhagiae as the infective agent in 90% of MAT positive samples. It was determined the sensitivity of the MAT was 60% for acute phase samples and increased to 97% for convalescent samples. Within this study period, it was possible to collect 1133 blood cultures and was isolated leptospires from 93 of 203 (45%) of blood cultures, and determined the serotype using heterologous rabbit sera. The concordance between the infective serogroup identified using hemoculture and MAT

techniques was 80%. This result indicates that the panel of 11 strains used in the MAT represents a majority of the infective serogroups causing disease in our study population. The predominance of a single serogroup in symptomatic cases informs the development of new diagnostic tests and novel vaccines to prevent leptospirosis in Brazil.

Keys word: Leptospirosis, Serogroup, Diagnosis, MAT, Blood culture, Icterohaemorrhagiae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Agente etiológico da Leptospirose.....	19
Figura 2 Cinética da infecção por <i>Leptospira</i> no sangue.....	21
Figura 3 Distribuição dos casos confirmados, não confirmados e prováveis para leptospirose em Salvador-BA.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos confirmados de leptospirose, por estado, segundo ano de primeiros sintomas. Brasil 2008 – 2012	16
Tabela 2	Nome dos hospedeiros de manutenção e respectivos sorovares mais comuns de <i>Leptospira</i> spp.....	18
Tabela 3	Limitações dos testes sorológicos MAT e ELISA.....	26
Tabela 4	Confirmação sorológica dos casos de leptospirose pelo MAT, utilizando amostras pareadas e amostra única de fase aguda e fase convalescente, distribuídas de acordo com os critérios de confirmação utilizados no MAT (1996- 2013).....	39
Tabela 5	Provável sorogrupo infectante dos casos confirmados e prováveis pelo MAT em Salvador (1996-2013)	39
Tabela 6	Sorogrupo presuntivo no MAT x Sorogrupo de isolados de cultura em Salvador (1996 - 2013).....	40
Tabela 7	Comparação entre os casos confirmados, não confirmados e prováveis no MAT e na cultura (1996-2013).....	40
Tabela 8	Sorogrupos confirmados e presuntivos para casos de leptospirose em Salvador, estratificados por fase aguda e fase e convalescente.....	41

LISTA DE SIGLAS

BFD	Bacterioferritina Associadas a Ferrodoxina
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	<i>Dual Path Plataform</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMJH	Ellinghausen Mccullough Harris
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
SHPS	Síndrome da Hemorragia Pulmonar Grave
LPS	Lipopolissacarideos
MAT	Microscopic Agglutination
NTC	Controle Negativo
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Reactive oxygen species
SINAM	Sistema de informação de Agravos de Notificação
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
OMS	Organização Mundial de Saúde
IgG	Imunoglobulina tipo G
IgM	Imunoglobulina tipo M

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	AGENTE ETIOLOGICO	17
1.1.1	Classificação das leptospiros	17
1.1.2	Morfologia e biologia das leptospiros	18
1.2	PATOGENIA DA LEPTOSPIROSE	19
1.3	ASPECTOS CLINICOS	22
1.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E CARACTERIZAÇÃO DAS LEPTOSPIRAS	23
1.4.1	Cultura	24
1.4.2	Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)	24
1.4.3	Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)	25
1.4.4	Teste Rápido DPP (<i>Dual Path Platform</i>)	26
1.4.5	PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)	27
1.4.6	Caracterização dos isolados de leptospiros	27
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	LOCAL DO ESTUDO, COLETA DE INFORMAÇÕES E DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	30
4.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E CONFIRMAÇÃO LABORATORIAL	31
4.2.1	Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)	31

4.2.2 Isolamento de leptospiras nas hemoculturas	33
4.2.3 Soro-agrupagem para caracterização dos isolados de leptospiras	33
4.2.4 Real time – qPCR	33
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
6 RESULTADOS	35
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	42
8 DISCUSSÕES	42
9 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por uma espiroqueta patogênica do gênero *Leptospira*, que, fora do hospedeiro, sobrevive melhor em ambientes quentes e úmidos (LEVETT, 2001, BHARTI et al., 2003). É estimado o registro de 1,2 milhões de casos a cada ano, em especial em países com clima tropical ou subtropical (HAGAN et al., 2013).

A leptospirose apresenta uma variedade de mecanismos de transmissão, com vários hospedeiros, e um grande número de sorovares patogênicos. A doença se manifesta de várias formas clínicas, desde a forma assintomática até formas graves fatais. Na maioria dos casos, a falta de sintomas específicos dificulta o diagnóstico precoce, sendo confundida com outras doenças febris (LEVETT, 2001; KAWAGUCHI et al., 2008; TANGKANAKUL et al., 2000).

Tradicionalmente a leptospirose era considerada uma doença de padrão rural ou ocupacional (MYERS, 1979), associada ao trabalho em lavouras de arroz ou em algumas profissões que implique exposição a ambientes ou a animais contaminados, como trabalhadores de minas, açougueiros e agricultores (FAINE, 1982; NÁJERA et al., 2005;). Porém, recentemente a leptospirose tem sido associada a alterações demográficas, ambientais e climáticas (KO et al., 1999), tais como: exposições recreacionais (WEIR, 2000), eco-turismo (LESHEM et al., 2010; STERN et al., 2010), prática de atividades esportivas (WEIR, 2000; HAAKE et al., 2002; MORGAN et al., 2002), eventos climáticos extremos, como dilúvios, responsáveis por epidemias urbanas, como por exemplo nas Filipinas, em 2009, (AMILASAN et al., 2012) e na Austrália, em 2011 (SMITH et al., 2013).

Atualmente a leptospirose tem sido descrita predominantemente nos grandes centros urbanos, associada à transição demográfica, causada pela rápida urbanização, crescimento exacerbado das comunidades carentes em países em desenvolvimento (UN-HABITAT, 2010). Em 2001, o número total de moradores em comunidades carentes no mundo situava-se em cerca de 924 milhões de pessoas, o que representa 32% da população urbana mundial (UN-HABITAT, 2003). Nos últimos anos o número de moradores em comunidades carentes tem triplicado, alcançando 2,6 bilhões de pessoas (UN-HABITAT

2010). Condições precárias de moradia fazem com que os moradores das comunidades carentes fiquem mais expostos aos agentes causadores de doenças zoonóticas como, por exemplo, as leptospiros. (REIS et al., 2008).

No Brasil, entre o período de 2008 a 2012, foram confirmados uma média de 3.670 casos de leptospirose por ano, ficando a Bahia entre a 8ª e 11ª posição em número de casos confirmados (**Tabela 1**) (SINAN 2014). Em Salvador-Ba mais de 50% da população reside em comunidades carentes (SECOMP, 2005), um ambiente propício para adquirir a leptospirose (FELZEMBURGH et al., 2014), por exemplo, um estudo realizado em uma comunidade carente de Salvador demonstrou que 15,4% dos participantes tiveram infecção prévia por leptospirose, com maior risco para as pessoas que residiam em casas próximas a esgoto aberto, próximo a acúmulo de lixo ou que possuíam baixa renda, além disso em um outro estudo realizado em Salvador foi encontrada uma correlação positiva entre infecção por *Leptospira* e baixo nível educacional (REIS et al., 2008; DIAS et al., 2007).

Nas comunidades carentes de Salvador o *Rattus norvegicus* é o principal reservatório das leptospiros e o sorovar *Copenhageni* é o mais predominante (KO et al., 1999; GOUVEIA et al., 2008; FELZEMBURGH et al., 2014). Nestes hospedeiros a manutenção da infecção resulta em uma colonização tubular renal crônica, sem causar doença aparente (DUTTA, 2005). Estudos demonstram que ratos infectados experimentalmente podem excretar até 10⁷ Leptospiros/ml de urina durante meses sem sinais clínico de infecção (MONAHAN et al., 2008; BONILLA et al., 2005).

No Brasil observa-se uma maior incidência da leptospirose durante a época de chuvas intensas e inundações, levando ao aumento da transmissão e surtos sazonais (KO et al., 1999; BARCELLOS, 2000; KUPEK, 2000).

Tabela 1- Número de casos confirmados de leptospirose, por estado, segundo ano de primeiros sintomas. Brasil (2008- 2012).

ESTADOS	ANO				
	2008	2009	2010	2011	2012
Sao Paulo	561	798	763	947	725
Santa Catarina	916	405	401	688	402
Rio Grande do Sul	387	444	439	534	262
Acre	36	66	43	126	240
Espirito Santo	134	230	229	290	230
Paraná	196	186	258	452	210
Rio de Janeiro	187	303	255	411	173
Minas Gerais	61	93	82	105	117
Pernambuco	175	199	230	377	115
Para	120	99	76	127	97
Bahia	108	156	196	166	91
Amapá	83	91	57	93	78
Amazonas	40	60	33	72	67
Ceara	79	303	32	133	57
Alagoas	60	75	71	85	46
Sergipe	70	50	70	51	33
Goiás	8	8	6	3	19
Maranhão	55	56	34	45	18
Distrito Federal	22	32	31	11	18
Paraíba	12	13	7	26	15
Rio Grande do Norte	14	39	17	35	13
Rondônia	15	21	11	56	9
Mato Grosso	13	1	3	8	6
Mato Grosso do Sul	5	3	2	0	4
Tocantins	0	1	0	3	4
Piauí	5	16	1	1	3
Roraima	3	1	1	0	3
TOTAL	3365	3749	3348	4845	3055

Fonte: Ministério da Saúde / SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)

O quadro clínico inicial da doença é inespecífico, com grande diversidade de sintomas tais como, febre, dor de cabeça e dores musculares, podendo ser

confundida com outras doenças como: febre da dengue, gripe, febre tifoide e encefalite viral (ELLIS et al., 2008; FLANNERY et al., 2001). Dificuldade em diagnosticar a doença na fase inicial contribui para a evolução das formas grave, tais como, doença de Weil e a síndrome hemorrágica pulmonar associada à leptospirose (LPHS), as quais apresentam taxas de mortalidade elevadas 10% e 50% respectivamente (KO et al., 2009; GOUVEIA et al., 2008; MAROTTO et al., 1999).

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

1.1.1 Classificação das leptospiras

O agente etiológico da leptospirose é uma bactéria do gênero *Leptospira*, pertencente à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003). As leptospiras apresentam expressão diferenciada de lipopolissacarídeos (LPS) de superfície, as quais são agrupadas em mais de 260 sorovares. Esses sorovares apresentam diversidade antigênica entre si, devido à diferença entre os carboidratos que compõem a cadeia lateral dos LPS (PEREIRA et al., 2000; VINETZ, 2001; ADLER et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2010). Sorovares antigenicamente relacionados estão agrupados em 24 sorogrupos (VINETZ, 2001; EVANGELISTA et al., 2010).

Recentemente o gênero *Leptospira* foi classificado em 20 espécies, dividido em 9 espécies patogênicas (*L. alexanderi*, *L. alstoni*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, e *L. weilii*) 5 espécies intermediárias, as quais a patogenicidade ainda não está clara (*L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. licerasiae*, e *L. Wolffi*) e 6 espécies saprofíticas (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. terpstrae*, *L. vanthielili* e *L. wolbachii*) (LEVETT, 2001; BRENNER et al., 1999; ADLER et al., 2010). As espécies que estão mais associadas à doença em humanos são *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. borgpetersenii* (BRENNER et al., 1999; BULACH et al., 2006). Muitos sorovares de *Leptospira* são comumente associados a determinados reservatórios animais como mostra a **Tabela 2** (BHARTI et al., 2003).

No Brasil, os sorovares de maior importância são Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, que possuem o rato como o seu principal reservatório (KO et al., 1999).

Tabela 2 – Nome dos hospedeiros de manutenção e respectivos sorovares mais comuns de *Leptospira* spp.

Hospedeiro de manutenção	Sorovar (es)
Suínos	Pomona, Tarassovi, Bratislava
Bovinos	Hardjobovis, Pomona
Equinos	Bratislava
Caninos	Canicola
Ovinos	Hardjobovis
Ratos	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Camundongos	Ballum, Arborea, Bim
Marsupiais	Grippotyphosa
Morcegos	Cynopteri, Wolffi

Fonte: Adaptada por Baharti 2003.

1.1.2 Morfologia e biologia das Leptospiras

As leptospiras são espiroquetas extremamente móveis, flexíveis, e com forma helicoidal (**Figura 1**). Possuem extremidades encurvadas em forma de ganchos típicos, apresentam dois flagelos periplasmáticos axiais, se movimentam por rotação, e seu tamanho normalmente é de 0,1 a 0,15 µm de espessura por 6,0 a 12,0 µm de comprimento. São bactérias obrigatoriamente aeróbias e, crescem numa temperatura de 28° a 30°C e pH 7,2 a 7,6, e se reproduzem por fissão binária (RITCHIE, 1965; FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

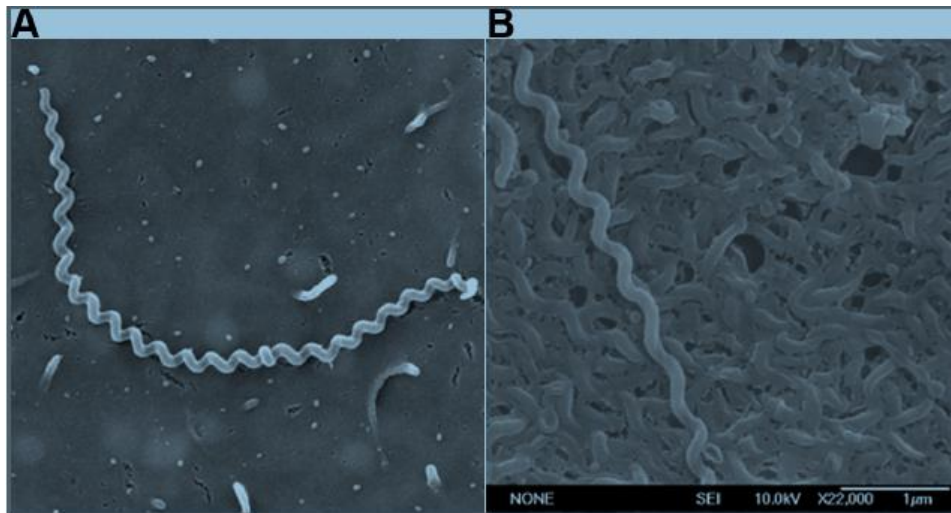


Figura 1: Agente etiológico da Leptospirose. Microscopia eletrônica de varredura da *Leptospira spp.* Em células MDCK (A) e em meio de cultura formando biofilme (B). Cortesia Claudio Pereira Figueira.

Semelhante a outras bactérias gram-negativas, as leptospiros apresentam LPS em sua membrana externa, o qual apesar de sua menor endotoxidade quando comparada com outras bactérias constitui o principal antígeno. Este LPS ajuda na ativação do receptor Toll like 2 (TLR2) ao invés do TLR4, o receptor clássico de LPS (HAAKE et al., 2010; WERTS et al., 2001).

Outras proteínas estruturais e funcionais também fazem parte de sua membrana externa, sendo a maioria destas lipoproteínas, como por exemplo a Leptospiral Major Outer Membrane Protein (LipL32), presente apenas nas leptospiros patogênicas, a Leptospiral immunoglobulin-like protein A (Lig A) e Leptospiral immunoglobulin-like protein B (Lig B) que estão associadas a virulência, a OmpA-like Protein (Loa 22), que juntamente com a LipL32 são as mais abundantes na membrana externa, dentre outras como a LipL21 e LipL41 (CULLEN et al., 2005; FIGUEIRA et al., 2011; HAAKE et al., 2010).

1.2 PATOGENIA DA LEPTOSPIROSE

Os hospedeiros de leptospiros podem ser divididos em dois grupos: hospedeiros de manutenção (reservatórios) e hospedeiros acidentais (incidentais). Os hospedeiros de manutenção são os responsáveis por manter

o patógeno na natureza através da infecção crônica dos túbulos renais, sendo os microrganismos eliminados pela urina (leptospiúria), por um período de tempo variável que pode chegar a mais de um ano (BABUDIEMI 1958; CORDEIRO et al., 1981; LEVETT, 2001).

O processo patogênico da leptospirose é complexo. Os principais fatores que colaboram intensamente com a penetração das leptospiras nas mucosas e pele lesada são a motilidade e morfologia desse agente (LIAO et al., 2009; LI, 2010; LUX et al., 2001; ROSEY et al., 1996).

A motilidade parece ser um dos principais fatores para a rápida disseminação da *Leptospira*. Análises genômicas indicam que, pelo menos 80 genes identificados pelo sequenciamento do genoma estão relacionados com a motilidade e quimiotaxia (YURI et al., 1993; REN et al., 2003).

Assim como em outras doenças, para que ocorra a infecção é necessária a adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro, a qual é mediada pelas proteínas de superfície, que são expressas durante a infecção. Leptospiras patogênicas interagem com a maioria dos componentes da matriz extracelular, e outros componentes do hospedeiro tais como laminina, colágeno tipo I e IV, fibronectina celular e plasmática, fibrinogênio, elastina, adesinas e proteoglicanos (BARBOSA et al., 2006; BREINER et al., 2009; CHOY et al., 2007). Após a infecção segue-se uma rápida disseminação e multiplicação da bactéria no sistema vascular do hospedeiro e após 48 horas pode-se isolar a leptospira em praticamente todos os órgãos e tecidos, incluindo rins, fígado, baço, sistema nervoso central, olhos, trato genital e líquido cefalorraquidiano (BAROCCHI, et al., 2002; LOURDAULT et al., 2009; ATHANAZIO et al., 2008; RATET et al., 2014).

A leptospirose apresenta duas fases: fase aguda ou septicêmica e fase imune (FARR, 1995). A fase aguda tem duração de aproximadamente 4 a 7 dias de sintomas, enquanto a fase imune inicia-se a partir do 7º dia de sintomas (**Figura 2**). Definir os fatores que influenciam a variabilidade do tempo de incubação bem como a gravidade da doença continua sendo um desafio, pois ainda não se sabe com clareza quais são esses fatores, acredita-se que estejam relacionados a características de virulência do organismo, a dose de

inóculo durante a infecção, a características da resposta imune do hospedeiro ou uma interação entre estes fatores. Sabe-se que a interação entre esse fatores resulta em falência hepatorenal, hemorragia pulmonar, ou morte em 5% a 25% dos casos graves (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003).

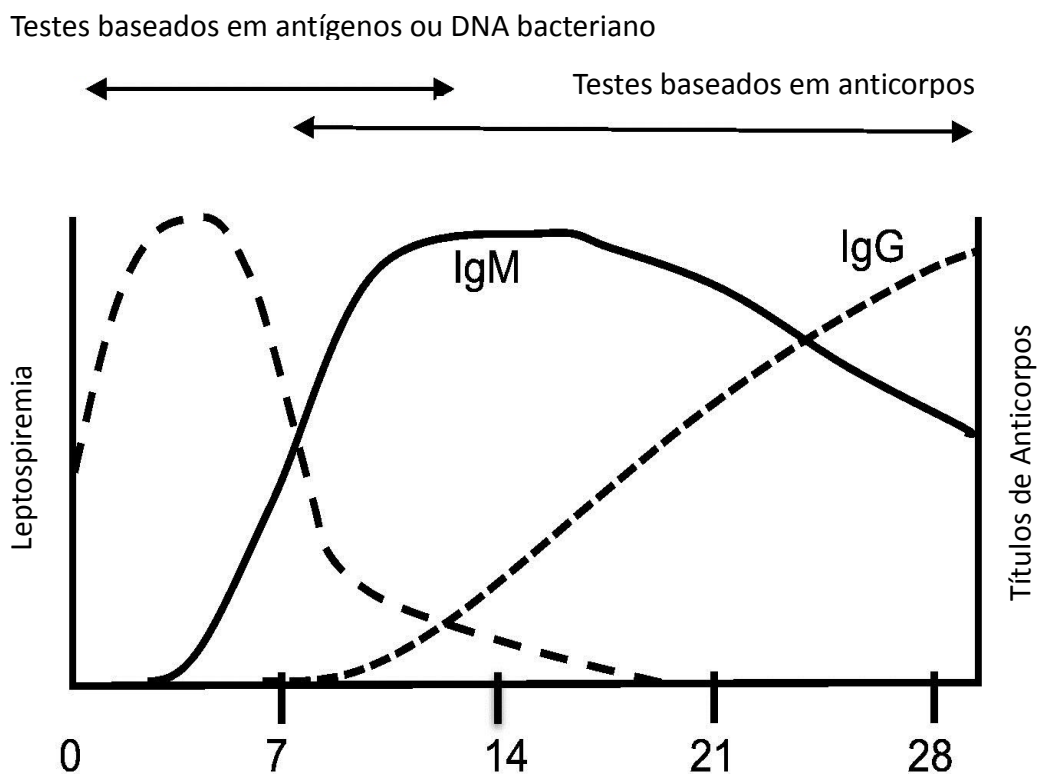


Figura 2: Cinética da infecção por *Leptospira* no sangue

Nos primeiros dias de infecção ocorre a leptospiremia, onde é possível encontrar antígenos ou DNA leptospiral no sangue. Logo após a infecção ocorre a migração das leptospiras para os órgãos alvo. Os níveis de anticorpos IgM tornam-se detectáveis por volta do 5º dia e posteriormente por volta do 7º dia começa a ocorrer a produção de IgG.

Fonte: Adaptado Picardeau, 2014.

Segundo alguns autores, a resposta inflamatória é um fator altamente relevante na gravidade da leptospirose. Estudos realizados pelo grupo de pesquisa em

leptospirose do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM), demonstrou uma elevação de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas formas graves (ARAÚJO et al., 2014; MACIEL et al., 2006). Além disso, foi demonstrado uma associação dos níveis elevados de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL6) e Interleucina 10 (IL10) nas formas graves, associadas ao aumento de letalidade (TAJIKI et al., 1996; REIS et al., 2013).

Durante o processo de patogênese da infecção por *Leptospira*, os órgãos mais acometidos são o pulmão, o fígado e os rins. Nos pulmões o principal dano associado à leptospirose é a hemorragia intra-alveolares, que leva o paciente a apresentar um quadro de insuficiência respiratória (NALLY et al., 2004; PEREIRA et al., 2005; GOUVEIA et al., 2008). O dano hepático ocorre devido a perda na arquitetura celular tecidual, onde é possível notar a presença de células de Kupffer aumentadas, inflamação, necrose e, em algumas situações a presença de células apoptóticas (NALLY et al., 2004; VAN DEN INGH et al., 1986). Os rins ao serem colonizados desenvolvem nefrite túbulo-intersticial, necrose tubular, inflamação local, edema intersticial com infiltrado celular, além de hemorragias (SANTOS et al., 2010; NALLY et al., 2004; VAN DEN INGH et al., 1986; SITPRIJA et al., 1980; YANG et al., 2001).

1.3 ASPECTOS CLINICOS

As manifestações clínicas variam desde as formas leves, até as formas graves (LEVETT, 2001). Na forma leve a maioria das infecções é subclínica ou de baixa gravidade e a resolução coincide com o aparecimento de anticorpos. Ela se caracteriza pela elevada diversidade de sinais e sintomas, tais como: febre, cefaleia, mialgias, dores abdominais, anorexia e conjuntivite. (LEVETT 2001; BALASSIANO et al., 2011).

A forma grave apresenta geralmente insuficiência renal aguda e hemorragia o que caracteriza a síndrome de Weil, assim como pode também estar associada a sangramento pulmonar maciço mais conhecido como síndrome de hemorragia pulmonar grave (SHPS) com uma letalidade >50%, e algumas

vezes presença de óbito nas primeiras 24 horas de internamento, por asfixia causada por profusa hemorragia bronco-pulmonar (GOUVEIA et al., 2008; NICODEMO et al., 1997; GONÇALVES et al., 2006; YERSIN et al., 2000). As manifestações pulmonares incluem tosse, dispnéia e hemoptise (SPICHLER et al., 2008).

1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E CARACTERIZAÇÃO DAS LEPTOSPIRAS

As técnicas utilizadas para o diagnóstico da leptospirose podem ser indiretas, baseada na detecção de anticorpos (testes sorológicos) e técnicas diretas baseadas na detecção de antígenos, e ou ácidos nucleicos (testes moleculares). O teste de diagnóstico a ser utilizado dependerá de vários fatores, tais como, viabilidade financeira, precisão do diagnóstico, a viabilidade técnica e prática, e a necessidade de um resultado mais rápido (FAINE et al., 1999; PICARDEAU et al., 2014; PICARDEAU, 2013). Os métodos mais utilizados são o *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) e o teste de Aglutinação Microscópica (MAT=*microscopic agglutination test*) ambos sorológicos (FAINE et al., 1999).

No Brasil, o Ministério da Saúde considera como caso confirmado de leptospirose humana aqueles que preenchem os seguintes requisitos: (1º) isolamento de *Leptospira* a partir de sangue, urina ou líquor, (2º) MAT com soroconversão ou com evidencia de aumento de quatro vezes ou mais no título, (3º) MAT com título igual ou superior a 1:800, quando não houver disponibilidade de duas ou mais amostras. Títulos menores (entre 100 e 800) poderão ser considerados de acordo com a situação epidemiológica do local, (4º) ELISA IgM ou Soro Aglutinação Macroscópica positivo, quando não for possível realizar a MAT, (5º) exame imunohistoquímico em casos não confirmados que evoluíram para óbito (BRASIL, 1995).

1.4.1 Cultura

Durante a fase aguda da doença a carga bacteriana no sangue varia de 10^2 a 10^6 *Leptospira* por mL (AGAMPODI et al., 2012), o que permite o isolamento durante os primeiros 7 a 10 dias da doença. O isolamento pode ser feito também a partir de LCR, tecidos e urina (TRUCOLLO et al., 2001; BROWN et al., 2003). O meio de cultura com o material inoculado precisa ser analisado em microscópio de campo escuro, semanalmente por um período de até três meses (KATZ et al., 2003; LEVETT, 2003; MCBRIDE et al., 2005). A grande vantagem do isolamento é que permite um diagnóstico definitivo, na identificação do sorogrupo e sorovar, sugerindo o provável reservatório responsável pela disseminação no ambiente (KATZ et al., 2003; LEVETT, 2003; MCBRIDE et al., 2005).

A cultura para isolamento (considerado pelo Ministério da Saúde o padrão ouro para leptospirose) só permite a confirmação dos casos positivos após algumas semanas, proporcionando sempre um diagnóstico retrospectivo (MERIEN et al., 1995; FAINE et al., 1999). Esse processo demorado do isolamento é decorrente principalmente da baixa taxa de crescimento de leptospiros, que na maioria das vezes, está aliada a contaminação do meio com outros microrganismos de crescimento mais rápido, assim como rigorosas exigências da cultura *in vitro* desta bactéria (VALVERDE et al., 2008).

1.4.2 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)

O MAT é considerado o padrão de referência para diagnóstico sorológico da leptospirose, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (CUMBERLAND et al., 1999; COLE et al., 1973). Através do MAT é detectado anticorpos aglutinantes no soro tanto da classe IgM como IgG (LEVETT, 2003; FAINE et al., 1999). A leitura da MAT é realizada em microscópio de campo escuro e o ponto final é a maior diluição do soro para o qual 50% ou mais de aglutinação ocorre (AHMAD et al., 2005). Seus critérios padrão para positivos são: soroconversão (conversão de sorologia negativa para um título $\geq 1:100$) e quatro vezes aumento de título de anticorpos (LEVETT, 2003; FAINE et al., 1999).

O MAT permite presumir o sorogrupo infectante responsável pela infecção, a partir do sorogrupo que apresentou o máximo título (LEVETT 2003; KUSUM et al., 2005), porém esta metodologia apresenta algumas limitações como mostra a **Tabela 3** (CRODA et al., 2007; WHO 2003; FAINE et al., 1999).

O MAT é uma exame difícil para controle e realização e de difícil interpretação, devido ao alto grau de reação cruzada que ocorre entre os diferentes sorogrupos, especificamente em amostras de fase aguda (AHMAD et al., 2005).

1.4.3 Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)

O ELISA é uma ferramenta de diagnóstico útil na vigilância da leptospirose urbana. O ELISA é menos complexo e mais sensível do que o MAT na fase inicial da doença, apesar de ser menos específico em decorrência da persistência de anticorpos IgM anti leptospira por muitos meses após recuperação da leptospirose (MCBRIDE et al., 2007; AHMAD et al., 2005; WAGENAAR et al., 2004).

Em comparação com o MAT, a sensibilidade do ELISA IgM na amostra aguda, em especial com mais de sete dias geralmente é alta, podendo variar de 40% a 70%, enquanto na amostra convalescente pode alcançar > 94% (BAJANI et al., 2003; SMITS et al., 2001).

Em um estudo realizado pelo grupo de pesquisa em leptospirose do CPqGM, foi validado o ELISA IgM com antígeno bruto de *Leptospira Interrogans* (sorovar Copenhageni), demonstrando uma sensibilidade de 54% para pacientes de fase aguda com menos de sete dias de sintomas, enquanto o MAT apresentou uma sensibilidade de 46%. Em pacientes com mais de sete dias de sintomas a sensibilidade do ELISA aumentou para 79,2% (MCBRIDE et al., 2007).

1.4.4 Teste Rápido DPP (*Dual Path Plataform*)

A utilização do teste rápido no diagnóstico das doenças infecto parasitárias é muito importante para uma intervenção terapêutica específica na fase inicial da doença. O grupo de pesquisa em leptospirose do CPqGM desenvolveu um teste rápido através de uma parceria entre a FIOCRUZ e as Universidades Americanas: Cornell, Berkeley, UCLA, e com a empresa Chembio e mais recentemente com a Universidade de Yale. Este teste possui concentrações elevadas de proteínas recombinante rLig, as quais são marcadores fundamentais no diagnóstico sorológico da leptospirose na fase aguda.

Este novo método de diagnóstico, apesar de dar uma resposta rápida, em apenas 15 minutos, ainda apresenta uma sensibilidade baixa quando a amostra é coletada com menos de sete dias de sintomas. Em um estudo realizado em Salvador com amostras de pacientes com leptospirose grave e leve o DPP apresentou uma sensibilidade de 77% e 60% respectivamente. Porém o mesmo apresenta uma boa sensibilidade com amostras convalescentes sendo 98% para leptospirose grave e 50% para leptospirose leve (NABITY et al., 2012).

Tabela 3 – Limitações dos testes sorológicos MAT e ELISA.

TESTES	LIMITAÇÕES
MAT	<p>Sensibilidade baixa na fase inicial</p> <p>Necessidade de amostras pareadas</p> <p>Necessidade de ser realizada em laboratório de referencia com técnicos bem treinados</p> <p>Necessidade de painel de Leptospiras vivas</p> <p>Necessidade de isolado do suposto local onde está ocorrendo a infecção</p>
ELISA	<p>Apresenta reação cruzada com outras doenças</p> <p>Não identifica o sorovar responsável pela infecção</p>

Fonte: Adaptada por Croda et al., 2007; WHO 2003; FAINE et al., 1999

4.5. PCR (*Polymerase chain reaction*)

A técnica de PCR apesar de ter seu uso restrito a área de pesquisa ou de laboratório de referencia, ela é extremamente útil no diagnóstico inicial da doença, pois detecta microrganismos na fase inicial devido a sua alta sensibilidade e especificidade (BROWN et al., 1995; OOTEMAN et al., 2006; POST, 2000; LOUIE et al., 2000; CHU, et al., 1998; HEINEMANN et al., 2000; VINETZ, 2001; WILSON et al., 2002). Atualmente a PCR é utilizada para detectar inúmeros micro-organismos dentre eles leptospiros patogênicos encontradas no sangue do paciente durante os primeiros 5 a 10 dias de sintomas (AHMED et al., 2009).

Vários pares de *primers* iniciadores de PCR para a detecção de *Leptospira* tem sido descritos, alguns baseados em genes alvos específicos (genes rRNA), elementos repetitivos, ou sequências derivadas a partir de bibliotecas genômicas (AHMAD et al., 2005; LEVETT, 2001).

Uma nova técnica de PCR tem sido desenvolvida, que é o PCR em tempo real (Real Time PCR), mais conhecido como qPCR. Esta é uma ferramenta rápida e sensível na detecção de leptospiros, a qual envolve o uso de marcadores que intercalam a dupla fita de DNA, como o SYBR Green I, ou o uso de sondas fluorescente como taqman ou fluorescence resonance energy transfer (FRET) para emitir um comprimento de onda de tamanho específico para detecção (AHMED, et al., 2009; SLACK et al., 2007). O qPCR reduz os riscos de resultados falso-positivos ocorridos por ampliações inespecíficas, além de permitir determinar a quantidade do gene alvo e com isso a quantificação da carga bacteriana (AHMED et al., 2009; SMYTHE et al., 2002).

1.4.6 Caracterização dos isolados de *Leptospiras*

Caracterizar isolado de *Leptospira* de material clínico é importante para identificar a provável fonte de infecção, considerando que diferentes sorovares podem apresentar diferentes hospedeiros específicos. Além disso distinguem casos esporádicos de possíveis surtos (FAINE, 1982; AHMED et al., 2010).

A caracterização de isolado de *Leptospira* a nível de soro-agrupagem é realizada através da técnica de aglutinação microscópica utilizando anticorpos policlonais produzidos em coelho. Essa caracterização a nível de sorovar é realizada da mesma maneira, porém utilizando anticorpos monoclonais. O procedimento é complexo e só pode ser realizado por laboratórios que possuam o painel completo de anticorpos necessário (FAINE et al., 1999). Esta é a razão pela qual várias técnicas moleculares tem sido introduzida como alternativa para complementar ou substituir os métodos sorológicos (AHMED et al., 2010). As técnicas complementares mais utilizadas são: eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (HERRMANN et al., 1992), polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (ZUERNER et al., 1993), análises de hibridização DNA-DNA (YASUDA et al., 1987; RAMADASS et al., 1992; BRENNER et al., 1999).

2 JUSTIFICATIVA

A caracterização do agente etiológico causador da leptospirose em uma determinada população é essencial para a identificação do reservatório responsável pela disseminação de *Leptospira* no ambiente, de modo a racionalizar as medidas de controle. Estudos comparativos entre resultados de soro-agrupagem de isolado de *Leptospira* e sorogrupo detectado no MAT do paciente o qual foi isolado a *Leptospira* tem sido pouco descrito na literatura. A fim de caracterizar os sorogrupos infectantes para todos os casos confirmados por isolamento de cultura durante 17 anos de Vigilância, nós soro-agrupamos a maior parte dos isolados e confrontamos com os resultados do MAT para verificar se existe concordância no sorogrupo encontrado na hemocultura e no MAT, e avaliar o percentual de concordância entre estes dois métodos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se existe concordância entre resultados de dois testes padrão - ouro (MAT e Hemocultura) na caracterização dos sorogrupos de *Leptospira* nos casos de leptospirose humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar o sorogrupo de *Leptospiras* isoladas das hemoculturas de pacientes admitidos no Hospital Couto Maia com leptospirose.

3.2.2 Determinar através do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) o provável sorogrupo responsável pela infecção nos pacientes admitidos no HCM.

3.2.3 Verificar se existe concordância entre os resultados dos isolados de hemocultura e resultados do MAT quanto ao sorogrupo.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO ESTUDO, COLETA DE INFORMAÇÕES E DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O local do estudo foi em Salvador, uma cidade com uma população estimada de 2.902.927 habitantes (IBGE, 2014). Neste estudo foram incluídas amostras coletadas de pacientes atendidos e internados no Hospital Couto Maia, que é uma unidade de referência para doenças infecciosas na Bahia, responsável pela notificação de mais de 95% dos casos de leptospirose em Salvador (KO et al., 1999; GOUVEIA et al., 2008).

Os casos suspeitos de leptospirose foram identificados por um estudante da área de saúde, responsável por realizar a vigilância de segunda a sexta-feira em horário comercial. Os critérios utilizados para casos suspeitos são os mesmos utilizados pelo Ministério da Saúde: febre com menos de 15 dias, cefaleia e mialgia associado a: exposição epidemiológica de risco para infecção por leptospira, icterícia, insuficiência renal aguda, ou sangramentos.

Após identificar os pacientes, foi esclarecido o estudo e o paciente foi convidado a participar do projeto. Os pacientes que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento, e em seguida nós realizamos a coleta de sangue total para realização do MAT e hemocultura, e sangue com EDTA para realização do qPCR. Posteriormente os pacientes foram entrevistados para coletarmos informações sobre dados epidemiológicos e exposição a fatores de risco. Além disso, foi realizada a revisão dos prontuários para coleta de dados clínicos e laboratoriais.

Como parte do protocolo para os casos suspeitos de leptospirose, a equipe de vigilância coleta amostras de sangue dos pacientes em três momentos: na admissão hospitalar, 2 a 5 dias após a admissão, e uma terceira amostra é coletada entre 14 a 56 dias da admissão. Nas situações em que o paciente tem alta hospitalar antes da terceira amostra ser coletada, uma equipe da vigilância é enviada ao domicílio do paciente para realizar a coleta, buscar informações sobre dados demográficos, evolução clínica e exposição a fatores de risco.

Estes procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética (parecer final nº 230/2010).

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E CONFIRMAÇÃO LABORATORIAL

Após a coleta de sangue, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) da FIOCRUZ, em caixa refrigerada com gelox, apropriada para transporte de material biológico. As amostras coletadas em EDTA foram distribuídas em alíquotas de 250 µL e armazenadas em freezer -70°C para posterior realização do qPCR, enquanto as amostras coletadas em tubo seco foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para separação do soro. Alíquotas de 250 µL foram estocadas em freezers -20°C até a realização do MAT.

As hemoculturas foram realizadas a partir da semeadura de duas gotas de sangue total em 2 tubos com meio de cultura líquido Ellinghausen, MacCullough, Johnson & Harris (EMJH) e 1 um tubo com meio semi-sólido EMJH. Os tubos foram mantidos em estufa de CO₂ nas temperaturas entre 28°C a 30°C e examinados semanalmente por 3 meses em microscópio de campo escuro para observar crescimento de leptospiros

4.2.1 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)

Os soros de cada paciente coletados nas 3 fases (aguda precoce, aguda tardia e convalescente) foram testados com uma bateria de 9 sorovares: Copenhageni cepa Fiocruz L1 130 (cepa isolada localmente no ano de 1996), Canicola cepa H. Utrecht, Copenhageni cepa M20, Patoc cepa patoc1, Autumnalis cepa Akiyami A, Ballum cepa MUS 127, Grippothyphosa cepa Duyster, Shermani cepa 1342 k, Cynopteri cepa 3522C, e Tarassovi cepa Perepelistin. Essa bateria foi selecionada com base em estudos prévios realizados na cidade de Salvador, onde foi testada uma bateria estendida de 25 sorovares, e a partir daí foi possível selecionar a bateria reduzida utilizada neste trabalho, a qual representa 98% das reações de aglutinação positivas (KO et al., 1999).

Devido ao fato da Patoc aglutinar em mais de 50% dos casos de leptospirose, os casos confirmados ou prováveis por Patoc, foram testados por uma outra bateria composta por mais 20 sorovares: Bratislava cepa Jez Bratislava,

Castellonis cepa Castellon 3, Bataviae cepa Van Tienen, Celledoni cepa Celledoni, Cynopteri cepa 3522C, Djasiman cepa Djasiman, Hebdomadis cepa Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae cepa RGA, Coxi cepa Cox, Louisiana cepa LSU 1945, Panamá cepa CZ 214K, Pomona cepa Pomona, Pyrogenes cepa Salinem, Hardjo cepa Hardjoprajitno, Wolffi cepa 3705, Shermani cepa 1342 K, Tarassovi cepa Perepelicin, Canalzonae cepa CZ 188, Mini cepa Sari, e o isolado VIGI 4135 (Isolado de Salvador do sorogrupo Shermani).

Para realização do teste de MAT, os soros foram diluídos em PBS 1X a uma diluição inicial de 1:50 e em seguida foram distribuído um volume de 50 µl em microplacas de poliestireno, uma microplaca para cada antígeno, num total de 11 microplacas. Os antígenos utilizados estavam com cerca de 4 a 7 dias de crescimento e livres de auto-aglutinação ou contaminação. Essas culturas foram diluídas em PBS 1X a 1:4 e avaliadas quanto a sua concentração adequada de cultura-PBS, na qual as leptospiras ficam livres, sem aspecto de massa esbranquiçada, e sem sobrepor uma a outra. Para cada microplaca foi adicionada o mesmo volume de antígeno, portanto a diluição final do soro foi de 1:100.

As placas foram incubadas por 1h 30min a uma temperatura de 28° a 30° C e em seguida foi realizada a leitura em um microscópio de campo escuro.

Os soros que apresentaram uma aglutinação >50% das leptospiras para o título de 1:100 foram testados com diluição seriada de duas vezes para obtenção do máximo título.

Os resultados foram classificados em: confirmados, não confirmados e prováveis, seguindo os seguintes critérios:

- ✓ Confirmados: Pacientes que tiveram título $\geq 1:800$ em pelo menos uma amostra de soro, aumento de 4 vezes no título entre as amostras pareadas, e soroconversão de 0 para título $\geq 1:200$ entre as amostras pareadas.
- ✓ Não confirmados: Pacientes que não apresentaram título em nenhuma das amostras.
- ✓ Prováveis: Pacientes que apresentaram título único de 1:200 ou 1:400.

O sorogrupo presuntivo foi aquele que apresentou o maior título no MAT.

Para realização do teste os soros foram descongelados apenas uma vez.

4.2.2 Isolamento de Leptospiras nas hemoculturas

Durante o processo de isolamento as hemoculturas foram acompanhadas por 3 meses, e em caso de ter ocorrido o crescimento de Leptospiras, as mesmas foram cultivadas em meio EMJH e congeladas em meio EMJH com DMSO, em freezer -70°C para posteriormente serem soro-agrupadas. Essas Leptospiras foram identificadas de acordo com o número do paciente para a qual a bactéria foi isolada.

4.2.3 Soro-agrupagem para caracterização dos isolados de leptospiras

Um vez por ano os isolados obtidos no respectivo ano são descongelados e mantidos em meio líquido EMJH, até obter um crescimento de 10^5 a 10^7 células/ml para serem caracterizados quanto ao sorogrupo.

A caracterização dos isolados se deu por método sorológico de microaglutinação (reação do isolado com anticorpos policlonais) utilizando soros de coelho para os seguintes sorogrupos: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Ballum, Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Cynopteri, Djasman, Grippothyphosa, Hebdomadis, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani, Tarassovi, Mini, Louisiana. Foi considerado o sorogrupo prevalente aquele que apresentou o maior título de aglutinação.

4.2.4 Real time - qPCR

Foi realizada a extração de DNA utilizando o kit de extração da Quiagen (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook). Um volume de 200 µl de sangue total foi adicionado a 200 µl de tampão de eluição para lise das amostras, em seguida foi incubado a uma temperatura de 56° C por 10 minutos. Após o período de incubação todas as etapas seguintes foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Para a amplificação do DNA foi utilizado iniciadores específicos a fim de amplificar um fragmento do gene *rrs* 16S do genoma de *Leptospira* spp. (MERIEN et al., 1992). Para a reação de amplificação parcial do gene *rrs* 16S

foram utilizados os “primers forward” (LipL32-45F) e “reverse” (LipL32-286R) (FAM-Lip L32-189P-BHQ1) (STODDARD et al., 2009).

A reação mix foi realizada em um tubo estéril de 1,5 ml onde foram adicionados os seguintes itens: 12.5 µl de Super Mix Invitrogen, 4.5 µl H₂O ultra pura, 1.25µl Primer For (10µM), 1.25 µl Primer Rev (10µM), e 0.5 µl LipL32-189 Probe (5µM). O mix foi distribuído em placas Ópticas MicroAmp (Applied Biosystems Catalogo nº 4344906). Para cada poço foi adicionado 20 µl da reação e 5 µl de DNA extraído. As placas foram seladas com adesivo apropriado para a placa MicroAmp e conduzida ao termociclador. As amostras foram testadas em duplicata e para cada placa foi realizada a curva padrão em duplicata e cada coluna tinha um controle negativo do template (NTC), com 5 µl de água ultrapura.

Para a reação de qPCR foi utilizado um termociclador ABI 7500. O primeiro ciclo de amplificação consistiu da desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguindo para o anelamento e extensão que ocorreram em 40 ciclos a 95° C por 3 segundos e a 60°C por 30 segundos.

5 ANALISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas utilizando o programa Epi Info para Windows v3.5.1 e GraphPad Prism 6. Foi utilizado o programa Red Cap para armazenamento das informações coletadas dos pacientes e resultados laboratoriais. As figuras e tabelas foram realizados no programa GraphPad Prism 6.

6 RESULTADOS

Durante o período de março de 1996 a dezembro de 2013, foram recrutados 4612 pacientes. Destes um total de 1853 (40,1%) dos pacientes foram confirmados para leptospirose por pelo menos um dos testes utilizados (MAT, hemocultura, qPCR), 2011 (43,6%) dos pacientes não foram confirmados em nenhum dos testes, e 87(2%) foram considerados prováveis. Um total de 661(14%) dos pacientes não foram testados para nenhum dos testes citados acima, devido a indisponibilidade de amostras. A maioria dos casos 3518/4612 (76%) eram adultos do sexo masculino, com uma média de idade 33 anos. Os pacientes tinham uma mediana de seis dias de sintomas no momento do internamento.

Casos por Ano: A média de casos confirmados foi de 112.2 ± 26.9 (IQR 91.8-130.0) pacientes por ano, sendo 1996 o ano que apresentou o maior número de casos confirmados e 2012 o menor número (161 e 67 respectivamente)

Figura 3.

Casos Confirmados no MAT e critérios de confirmação: Ao analisar todos os casos confirmados (1853), um total de 1759 (95%) foram confirmados no MAT, a maioria desses confirmados tinham amostra pareada 1427 (81%) e 332 (19%) tinham apenas amostra única. Como mostra na **Tabela 4**, de todos os pacientes que tinham amostra pareada (2333) um total de 697 (30%) destas foram confirmados pelos critérios: quatro vezes no aumento do título e título $\geq 1:800$, e 403 (17%) foram confirmados por: soroconversão e título $\geq 1:800$. Dos 1759 casos confirmados no MAT, 143 (8%) foram confirmados na cultura, 452 (26%) foram cultura negativa e 1163 (66%) não tiveram hemocultura coletadas devido a problemas técnicos.

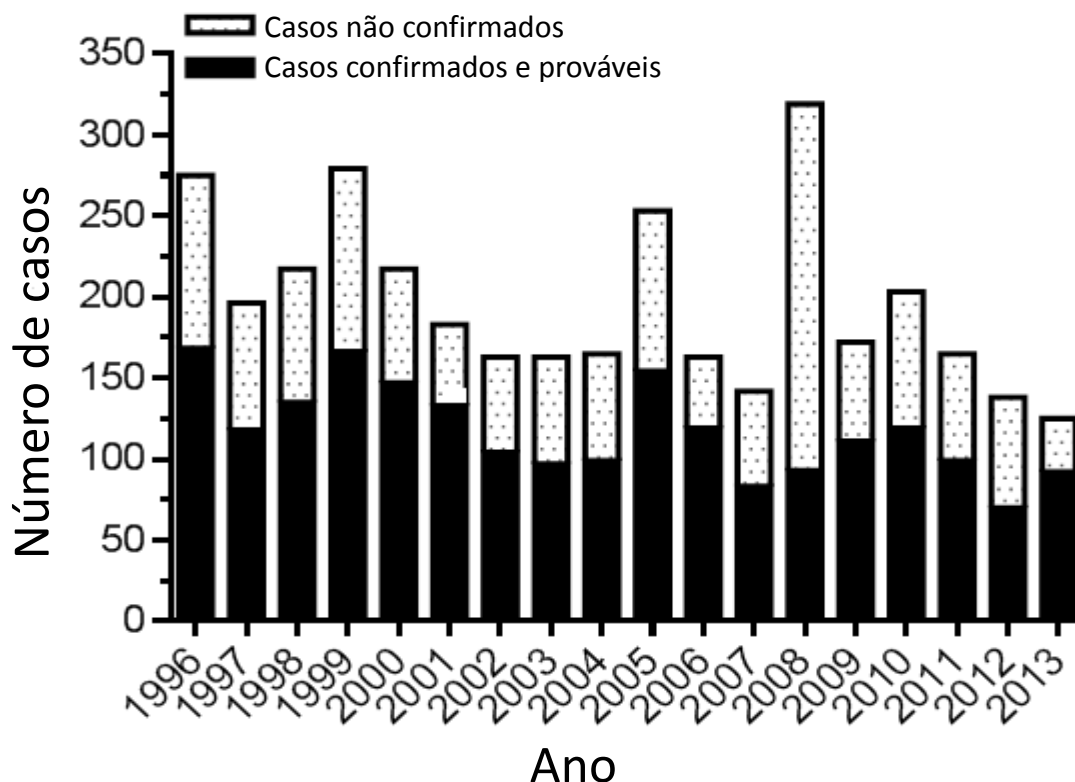


Figura 3: Distribuição dos casos confirmados, não confirmados e prováveis para leptospirose em Salvador-BA de 1996 a 2013.

Sorogrupo Prevalente no MAT: Resultados falsos negativo podem ocorrer no MAT se o paciente é infectado com um sorogrupo que não seja representado na bateria de cepas utilizadas como antígeno. A comparação dos resultados do teste sorológico com resultados da soro-agrupagem de isolado é de fundamental importância para saber se existe algum sorogrupo na região que não está sendo identificado no MAT devido a sua ausência no painel de cepas, tendo em vista que a identificação definitiva do agente infectante requer cultura positiva e subsequente identificação do agente etiológico. Na ausência de cultura positiva, os sorogrupos encontrados no MAT devem ser considerados presuntivos e não definitivos. Ao analisar a **Tabela 5** nota-se que durante o estudo o principal sorogrupo infectante identificado no MAT foi *Icterohaemorrhagiae*, representando 95% dos 1996 casos confirmados e prováveis, entretanto não é descartada a possibilidade de existir outros

sorogrupos, considerando que foi identificado outros seis sorogrupos em 109 (6%) dos casos confirmados ou prováveis.

Sorogrupo prevalente nos isolados das Culturas: Em 17 anos de estudo foi possível coletar material para hemoculturas de 1133 pacientes, sendo que por razões técnicas não foi possível realizar hemocultura no período de 1999 a 2005. Dos 1133 pacientes coletados, 203 (18%) tiveram culturas positivas, 894 (79%) negativas, seis contaminadas, e em 30 (2,6%) não foi possível concluir o resultado devido a problemas técnicos. Dentre as 203 culturas positivas foi possível isolar 93 (46%), as quais foram soro-agrupadas com soros heterólogos de coelhos, sendo o sorogrupo mais prevalente o *Icterohaemorrhagiae* em 89 (95%) dos isolados. A concordância entre sorogrupo encontrado no MAT e sorogrupo encontrado na soro-agrupagem com soros heterólogos de coelho foi de 80% $\kappa = 0,1511$ ($n=74$) $p=0,00$. Foram identificados quatro isolados que não foram *Icterohaemorrhagiae*, sendo dois deles *Shermani*, um isolado *Canicola* e um isolado *Hebdomadis*. Dentre os 76 pacientes com culturas positivas soro-agrupadas e com resultado sorológico positivo no MAT, 75 (98%) $\kappa = 0,6607$, $p=0,00$, tiveram o sorogrupo concordante, **Tabela 6**.

Casos de Leptospirose Prováveis no MAT e Confirmados na cultura ou qPCR: Um total de 237 pacientes tiveram diagnóstico provável no MAT. Destes 6 (3%) foram confirmados na cultura e 3 (1%) foram positivos no qPCR, sendo que o qPCR só começou a ser realizado a partir do ano de 2008. Além disso, um grupo de 40 pacientes foram confirmados só pela detecção de DNA de *Leptospira* no qPCR, e negativo nos demais testes. Dos que foram positivos apenas no qPCR 14(35%) deles tinham apenas a amostra aguda precoce, o que talvez possa justificar a ausência de confirmação no MAT, para este grupo. Um outro grupo de 51 pacientes foram confirmados só pelo isolamento da hemocultura, e não foram confirmados no MAT, porém 47(92%) deles só tinha coleta do soro agudo precoce, o que poderia justificar a não confirmação no MAT. Destes 51 pacientes apenas 7(13%) deles foi realizado o qPCR, e 6(12%) foram positivos. Não foi possível realizar os testes para 666 pacientes devido a indisponibilidade de amostra, **Tabela 7**.

O valor preditivo para definição de casos positivos ou prováveis da vigilância foi de 62% para amostra pareadas, determinado pelo MAT.

A sensibilidade do MAT foi diferente entre as amostras aguda e convalescente, sendo 60% na fase aguda e 97% na fase convalescente. A maioria dos casos 137 (100%) que eram negativos ao avaliar apenas a amostra aguda, 131 (96%) apresentaram soroconversão, se tornando casos positivos quando testados com a amostra convalescente, reforçando assim a importância da amostra convalescente para confirmação de casos **Tabela 8.**

Tabela 4 - Confirmação sorológica dos casos de leptospirose pelo MAT, utilizando amostras pareadas e amostra única de fase aguda e fase convalescente, distribuídas de acordo com os critérios de confirmação utilizados no MAT (1996-2013).

Status sorológico (MAT)	Número de casos			
	Amostras pareadas (n=2333)	Amostra única- fase aguda (n=1524)	Amostra única- fase convalescente (n= 88)	Total ^a (n= 4612)
Confirmado				
Total	1427 (61%)	287 (19%)	45 (51%)	1759 (38%)
4x aumento de título e título único \geq 1:800	697 (30%)	697 (15%)
Apenas 4x no aumento do título	4 (0.2%)	4 (0.08%)
4x aumento de título e soroconversão	2 (0.1%)	403 (9%)
Soroconversão e título único \geq 1:800	403 (17%)	2 (0.04%)
Soroconversão	94 (4%)	94 (2%)
Título único $>$ 1:800	227 (10%)	287 (19%)	45 (51%)	559 (12%)
Provável	38 (1.6%)	179 (12%)	20 (23%)	237 (5%)
Não confirmado	868 (37%)	1059 (69%)	23 (26%)	1950 (42%)

^a MAT resultados não foram obtidos para 666 (14%) pacientes devido a falta de amostra.

Tabela 5 - Provável sorogrupo infectante dos casos confirmados e prováveis pelo MAT em Salvador (1996-2013).

Sorogrupo infectante presuntivo	Número de casos confirmados e prováveis (%) ^{a,b} n=1996 (100%)
Icterohaemorrhagiae ^c	1887 (95)
Autumnalis	43 (2.2)
Ballum	2 (0.1)
Canicola	30 (1.9)
Grippothyposa	13 (0.6)
Cynopteri	20 (1.0)
Shermani	1 (0.05)

^a Resultados do MAT não foram obtidos para 666 pacientes devido a falta de coleta de soro

^b MAT foi negativo para 1854 pacientes adicionais

^c 88 (5%) casos de Icterohaemorrhagiae tiveram reação mista com outra cepa

Tabela 6 - Sorogrupo presuntivo no MAT x Sorogrupo de isolados de cultura em Salvador (1996 - 2013).

Sorogrupo infectante presuntivo (MAT+)	<u>Sorogrupo infectante na cultura confirmada^a</u>				Sorogrupo não determinado	Total culturas positivas
	Icterohaemorrhagiae	Canicola	Shermani	Hebdomadis		
Icterohaemorrhagiae	73	0	1	0	59	133
Canicola	0	0	0	0	2	2
Autumnalis	0	0	0	0	5	5
Cynopteri	0	0	0	0	2	2
Shermani	0	0	1	0	0	0
Misto ^b	1	0	0	0	4	5
MAT negativo	15 ^c	1	0	1	36	54
Total	89	1	2	1	108	201

^a 2 culturas não foram testadas para sorogrupo ou MAT

^b Todas as reações mistas incluem Icterohaemorrhagiae

^c Não foi coletada a amostra convalescente

Tabela 7 - Comparação entre os casos confirmados, não confirmados e prováveis no MAT e na cultura (1996-2013).

Status Sorológico (MAT)	Numero de Casos testados	Cultura Confirmada (%)	Cultura Não confirmada (%)	Cultura Não testada (%)
Confirmado	1759	143 (70)	452 (50)	1163 (34)
Provável	237	6 (3)	30 (4)	201 (6)
Não confirmado	1950	51 (25)	405 (45)	1494 (42)
Não testado	666	3 (2)	7 (1)	656 (18)
Total	4612	203(100)	894(100)	3515 (100)

Tabela 8 - Sorogrupos confirmados e presuntivos para casos de leptospirose em Salvador, estratificados por fase aguda e convalescente.

Sorogrupo infectante presuntivo (MAT+)	<u>Sorogrupo infectante-Cultura confirmada^b</u>				Sorogrupo não determinado	Total culturas positivas
	Icterohaemorrhagiae	Canicola	Shermani	Hebdomadis		
Aguda						
Icterohaemorrhagiae	17	0	1	0	20	38
Canicola	1	0	0	0	0	1
Autumnalis	0	0	0	0	1	1
Cynopteri	0	0	0	0	1	1
Misto ^a	14	0	0	0	5	19
MAT negativo	57	1	0	1	78	137
MAT sem resultado	0	0	1	0	5	5
Total	89	1	1	1	110	203
Convalescente						
Icterohaemorrhagiae	42	0	1	0	41	84
Canicola	0	0	0	0	2	2
Autumnalis	0	0	0	0	4	4
Cynopteri	0	0	0	0	2	2
Shermani	0	0	1	0	0	1
Misto ^a	21	0	0	0	9	30
MAT negativo	0	1	0	1	4	6
MAT sem resultado	26	0	0	0	48	74
Total	89	1	1	1	110	203

^aTodas as reações mistas incluem Icterohaemorrhagiae / ^b 6 cultura positiva faltam informações do sorotipo para cultura e MAT, resultados foram excluídos

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As principais limitações do estudo foram: indisponibilidade de algumas amostras para realização do MAT, falta de coleta de hemocultura em um determinado período devido a problemas técnicos no laboratório, e não realização de resultados de qPCR para a maioria dos pacientes, pois devido ao fato de ser uma tecnologia moderna, antigamente não se conservava alíquotas de sangue total para esse teste. Ainda assim tivemos um número suficiente de amostras para fazer as análises e chegar as conclusões.

8 DISCUSSÃO

Os achados de concordância entre sorogrupos encontrado nos dois testes (MAT e Hemocultura), são semelhantes aos encontrados no Havaí, o qual apresentou uma concordância de 81% entre os dois métodos (KATZ et al., 2003).

Diante dos resultados encontrados, foi possível observar que o sorogrupo prevalente em Salvador-Ba continua sendo *Icterohaemorrhagiae* em 90% dos casos confirmados e prováveis no MAT e em 95% dos isolados sorogrupados. Este sorogrupo já era prevalente há 17 anos, quando Ko et al., realizou um estudo em Salvador em 1996 e demonstrou que 90% dos casos confirmados pelo MAT pertenciam ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Esses achados estão de acordo também com os dados encontrados por Sakata et al., em um estudo realizado em São Paulo entre 1986 e 1989, quando demonstrou que 77,7% dos casos de leptospirose estavam associados com o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Esses dados indicam que o rato continua a ser o principal responsável pela disseminação das *Leptospiras* em Salvador.

9 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que um único sorovar de *Leptospira Interrogans*, tem sido responsável pela maioria dos casos de leptospirose notificados desde o início do nosso estudo em 1996. Esses dados sugerem que para Salvador, Brasil, teste de diagnóstico para sorovar Copenhageni do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, deverá ser efetivo na identificação dos 95% de todos os casos notificados. Entretanto, vale ressaltar que resultados de MAT negativo para Copenhageni não descarta definitivamente a possibilidade de ser um caso de leptospirose por outro sorovar.

Os resultados do nosso estudo irá contribuir para o Sistema de Vigilância e poderá auxiliar no desenvolvimento de teste sorodiagnóstico mais específico, especialmente para o desenvolvimento de teste rápido para leptospirose, agilizando o tratamento evitando a evolução da doença e conseqüentemente o desenvolvimento de desfechos graves.

REFERENCIAS

- ADLER, B. et al. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 34, p. 287-296, 2010.
- AGAMPODI, S. B. et al. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 9, p. 1249-1255, 2012.
- AHMAD, S. N. et al. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, p. 195-200, 2005.
- AHMED, A. et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7093, 2009.
- AHMED, A., et al. A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 955-962, 2010.
- AMILASAN, A. et al. Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 91-94, 2012.
- ARAÚJO, A. M. et al. Oxidative stress markers correlate with renal dysfunction and thrombocytopenia in severe leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 719-723, 2014.
- ATHANAZIO, D. A. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008.
- BABUDIARI, B. Animal reservoirs of leptospire. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 70, n. 3, p. 393-413, 1958.
- BAJANI, M. D. et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 803-809, 2003.
- BALASSIANO, I. T. et al. Aspectos clínicos de leptospirose anictérica em plantador de arroz na Região Sul do Brasil. **Revista de Saúde, Vassouras**, v. 2, n. 1, p. 61-66, 2011.

BARBOSA, A. S. et al. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.

BARCELLOS, C. et al. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 10, p. 301-313, 2000.

BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BONILLA-SANTIAGO, R.; Nally J. E. Rat model of chronic leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**, John Wiley & Sons, Inc, 2005.

BREINER, D. D. et al. Leptospira interrogans binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5528-5536, 2009.

BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 2, p. 839-858, 1999.

BROWN, P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 43, p. 110-114, 1995.

BULACH, D. M. et al. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 103, n. 39, p.14560-14565, 2006.

CHOY, H. A. et al. Physiological Osmotic Induction of Leptospira interrogans Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n .5, p. 2441-2450, 2007.

CHU, K. M. et al. Identification of Leptospira species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1314-132, 1998.

COLE JUNIOR, J. R. et al. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 976-980, 1973.

CORDEIRO, F. et al. *Leptospira Interrogans* in several wild-life species in southeast Brazil. Proj. Sanidade Animal, Embrapa/UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil, 1981. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 19-29.

CRODA, J. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

CULLEN, P. A. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4853-4863, 2005.

CUMBERLAND, P. et al. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 731-734, 1999.

DIAS, J.P. et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 499-504, 2007.

DUTTA, T. et al. Leptospirosis- An overview. **JAPI** v. 53, p. 545-551, 2005.

ELLIS, T. et al. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001–2002. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 8, p. 541-547, 2008.

EVANGELISTA, K. V. et al. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FAINE, S. Virulence in *Leptospira*. I: Reactions of guinea-pigs to experimental infections with *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 38, p. 1-7, 1957.

FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis World Health Organization. **Offset Publication**, v. 67. Geneva, 1982 .

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**, 1999.v. segunda edição 1999.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clinical infectious Diseases**, v. 21, p. 1-8, 1995.

FELZEMBURGH, R. et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *leptospira* agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2927, 2014.

FIGUEIRA, C. P. et al. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 129, 2011.

FLANNERY, B. et al. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 657-663, 2001.

GOUVEIA, E. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 505-508, 2008.

GONÇALVES, D. et al. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 135-140, 2006.

GRAVEKAMP, C. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 8, p. 1691-1700, 1993.

GWENN, R. et al. Live Imaging of bioluminescent *leptospira interrogans* in mice reveals renal colonization as a stealth escape from the blood defenses and antibiotics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 1371, 2014.

HAAKE, D. A. et al. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. e40-e43, 2002.

HAAKE, D. A. et al. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805-814, 2010.

HAGAN, J.E. et al. Global morbidity and mortality of Leptospirosis: a systematic review. **In: SCIENTIFIC MEETING OF THE INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY.** Fukuoka, Japan, 2013.

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 Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HERRMANN, J. L. et al. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1696-1702, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=292740>, 2014.

KAWAGUCHI, L. et al. Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 957-961, 2008.

KATZ, A. R. et al. Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii, 1979-1998. **Tropical Medicine International Health**, v. 8, n. 7, p. 639-642, 2003.

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

KO, A. I. et al. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Review Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KUPEK, E. et al. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil, 1991–1996. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 131-134, 2000.

KUSUM, M. et al. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in northeastern region, Thailand. **Journal Medical Association Thai**, v. 88, n.8, p. 1098-1102, 2005.

LESHEM, E. et al. Travel-related Leptospirosis in Israel: A Nationwide Study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n.3, p. 459-463, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

- LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 447-452, 2003.
- LI C. et al. Inactivation of a putative flagellar motor switch protein FliG1 prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity. **Molecular Microbiology**, v.75, p. 1563-1576, 2010.
- LIAO, S. et al. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 253, 2009.
- LOUIE M. et al. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. **CMAJ**, v. 163, p. 301-309, 2000.
- LOURDAULT, K. et al. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, n. 5, p. 648-655, 2009.
- LUX, R. et al. Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *Treponema denticola*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6276-6283, 2001.
- MACIEL, E. A. P. et al. High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. **Acta Tropica**, v. 100, n. 3, p. 256-260, 2006.
- MAROTTO, P. C. F. et al. Acute Lung Injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, Outcome, and Factors Associated with Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 1561-1563, 1999.
- MASKEY, M. et al. Leptospirosis in Mumbai: Post-deluge outbreak 2005. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 337-338, 2006.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.
- MCBRIDE, A. J. et al. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1245-1248, 2007.
- 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.

MERIEN, F. et al. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 281-285, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de leptospirose**. 2ed., Brasília, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia leptospirose: diagnóstico e manejo clínico**. Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.

MONAHAN, A. M. et al. Proteomic analysis of leptospira interrogans shed in urine of chronically infected hosts. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4952-4958, 2008.

MORGAN, J. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002.

MYERS, D. M. et al. The occurrence of leptospiral antibodies in rural inhabitants of Argentina. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 31, n. 2, p. 269-274, 1979.

NABITY, S. A. et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1878, 2012.

NÁJERA, S. et al. Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 240-244, 2005.

NALLY, J. E. et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a Guinea Pig model of severe pulmonary leptospirosis. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.

NICODEMO, A. C. et al. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am J Trop Med Hyg**. v. 56, p. 181-187, 1997.

OOTEMAN, M. C., et al. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Microbiological Methods**. v. 65, n. 2, p. 247-257, 2006.

PEREIRA, M. M. et al. A Clonal Subpopulation of *Leptospira interrogans* Sensu Stricto Is the Major Cause of Leptospirosis Outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 450-452, 2000.

PEREIRA, M. M. et al. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 13-20, 2005.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

PICARDEAU, M. et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2014.

POST, J. C. et al. The impact of the polymerase chain reaction in clinical medicine. **JAMA**, v. 283, p. 1544-1546, 2000.

RAMADASS, P. et al. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 215-219, 1992.

REIS, E. A. G. et al. Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. *PLoS neglected tropical diseases*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2457, 2013.

REIS, R. et al. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e228, 2008.

RITCHIE, A. E. et al. Electron Microscopy of *Leptospira*. Anatomical Features of *Leptospira Pomona*. **Journal of Bacteriology**, v. 89, p. 01, 1965.

REN, S.-X. et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

ROSEY, E. L. et al. Dual *flaA1 flaB1* mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4154-4162, 1996.

SANTOS, C. S. et al. Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1101-1106, 2010.

SECOMP. Secretaria de Combate à Pobreza e às Desigualdades Sociais: Mapeamento da Pobreza em áreas urbanas do Estado da Bahia. *CD-ROM* 2005.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. 2014.

SITPRIJA, V. et al. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. **Kidney International**, v. 17, n. 6, p. 827-836, 1980.

SLACK, A. et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 361-366, 2007.

SMITH, J. K. G. et al. Leptospirosis following a major flood in Central Queensland, Australia. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 03, p. 585-590, 2013.

SMITS, H. L. et al. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 166-169, 2001.

SMYTHE, L. et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp." **BMC Infectious Diseases**. v. 2, n. 1, p. 1-7, 2002.

SPICHLER, A. S. et al. Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n.6, p. 911-914, 2008.

STERN, E. J. et al. Outbreak of Leptospirosis among Adventure Race Participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 843-849, 2010.

STODDARD, R. A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

TAJIKI, M. H.; Salomão, R. Association of Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor α with Severity of Disease and Mortality Among Patients with Leptospirosis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1177-1178, 1996.

TANGKANAKUL, W. et al. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 3, p. 204-208, 2000.

TRUCOLLO, J. et al. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 317-321, 2001.

UN-HABITAT. United Nations Human Settlements Programme. **The Challenge of Slums. Global Report on Human Settlements 2003**. Nairobi, Kenya, 2003.

UN-HABITAT. United Nations Human Settlements Programme. State of the World's Cities 2010/2011. **Bridging the urban divide**. Nairobi, Kenya, 2010.

VALVERDE, M.L. et al. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 529-533, 2008.

VAN DEN INGH, T. S. G. A. M.; HARTMAN, E.G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae infection in the Syrian hamster. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 367-376, 1986.

VINETZ, J. W. Leptospirosis. [Current Opinion Infectious Diseases](#), v. 14, n. 5, p. 527-538, 2001.

WAGENAAR, J. F. et al. Rapid serological assays for leptospirosis are of limited value in southern Vietnam. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 98, p. 843-850, 2004.

WATT, G. et al. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late Leptospirosis. **The Lancet**, v. 331, n. 8583, p. 433-435, 1988.

WEIR, E. The challenge posed by leptospirosis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, n. 11, p. 1501, 2000.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, p. 346-352, 2001.

WILSON T. et al. Optimisation of one-tube to detect femtogram amounts of genomic DNA. **Journal of Microbiological Methods**, n. 51, p. 163-170, 2002.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: **Guidance for diagnosis, surveillance and control**, 2003.

WHO. World Health Organization. Leptospirosis an emerging public health problem. **Weekly Epidemiological Records**, v. 86, p. 45-52, 2011.

YANG, C. W. et al. Leptospirosis renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. 5, p. 73-77, 2001.

YASUDA, B.H. et al. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new Leptospira species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v 37, p. 407-415, 1987.

YERSIN, C. et al. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 71-76, 2000.

YURI, K. et al. Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 2270-2272, 1993.

ZUERNER, R. L. et al. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 578-583, 1993.