



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

LEPTOSPIROSE EPIDÊMICA EM SALVADOR, BAHIA:

**ESTUDO DE RESERVATÓRIOS E DESENVOLVIMENTO DO
TESTE DE REAÇÃO EM CADEIA DA ENZIMA POLIMERASE
(PCR) PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO**

MARCOS TUCUNDUVA DE FARIA

**Salvador - Bahia
2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - CPqGM
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

LEPTOSPIROSE EPIDÊMICA EM SALVADOR, BAHIA:

**ESTUDO DE RESERVATÓRIOS E DESENVOLVIMENTO DO
TESTE DE REAÇÃO EM CADEIA DA ENZIMA POLIMERASE
(PCR) PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO**

MARCOS TUCUNDUVA DE FARIA

Professor Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Patologia Humana, área de concentração Patologia Experimental.

Salvador - Bahia, 2000

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ – Salvador - Bahia

Faria, Marcos Tucunduva
F224l Leptospirose epidêmica em Salvador, Bahia: Estudo de reservatórios e desenvolvimento do teste de reação em cadeia da enzima polimerase (pcr) para a sua identificação / Marcos Tucunduva de Faria__Salvador: UFBA / CPqGM, 2000.
118 p.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, 2000.

1. Leptospirose. 2. Reservatórios. 3. PCR. 4. *Rattus norvegicus*. I.

Título.

CDU 616.986.7 (813.8)

11.001

GIG. 986.7 (813.8)
F224l

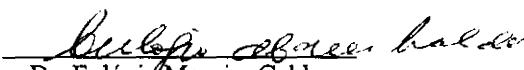
11.001

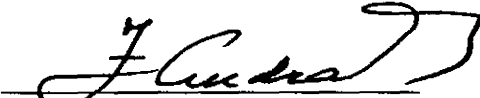
LEPTOSPIROSE EPIDÊMICA EM SALVADOR, BAHIA: Estudo de reservatórios e desenvolvimento do teste de reação em cadeia da enzima TAQ DNA polimerase (PCR) para a sua identificação.

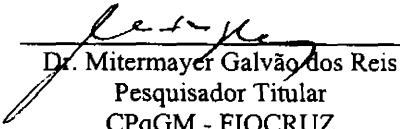
MARCOS TUCUNDUVA DE FARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Eulógio Moreira Caldas
Professor Titular
MEDVET - UFBA


Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ


Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

Esta tese é dedicada ao disco Metrô Linha 743 de Raul Seixas:

"...Ele ia andando pela rua meio apressado sem saber que estava sendo vigiado..."

"...Quem entra no buraco de rato de rato tem que transar..."

e ao ateísmo de José Saramago.

Agradecimentos:

Ao professor Albert Iksang Ko pela orientação ativa durante toda a elaboração da tese.

Ao professor Mitermayer Gaivão dos Reis pela orientação e pronta disposição para resolver todas as dúvidas surgidas durante o transcorrer do trabalho.

Ao professor Eduardo Ramos pelas orientações nas análises histopatológicas renais e pelas revisões realizadas no texto.

A coordenação de ensino e pós graduação e aos professores do curso de pós graduação.

As estudantes de medicina veterinária Roberta Silva, Daniele Laranjeiras e Sílvia Letícia Matos e ao estudante de biologia molecular Michael Calewood pelo auxílio nas capturas, necrópsias e realização dos testes de diagnóstico.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Salvador pela disponibilização de veículos, motoristas e direcionamento dos casos de leptospirose humana.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela disponibilização de materiais e toda a infra estrutura necessária para a realização do trabalho.

Ao professor Rui Cerqueira e Lena Geise da UFRJ pelo empréstimo das armadilhas.

SUMÁRIO

COMISSÃO EXAMINADORA -----	I
RESUMO -----	VII
ABSTRACT -----	VIII
1 <u>INTRODUÇÃO</u> -----	10
1.1 REVISÃO DA LITERATURA -----	14
1.1.1 A leptospirose e a leptospira -----	14
1.1.2 Epidemias no mundo -----	18
1.1.3 Epidemias urbanas no Brasil e em Salvador -----	20
1.1.4. Reservatórios -----	22
1.1.5 Métodos diagnósticos para a investigação de reservatórios -----	28
2 <u>OBJETIVOS</u> -----	37
3 <u>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</u> -----	38
4 <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u> -----	40
4.1 CAPTURAS -----	40
4.1.1 Locais de captura -----	40
4.1.2 Métodos de Captura e Transporte dos Animais -----	41
4.1.3 Identificação dos reservatórios e suas características -----	41
4.2 NECRÓPSIA -----	42
4.2.1 Anestesia -----	42
4.2.2 Coleta de amostras: sangue, urina e tecido renal -----	42
4.2.3 Estocagem das amostras -----	44
4.3 ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA -----	44
4.3.1 Preparo do meio de cultura -----	44
4.3.2 Inoculação do meio -----	45
4.3.3 Leitura de cultura -----	45
4.4 TESTE DE MAT -----	46
4.4.1 Preparação de antígeno vivo -----	48
4.4.2 Triagem e titulação das amostras de soro -----	47
4.5 SOROTIPAGEM -----	48

4.6	TESTE DE PCR	49
4.6.1	Limite de detecção	49
4.6.2	Processamento e extração do DNA das amostras de urina dos animais capturados	49
4.6.3	Reação de PCR	50
4.6.4	Visualização do produto de PCR	51
4.7	ANÁLISE DE DADOS	52
4.7.1	Reservatórios de leptospirose	52
4.7.2	Teste de MAT	52
4.7.3	Sorotipagem das amostras	53
4.7.4	Teste de PCR	53
5	<u>RESULTADOS</u>	55
5.1	CAPTURAS	55
5.2	TESTES DIAGNÓSTICOS	56
5.2.1	Isolamento em meio de cultura EMJH (IMC)	57
5.2.1.1	<u><i>R. norvegicus</i> testados ao IMC e sua relação ecológica</u>	59
5.2.2	Teste de microaglutinação (MAT)	62
5.2.2.1	<u>Comparação entre IMC e MAT</u>	64
5.2.3	Sorotipagem dos isolados e comparação dos reservatórios e casos humanos	65
5.2.4	Teste de PCR	65
6	<u>DISCUSSÃO</u>	71
7	CONCLUSÕES	91
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	92

ANEXOS

Anexo 1 - Tabela de anotações dos locais de captura-----	98
Anexo 2 - Tabela de anotações dos animais capturados-----	99
Anexo 3 - Tabela de anotações da anestesia nos animais-----	100
Anexo 4 - Tabela de anotações das necrópsias nos animais-----	101
Anexo 5 - Tabela de anotações do material coletado-----	102
Anexo 6 - Tabela de anotações das leituras realizadas do IMC-----	103
Anexo 7 - Tabela das leituras realizadas do MAT-----	104
Anexo 8- Questionário elaborado no programa de análise de dados EPIINFO 6,-----	105
Anexo 9- Tabela com os resultados dos testes de IMC, MAT e PCR em todos os animais-----	108
Anexo 10- Texto extraído do jornal A Tarde sobre leptospirose.-----	118

RESUMO

ESTUDO DA LEPTOSPIROSE EPIDÊMICA EM SALVADOR BAHIA: ESTUDO DOS ANIMAIS RESERVATÓRIOS E DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO. MARCOS TUCUNDUVA DE FARIA

[INTRODUÇÃO] Em Salvador a leptospirose é uma antropozoonose urbana com surtos epidêmicos. A sua letalidade pode chegar a 15%. Em todo o mundo os roedores peridomiciliares são considerados os principais reservatórios sinantrópicos de leptospirose e estão relacionados como aos fatores de risco associados a doença. Em Salvador não existem estudos recentes a respeito dos reservatórios de leptospirose. A partir da importância da doença e da falta de estudos recentes com reservatórios foi desenvolvido esse estudo. [OBJETIVOS] Capturar e determinar os reservatórios de leptospirose no município de Salvador. Determinar a prevalência da infecção por leptospirose nesses reservatórios através do teste de microaglutinação (MAT) e isolamento em meio de cultura EMJH (IMC). Caracterizar os sorogrupos de leptospirose nesses reservatórios e comparar com os sorogrupos dos casos humanos. Desenvolver um teste de diagnóstico rápido para leptospirose nos reservatórios através do teste de reação em cadeia da enzima DNA Taq polimerase (PCR). [MATERIAL E MÉTODOS] Foram utilizadas armadilhas (Tomahawk live traps, 20X20X60 cm, Tomahawk®) para a captura dos animais. Os testes de IMC e MAT foram realizados de acordo com os padrões da OMS. Nos testes de PCR foram utilizados 3 pares de "primers" de Mérien e Gravekamp. Os dados foram analisados em programa de análise de dados epidemiológicos EPI-INFO 6.2 e EXCELL. [RESULTADOS] Foram capturados 142 *Rattus norvegicus* e 8 *Didelphis marsupialis*. A positividade dos *R. norvegicus* ao IMC foi 80%, os *D. Marsupialis* foram todos negativos. Os *R. norvegicus* apresentaram 70% de positividade ao teste de MAT e os *D. Marsupialis* 85%. A comparação entre os testes de isolamento em meio de cultura e MAT demonstrou que 89% dos *R. norvegicus* apresentaram positividade a pelo menos um dos testes. Os testes dos resultados do PCR com o IMC (teste padrão ouro) demonstraram, respectivamente, sensibilidade e especificidade de 89% e 97% para o teste de PCR. [CONCLUSÕES] Os *R. norvegicus* são o principal reservatório de leptospirose em Salvador, Bahia. O sorogrupo mais prevalente nos *R. norvegicus* foi Icterohaemorrhagiae, sendo ainda o sorogrupo mais prevalente nos casos humanos atendidos no hospital Couto Maia.

Palavras chave: Leptospirose, Reservatórios, PCR, *Rattus norvegicus*.

ABSTRACT

[INTRODUCTION] In Salvador leptospirosis is an urban epidemic antropozoonosis with a lethality about 15%. In the entire world the peridomiciliar rodents are considered the main sinantropic reservoirs of leptospirosis and are related with the risk factors associated with the leptospirosis disease. This study was developed in a way to give more information to a point that in Salvador does not have recently studies. [OBJECTIVES] Capture and establish the leptospirosis reservoirs in Salvador. Establish the prevalence of leptospiras infection in these reservoirs using micro agglutination test (MAT) and Ellinghausen culture medium (EMJH). Characterise the sorogroups of leptospiras in animal reservoirs and compare with the human sorogroups. Develop a rapid diagnosis test for leptospirosis reservoirs using PCR test. Correlate the kidney morphologic alterations in the positives and negatives reservoirs for IMC and EMJH tests. [MATERIAL E MÉTODOS] The animals were captured using Tomahawk live traps, 20X20X60 cm, Tomahawk®. The EMJH and MAT tests were done according OMS standards. The PCR were made using three couples of primers. EMJH results of *R. norvegicus*, *D. marsupialis* and negative controls (Wistar laboratory rats and foxes, *Didelphis marsupialis*) were used to work out PCR sensibility and specificity. Results were availed using EPI-INFO 6.2 and EXCELL softwares. [RESULTS] One hundred and forty two *Rattus norvegicus* and 8 *Didelphis marsupialis* were captured. The *R. norvegicus* were 80% positive for EMJH tests; the *D. Marsupialis* were all negatives for EMJH tests. The *R. norvegicus* were 70% positives for MAT tests and the *D. marsupialis* were 85% positives for MAT tests. The *R. norvegicus* were 89% positives at least EMJH or MAT test. PCR test showed 89% of sensibility and 97% of specificity. [CONCLUSIONS] The *R. norvegicus* is the principal reservoir in Salvador, Bahia. The most prevalent sorogroup found in *R. norvegicus* was Icterohaemorrhagiae. It is the same principal sorogroup found in human cases from Couto Maia hospital. The PCR test showed high sensibility, specificity and predictive values being adequate to use to identify leptospirosis reservoirs.

Key Words: Leptospirosis, Reservoirs , PCR, *Rattus norvegicus*.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose que nos animais de produção ocasiona perdas econômicas, pois causa abortos, diminuição da produção de leite e despesas com vacinação e tratamentos veterinários. No homem é um grave problema de saúde pública, pois, além dos surtos esporádicos associados com ocupação, ocorrem epidemias que atingem os grandes centros urbanos, em diversas partes do mundo, ocasionando despesas médico-hospitalares. A enfermidade apresenta formas clínicas e subclínicas. As formas clínicas podem evoluir para a doença grave conhecida com síndrome de Weil, com sinais clínicos como icterícia, hemorragia, falência hepática e renal. Alguns trabalhos também relatam a morte por hemoptise seguida de falência respiratória aguda. Entre os pacientes que desenvolvem a forma clínica da doença, 15% evoluem para a forma grave e dos que desenvolvem a forma grave a letalidade varia de 5 a 40%. Os relatos e as observações científicas sugerem que as formas subclínicas da doença sejam muito comuns, no entanto, existem poucos trabalhos a respeito da incidência das formas subclínicas nas populações.

Os principais trabalhos que demonstram os aspectos epidemiológicos rurais e urbanos da doença foram realizados na Austrália, Itália, Espanha, Somália, Índia, Nova Caledônia, Cuba, Barbados, Hawaí e Brasil. As epidemias rurais têm caráter ocupacional, acometendo cortadores de cana e plantadores de arroz em aluvião. As epidemias urbanas acometem a população de baixa renda nos grandes centros urbanos de países onde as condições de saneamento básico são precárias. Outros tipos de epidemias ocupacionais, atualmente menos freqüentes, atingem mineradores, soldados e trabalhadores de serviços de saneamento básico. Ocorrem também alguns casos esporádicos devido a manipulação de carcaças de animais e contaminação de profissionais da área de saúde. Também são

relatados casos muito raros, como os observados em prisioneiros tentando escapar por túneis escavados por debaixo dos portões da prisão e o de uma pessoa que fez respiração boca a boca com leitões. As das epidemias urbanas são recentes e acompanharam o crescimento desordenado da população mundial nos grandes centros urbanos de países pobres. Problemas como falta de saneamento básico, falta de coleta adequada de lixo, proliferação de ratos, enchentes, altas temperatura e umidade relativa do ar elevada formam condições básicas para a ocorrência das epidemias urbanas. A cidade de Salvador preenche todas essas condições e está entre as cidades nas quais as epidemias urbanas são freqüentes e sazonais, acompanhando os altos índices de precipitação pluviométrica.

Os principais reservatórios de leptospirose humana no mundo são os roedores, os cães, os bovinos, os marsupiais e outros pequenos mamíferos. Os principais reservatórios urbanos de leptospirose humana são os ratos (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*) e os cães, sendo que as evidências relacionadas aos fatores de risco colocam os ratos como os principais reservatórios. Outros animais silvestres como répteis e anfíbios, até mesmo mamíferos aquáticos, como a foca, podem ser reservatórios de leptospirose, porém o seu papel para a transmissão da leptospirose humana ainda não foi estabelecido. Os bovinos, os pequenos ruminantes e os suínos atuam, principalmente, como reservatórios de leptospirose que se transmite de animal para animal, acarretando perdas econômicas nos animais de produção, como abortos e diminuição da produção de leite e carne (LEVETT *et al.*, 1995, DHALIWAL *et al.*, 1996, BRANKA *et al.*, 1997). Os animais domésticos que se comportam como reservatórios da leptospirose são aqueles que sobrevivem à doença clínica, já os animais silvestres, aparentemente não apresentam sinais clínicos da doença e podem conviver com o parasita por semanas, meses ou anos. Todos os reservatórios de leptospirose eliminam a

leptospira no ambiente através da urina. Em Salvador, os principais ratos encontrados e visualizados são os *R. norvegicus*. As precárias condições sanitárias de várias regiões da cidade, com lixo espalhado pelas ruas e muitos terrenos baldios, contribuem para a proliferação desses roedores, facilmente vistos à noite ou em alguns casos durante o dia, chegando a circular em quintais e até mesmo dentro das casas.

O principais métodos de diagnóstico da leptospirose estão relacionados com o isolamento do parasita e com a pesquisa de anticorpos específicos. O método mais comum de isolamento do parasita é o isolamento em meio de cultura (IMC) e o método mais comum de pesquisa de anticorpos é o teste de microaglutinação (MAT). Ambos os testes são considerados padrões ouro e são utilizados para o diagnóstico da leptospirose humana e de reservatórios de leptospirose. No entanto, esses testes apresentam algumas desvantagens, como a demora no diagnóstico, a laboriosidade e a não detecção da infecção ativa no caso do teste de MAT. Objetivando resolver esses e outros problemas o teste de reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) está sendo desenvolvido, em várias partes do mundo, para o diagnóstico da leptospirose humana e de reservatórios de leptospirose por ser mais rápido do que os outros testes e ter índices de sensibilidade e especificidade elevados.

A principal patogenia da leptospirose está relacionada às lesões ocasionadas na parede dos vasos da microcirculação, no entanto, fatores relacionados a toxicidade e a adesão de moléculas de superfície ainda estão pouco esclarecidos. O que se sabe é que a resposta imune humoral é um fator importante no curso da doença. No entanto, os principais fatores pelos quais os parasitas alojam-se em tecidos, bem como, os tipos de lesões provocadas e o mecanismo pelo qual elas são provocadas ainda não foram totalmente esclarecidos. No rim

de humanos existem lesões típicas, como a nefrite intersticial crônica e a necrose tubular aguda, lesões que também são freqüentes em animais inoculados experimentalmente e em animais domésticos (PEREIRA & ANDRADE, 1988). Os relatos de lesões renais em animais silvestres e sinantrópicos são muito raros e superficiais.

Devido aos fatos relacionados anteriormente, o presente estudo foi planejado para esclarecer quais são os reservatórios de leptospirose urbana no município de Salvador, qual a prevalência de leptospirose nesses reservatórios, através dos testes diagnósticos estabelecidos pela OMS (MAT e IMC), estabelecer um método de diagnóstico rápido para esses reservatórios através do PCR para a identificação de reservatórios através de um teste rápido. Os dados poderão contribuir para o entendimento do papel dos reservatórios em relação a doença epidêmica em Salvador e fornecer um diagnóstico rápido para os reservatórios que poderão auxiliar os Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) na identificação e combate dos principais reservatórios, diminuindo assim o custo em rodenticidas, manutenção de veículos e pessoal. Os estudos de identificação do sorovar contribuirão para a associação do parasita e do reservatório aos casos humanos, permitindo estabelecer uma relação dos fatores de risco. Os parasitas isolados e congelados permitirão estudos experimentais para o entendimento da patogênese da leptospirose.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 A leptospirose e a leptospira

Em 1886, na Alemanha, foi descrita a síndrome de Weil (WEIL, 1886), uma enfermidade, mais tarde designada por GOLDSCHIMITZ como “doença de Weil” caracterizada por icterícia, falência hepática e renal, miocardite, hemorragia e morte, sinais clínicos da forma grave de uma doença, posteriormente, denominada leptospirose. Em 1907 o patógeno foi identificado em cortes histológicos corados por impregnação em prata pela técnica de Levaditi (STIMSON, 1907). Em 1910, depois de uma epidemia da doença de Weil (nome dado a doença naquela época), o sangue de pacientes foram injetados em vários animais, e o macaco tornou-se doente, manifestando sinais atípicos (HECKER E OTO, 1911, FONTE: FAINE *et al.*, 1999). Em 1914, após epidemia em mineradores de carvão, INADA *et al.*, 1916 tiveram sucesso na infecção de hamsters através da inoculação de sangue dos pacientes. Nos anos seguintes os ratos foram identificados como carreadores da leptospira (IDO & WANI, 1916, MIYAJIMA, 1916, NOGUCHI., 1917, INADA *et al.*, 1917) dando início ao entendimento dos princípios epidemiológicos da doença. Durante a década de 20 a maioria dos conhecimentos básicos da leptospirose já tinha sido descoberta, como, a leptospirose anictérica, a imunização ativa, o estado de animais carreadores crônicos, a infecção em cães e a diferenciação do patógeno por diferentes padrões sorológicos (FAINE, 1999).

A leptospira é classificada em três gêneros distintos, o *Leptospira*, o *Leptonema* e o *Turneria* (FAINE & STALLMAN, 1982, HOVIND-HOUGEN, 1979, MARSHALL, 1992, FONTE: FAINE *et al.*, 1999). A classificação de gênero e espécies é realizada comparando-se fragmentos de

ácido desoxi-ribonucleico (DNA), mais usualmente hibridização de DNA/DNA. Atualmente, métodos mais rápidos com estratégias derivadas de PCR, como endonucleases de restrição no DNA amplificado ou provas de hibridização em DNA cromossômico estão sendo aprimoradas. Desse modo, as leptospiros podem ser agrupadas em gênero e espécie de acordo com as suas taxas de guanina (G) e citosina (C) no DNA. De acordo com os gêneros, o DNA cromossômico varia, de 35-41 mol % de G e C no gênero *Leptospira*, 51 a 54,2 mol % de G e C no gênero *Leptonema* e 47,7 a 48,7 mol % de G e C no gênero *Turneria*. O gênero *Leptospira* abriga as espécies de maior importância na doença leptospirose, possuindo 8 espécies patogênicas (*L. borgptersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. santarosai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. weilii*) e 4 espécies não patogênicas (*L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. biflexa* e *L. alexanderi*). Os outros gêneros são *Leptonema illini* e a *Turneria parva* que não são patogênicas.

A unidade taxonômica básica da leptospira é o sorovar que é agrupado em sorogrupos. As características antigênicas, obtidas pela técnica de aglutinação de antisoros homólogos de coelhos, definem os sorovares. A definição de sorovares requer que existam dois isolados e que cada um tenha sido inoculado e crescido em coelhos sob condições específicas. Um dos isolados é aceito como referência (sorovar da bateria de sorovares padrão) e o outro é o sorovar que será testado. Alíquotas de soro são retiradas e adsorvidas por sorovares homólogos e heterólogos. Os soros são testados pelos métodos padrões de MAT, caso os dois sorovares obtenham aglutinação cruzada aos mesmos antígenos com títulos residuais abaixo de 10% eles são iguais, em caso contrário são diferentes. É possível encontrar diferentes espécies com os mesmos sorovares como, por exemplo, o sorovar hardjo que pertence as espécies *L. interrogans*, *L. borgptersenii* e *L. meyeri*. A classificação e

determinação dos sorovares no estudo da leptospirose tem importância clínica e epidemiológica. Os sorovares podem ser associados com a gravidade da doença, têm relação com o hospedeiro e a sua distribuição geográfica, muitas vezes, é específica. De um modo geral, o sorovar hardjo está associado aos bovinos, o pomona aos porcos, bovinos e roedores e os sorovares icterohaemorrhagiae, copenhageni, bataviae, autumnalis, australis e javanica aos ratos e pequenos roedores (FAINE, 1999).

Todas as espécies de leptospiras têm forma helicoidal são móveis e aeróbicas. As dimensões são variáveis, variando entre 3,5 a 20 μm de comprimento e 0,3 a 0,5 μm de espessura, dependendo do sorovar. São envoltas por envelope externo composto de proteínas, lipídeos e lipopolissacarídeos (LPS). Aos LPS estão associados proteínas antigênicas e não antigênicas. Abaixo do envelope externo, separada por vários componentes, inclusive os flagelos, encontra-se a parede celular formada por um complexo de peptidoglicanos. As leptospiras têm dois flagelos, cada um partindo de uma inserção na extremidade através do complexo de peptidoglicanos, possuindo antígenos de superfície ligados aos mesmos. As temperaturas ideais para o crescimento das bactérias patogênicas e não patogênicas em meios de cultura variam de 28 a 30 °C, no entanto, algumas bactérias não patogênicas podem crescer em 11-13°C (JOHNSON & HARRIS, 1967). O pH de crescimento varia de 7,2 a 7,6. Em condições adequadas de umidade, pH e temperatura as leptospiras sobrevivem no ambiente, dependendo do sorovar podem resistir até 75 dias.

O homem é considerado o único portador acidental da leptospirose, com raras exceções, e a transmissão de homem para homem é muito rara. Os demais animais, domésticos, silvestres e sinantrópicos, assumem o papel de reservatórios da leptospirose. Tanto o homem, como

os animais podem adquirir a leptospirose por via direta ou indireta. As principais vias de transmissão direta são o sangue, a urina, os fluidos carreados para animais reservatórios, a via hematogena transplacentária, o contato sexual, e a amamentação (ELLIS *et al.*, 1985, 1986, 1991, FONTE: FAINE, 1999). As vias de transmissão indireta são o ambiente aquático ou úmido (lagos, rios, tanques, nascentes, lama, esgotos), aerossóis (leite de ordenhadeiras, secreções de animais) e, embora não esteja estabelecido o seu papel epidemiológico, artrópodos como carrapatos (HOEDEN, 1958) e pássaros, através de asas e pés molhados carregam a leptospira. A principal via de transmissão para o homem é a indireta, principalmente através do contato com lama e esgoto contaminados com urina de animais infectados.

Desde os primeiros anos da descoberta da Síndrome de Weil, os registros eram de uma doença ocupacional com surtos esporádicos (atingindo soldados, mineiros, plantadores de arroz, plantadores de cana, tratadores de animais, ordenhadores, açougueiros e veterinários) e casos esporádicos, como banhos em lagoas, manuseio de animais de estimação e de carcaça de animais abatidos. A partir de 1960, devido a modificação de condições ambientais, como ocupações humanas desorganizadas nos centros urbanos, falta de saneamento básico, aumento da população de roedores e enchentes, ocorreu uma mudança nos padrões epidemiológicos da doença, com a ocorrência de surtos epidêmicos sazonais, reacionados ao aumento dos índices pluviométricos regionais. Os novos padrões epidemiológicos somaram-se aos padrões epidemiológicos antigos, aumentando consideravelmente o número de casos e tornando a leptospirose a zoonose mais importante dos últimos 30 anos.

A leptospirose pode ocorrer na forma clínica ou subclínica. Existem duas formas clínicas, a moderada (anictérica) e a forma grave, denominada também como Síndrome de Weil (ictérica ou anictérica) (SEBASTIAN & JOHNSON, 1994). Não é possível determinar, através do exame clínico, se a doença é do tipo moderado ou grave e estabelecer o prognóstico do quadro da doença. O grande número de pessoas com sorologia positiva, demonstram que as formas subclínicas são bastante comuns. Embora existam poucos trabalhos a respeito, 5 a 15% dos infectados, com sorovares responsáveis pela doença na forma grave, desenvolvem a doença, sendo a taxa de letalidade da forma grave de 5 a 40%. Os fatores principais do desenvolvimento de uma doença crônica são: a virulência do leptospira (os sorovares icterohaemorrhagiae, copenhageni e bataviae estão associados com a forma grave e os sorovares pomona, griphotyphosa e hardjo mais associados com a forma moderada), a susceptibilidade do paciente (homens brancos entre 35-50 anos são mais susceptíveis), a quantidade de inóculo e o número de infecções (diretamente proporcionais ao desenvolvimento da doença).

1.1.2 Epidemias no mundo

Os trabalhos a respeito de epidemias urbanas, rurais e ocupacionais sugerem que as formas de infecção subclínicas são muito freqüentes e que a doença pode apresentar dimensões maiores do que se é conhecido. Os estudos realizados demonstram que a doença ainda é pouco estudada e que os esclarecimentos a respeito dos padrões epidemiológicos ainda merecem muitas investigações. Na Austrália, entre julho de 1975 e junho de 1985, de um total de 14.630 soros de pacientes de casos agudos e convalescentes, 361 apresentaram título maior que 1:100 ao teste de MAT sororeagente (DERMACHELIER, 1987). Na Itália, nos

anos de 1987 e 1988, foram investigados 2.534 soros de pessoas aparentemente saudáveis (com idade variando entre 30 a 39 anos). Em 9 das 20 regiões italianas estudadas obteve-se soro de pacientes reagentes a antígenos de leptospiras em 11,1% nas pessoas das cidades principais e 12,9% nas pessoas de outras municipalidades menores (CACCIAPUOTI *et al.*, 1994). Um estudo de coorte prospectivo realizado na Espanha com 197 trabalhadores selecionados da cidade de Los Palacios determinou uma taxa de incidência de 41,25/100.000 habitantes (BENDALA *et al.*, 1996).

Na Somália, nos anos de 1975 e 1976, 372 somalianos investigados, 105 aparentemente saudáveis, moradores da área de Mogadishu, área com baixa precipitação pluviométrica, apresentaram 37,1% de positividade ao teste de microaglutinação sororeagente e 107 doentes com esquistossomose apresentaram 63,5% de positividade para microaglutinação sororeagente (CACCIAPUOTI *et al.*, 1982). Entre dezembro de 1987 e 1994, no município de Kolenchery, estado de Kerala, Índia, ocorreram 978 casos, 857 com positividade à microaglutinação sororeagente e taxa de letalidade de 5,3% (KURIACOSE *et al.*, 1997). Numa ilha situada ao sul do Pacífico, Nova Caledônia, em 1989, foram diagnosticados 144 casos com uma taxa de incidência de 90/100.000 pessoas por ano, com taxa de mortalidade de 4% (PEROLAT & PERROCHEAU, 1997). No período de 1986 a 1990 foram relatados 2478 casos de leptospirose em Cuba, com um aumento progressivo da incidência da doença ao longo desses anos (SANCHEZ, *et al.*, 1993).

Na região do Caribe, ilha de Curaçao, nos anos de 1989 e 1990, (região de baixa precipitação pluviométrica) ocorreram poucos casos, enquanto que nas ilhas com maior precipitação pluviométrica, como a República Dominicana, ocorreram 23 casos graves por

100.000 habitantes ao ano (EVERARD & EVERARD, 1993). Em Barbados, entre novembro de 1979 e dezembro de 1986, foi encontrada uma incidência de 14/100.000 habitantes na população total e 32,6/100.000 nas áreas com precipitação pluviométrica maior ou igual a 1.600 mm (EVERARD, *et al.*, 1995). Em Trinidad, entre fevereiro de 1977 a setembro de 1982 foram detectados 26 casos graves de leptospirose por 100.000 habitantes por ano (EVERARD *et al.*, 1986). Quinhentos escolares de Barbados e 500 escolares de Trinidad entre 7 a 14 anos de idade apresentaram, respectivamente, 12,5% e 9,5% de positividade para leptospirose (EVERARD, *et al.*, 1989). Outros estudo realizados em Barbados relacionam microepidemias da doença, relacionando os casos graves a pequenas regiões (BENNET & EVERARD, 1991).

1.1.3 Epidemias urbanas no Brasil e em Salvador

Os estudos epidemiológicos existentes ainda são poucos. Muitos aspectos epidemiológicos da doença necessitam de ser esclarecidos para que os órgãos responsáveis pela saúde pública tenham ferramentas disponíveis para o controle da leptospirose. No Brasil existem alguns estudos isolados ao longo dos anos. No município do Rio de Janeiro foi realizado um estudo retrospectivo para os anos de 1983 a 1991 com o soro de 188 crianças entre 0 a 12 anos de idade, tendo sido observado que 27,6% das crianças foram positivas pelo teste de microaglutinação (CRUZ, *et al.*, 1994).

No município de São Paulo, no Instituto Adolfo Lutz, entre o período de 1986 a 1989, foram examinadas 227 amostras de 23 pacientes (sangue, soro, líquido céfalo-raquidiano, urina, líquido peritonial e líquido de diálise) isolados em meio de cultura Fletcher, sendo

encontradas 25 amostras positivas, num total de 23 pacientes. A sorotipagem de 18 dessas cepas identificou os sorovares copenhageni (14 pacientes), canicola (2 pacientes), casteloni (1 paciente) e o sorogrupo Pomona (1 paciente) (SAKATA *et al.*, 1992). Outro estudo epidemiológico retrospectivo abrangendo o período de janeiro de 1989 até dezembro de 1995 foi realizado no município de São Paulo com 43 crianças, entre 4 a 14 anos demonstrando que os sorovares mais predominantes ao teste de MAT eram copenhageni (45%), icterohaemorrhagiae (32,7%), autumnalis (12,7%), canicola (3,6%), pomona, cynopteri e hebdomadis (1,8%) (MARROTO, *et al.* 1997).

Os aspectos da evolução da leptospirose em Salvador e a mudança nos padrões epidemiológicos da doença seguiram as mudanças dos padrões epidemiológicos nos grandes centros urbanos onde a ocupação habitacional ocorreu de forma desordenada. TORRES, *et al.* em 1916 e 1924 relataram as primeiras observações de casos humanos em Salvador. Na Bahia a associação de surtos da doença em bovinos, suínos cães e homens foi identificada na década de 30 (VIANA, 1926 e ARAÚJO, 1928). Na década de 50 foram associadas a doença com a proliferação de roedores e problemas com saneamento básico na cidade de Salvador (ANDRADE & OLIVEIRA, 1954). Na década de 70 foram registradas em Salvador mudanças nos padrões epidemiológicos da doença que se constituía num grave problema de saúde pública (CALDAS & SAMPAIO, 1977, CALDAS *et al.*, 1979).

A mudança nos padrões epidemiológicos da leptospirose no Brasil ocorreram devido a uma mudança no processo de ocupação ambiental. A intensa migração da população do meio rural para o meio urbano nas décadas de 50, 60 e 70 proporcionou um crescimento desordenado das cidades. A instalação de migrantes pobres nas cidades levou ao aparecimento de numerosas e populosas favelas com problemas de saneamento básico,

escoamento de esgotos, coletas de lixo e aumento na população de ratos. As condições climáticas, como altas temperaturas e precipitação pluviométrica, somadas as precárias condições de saneamento básico e a falta de esclarecimento da população quanto a higiene e a saúde básica modificaram as características da leptospirose, de uma doença esporádica e ocupacional, para uma doença com características ecológicas estritas nas capitais brasileiras mais populosas, atingindo a população de baixa renda com surtos epidêmicos em épocas chuvosas. Os estudos de epidemias urbanas em Salvador iniciam da década de 50 com ANDRADE & OLIVEIRA, 1954, através da necrópsia de casos humanos e visualização de leptospiras em ratos urbanos capturados pelo Serviço de Controle da Peste. Os fatores de risco como a presença de roedores, a presença de cães infectados foram relatados por CALDAS *et. al.*, 1977. Estudos epidemiológicos associando os casos humanos aos fatores climáticos foram realizados no final da década de 90 por KO *et al.*, 1999, associando as epidemias de leptospirose com os altos índices de precipitação pluviométrica.

1.1.4. Reservatórios

A bactéria tem um comportamento cosmopolita tendo sido isolada em animais de várias ordens, como Insectivora, Chiroptera, Rodentia, Lagomorpha, Carnivora e em animais ungulados (HARTSKEERL & TERPSTRA, 1996). Os tipos de reservatórios animais são os reservatórios sinantrópicos, os domésticos e os silvestres. No ambiente urbano os principais reservatórios são os ratos e os cães. Os principais reservatórios domésticos são os cães, os suínos, os bovinos e os pequenos ruminantes. Os principais reservatórios silvestres são os pequenos mamíferos, os répteis e os anfíbios. O papel que as aves e os insetos desempenham como reservatórios de leptospirose ainda não foi esclarecido, no entanto, é

possível que possam contribuir para a transmissão da leptospirose (BRASIL, 1995, FAINE, 1999).

Nos animais domésticos a leptospirose pode assumir duas fases distintas, a fase aguda (dividida em uma fase septicêmica e uma fase imunológica) e a fase crônica (leptospiúrica). Na fase imunológica existem animais que podem apresentar sinais clínicos da doença, como febres, hemorragias, hemoglobinúria, icterícia, abortos e sinais nervosos, podendo chegar a morte por insuficiência hepática ou renal, enquanto em outros animais a doença não ocasiona sinais clínicos, passando muitas vezes despercebida. Após a fase septicêmica, as leptospirosas alojam-se em vários sítios teciduais, dentre eles os túbulos renais, e os animais começam a eliminar as leptospirosas, através da urina, constituindo a fase leptospiúrica. Nos reservatórios silvestres não existem registros dos animais que apresentam sinais clínicos da doença, no entanto, eles eliminam leptospirosas no ambiente, por semanas, meses ou por toda a vida.

Alguns sorovares têm uma afinidade à espécies animais, mas não são totalmente estritos àquelas espécies. Fatores biológicos, imunológicos, relações ecológicas ou uma combinação desses fatores definem o hospedeiro com os sorovares relacionados. Nos cães os principais são o *icterohaemorrhagiae* e o *canicola*. Os sorogrupos *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Grippytyphosa*, *Canicola*, *Bratislava* e *Balium* foram identificados em cães e gatos (CHILDS *et al.*, 1992, BOLIN, 1996). Nos EUA, devido a vacinação (sorovar específica) ocorreram mudanças nos padrões dos sorovares caninos *icterohaemorrhagiae* e *canicola* para os sorovares *pomona*, *grippytyphosa* e *bratislava*, mostrando assim uma adaptação dos sorovares aos reservatórios.

Foram identificados reservatórios de leptospirose em todos os continentes, exceto Antártica e Groelândia. Os estudos com reservatórios de leptospirose são realizados em áreas rurais e áreas urbanas e esclarecem questões epidemiológicas fundamentais para o estudo e combate a doença em todo o mundo. Em 259 roedores da espécie *R. norvegicus*, capturados em 11 fazendas da Inglaterra nos municípios de Oxfordshire, North Wales e Hampshire, 14% (37/259) foram positivos para leptospirose a ao menos um teste (MAT, ELISA, Tintura de Prata), (WEBSTER *et al.*, 1995).

Em Israel, na região sul de Tel-Aviv, em 1956 foram capturados 92 ouriços do mato, 56 de orelha curta (*Erinaceus europaeus transcaucasicus*), 35 menores de orelhas grandes (*Hemiechinus auritus*) e um *Paraechinus aethiopicus pectoralis*, 32% (18/56) *E. e. transcaucasicus* e 20% (7/35) *H. auritus* apresentaram positividade para leptospirose, seja em IMC ou MAT. Os sorovares encontrados foram canicola, balium, hebdomadis, icterohaemorrhagiae e grippotyphosa (HOEDEN, 1958). Na cidade de Detroit, Michigan, EUA de 358 *R. norvegicus* testados ao teste de MAT, 77,4% tiveram aglutinação significativa para o sorovar *icterohaemorrhagiae*, sendo encontrados títulos acima de 1:50 em 90,3% dos animais adultos e em 38,8% dos animais jovens (DEMERS *et al.*, 1983). No Distrito de Puna, na Ilha do Hawai, foram capturados 1703 roedores e testados através do teste de macroaglutinação e de isolamento de leptospiras de fragmentos renais em meio de cultura Fletcher. Desses roedores, 614 *R. norvegicus*, 484 *R. rattus*, 283 *Rattus exulans*, 170 *Mus musculus* e 152 *Herpestes auripunctatus*. A positividade para esses animais foi respectivamente 55,9%, 37,2%, 22,6%, 57,6% e 32,2%. Os sorovares prevalentes foram o *icterohaemorrhagiae* e o *balium* com uma positividade respectiva de 85,8% e 1,6% para o *R.*

norvegicus, 70,8% e 16,8% para o *R. rattus*, 66,1% e 23,2% para o *R. exulans*, 51% e 44,8% para o *M. musculus* e 76,5% e 0% para o *H. aurupunctatus* (MINETTE, 1964).

Em Barbados foram capturados 138 *R. norvegicus* e 98 *R. rattus* nos anos de 1964 e 1965. Nas áreas urbanas, 95% eram *R. norvegicus* e 5% eram *R. rattus*. Nas áreas rurais 67% eram *R. rattus* e 33% eram *R. norvegicus*. Desses animais, 35% dos *R. norvegicus* e 33% dos *R. rattus* foram positivos a pelo menos um dos métodos diagnósticos utilizados (isolamento em meio de cultura Fletcher ou teste de microaglutinação utilizando bateria de 16 sorogrupos). De 71 soros positivos testados 90% reagiram positivamente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae ou ao sorogrupo Autumnalis e 10% para outros sorogrupos. Sessenta e sete por cento dos *R. norvegicus* foram positivos ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae e 21% dos *R. rattus* foram positivos ao sorogrupo Autumnalis (TAYLOR *et al.*, 1991).

No Chile, município rural de Valdivia (39° 49' de latitude sul e 73° 14' de longitude Oeste) foram capturados 93 roedores positivos para leptospirose: *M. musculus* 12,5% (1/8), *Akodon longipilis* 56,3% (9/16), *Akodon olivaceus* 57,1% (8/14), *Oryzomys longicaudatus* 41,7% (15/36), *R. rattus* 41,8% (7/17) e *R. norvegicus* 0% (0/2) a pelo menos um dos testes utilizados, impregnação pela prata (Levaditi), imunofluorescência indireta, imunoperoxidase e observação direta de soro em campo escuro, apresentando uma positividade total de 43% (40/93) (ZAMORA, 1995). Todos esses estudos demonstram a existência de muitos reservatórios silvestres de leptospirose, a grande variedade de sorovares existentes e a importância cosmopolita do *R. norvegicus* e do *R. rattus* como reservatórios rurais e urbanos.

A história dos trabalhos com reservatórios de leptospirose no Brasil começa no início do século. No município do Rio de Janeiro, no ano de 1923, foram examinados 18 *R. norvegicus* e 1 *M. musculus*, no ano de 1925 foram examinados 9 *R. norvegicus*, 1 *M. musculus* e 1 *R. rattus* onde 16,6% apresentaram positividade a inoculação em cobaia e 6,6% apresentaram positividade ao exame direto no microscópio de luz (LINS, 1925). No Rio de Janeiro, entre abril de 1944 a dezembro de 1946 foram autopsiados 7395 ratos onde foram triturados o fígado e os rins desses animais e inoculados 0,5 ml desse líquido em 1467 cobaias, 27,1% dessas cobaias morreram com os sinais típicos da Síndrome de Weil (SANTOS, 1947). No município de São Paulo no ano de 1948 foram pesquisados 259 *R. norvegicus* através da cultura de macerado de fragmentos renais, onde 15,05% desses animais apresentaram positividade. Em 1949, no município de Santos, foram pesquisados, através do isolamento em meio de cultura de macerado de rins 10 *R. frugivorus*, 4 *R. rattus* e 71 *R. norvegicus*, tendo sido encontrados 6 *R. norvegicus* positivos ao teste, todas as bactérias foram identificadas como pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae através do teste de macroaglutinação (GOMES *et. al.*, 1950). Nos municípios de Cotia e Casa Grande e Nova Odessa no estado de São Paulo foram isoladas leptospirosas em 3% (5/150) de *Didelphis marsupialis*, 6% (4/58) de *Nectomes squamipes*, 3% (1/32) de *Thaptomys nigrita*, 4% (11/280) de *Akodon arviculoides*, 3% (1/33) de *Oryzomys ratticeps*, 6% (4/62) de *Oryzomys eliurus*. Os sorogrupos encontrados foram o Grippotyphosa, Ballum, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae e Bataviae (SANTA ROSA, 1970). No município de Salvador foram examinados 229 roedores (227 *R. norvegicus* e 2 *R. rattus*) e 5 camundongos (*M. musculus*) (ANDRADE & OLIVEIRA, 1954) ao exame de impregnação em prata do tecido renal pelo método de Levaditi, 29,25% (67/227) dos animais examinados foram positivos, sendo que todos os positivos foram *R. norvegicus*. Entre os animais positivos 41,4 % foram adultos e

17,6% foram jovens. No mesmo município, em 1992, Caldas *et al.*, investigaram aglutininas antileptospiras em 30 hemossoros de *R. norvegicus* e cinco *D. marsupialis*, encontrando, em ambos 20% de positividade, sendo mais freqüente os sorovares *grippotyphosa* e *icterohaemorrhagiae*.

Atualmente, os estudos de reservatórios continuam a ser realizados através da captura dos animais e realização de testes diagnósticos. PEREIRA & ANDRADE, 1988, na cidade do Rio de Janeiro capturaram 101 *R. norvegicus* e 3 *M. musculus* em favelas e examinando-os ao teste de microaglutinação com "pools" de sorogrupo e com anticorpos monoclonais e isolamento em meio de cultura de fragmentos renais e urina. A prevalência da infecção foi de 39,4%. Vinte culturas isoladas de *R. norvegicus* eram do sorogrupo *lcterohaemorrhagiae*. Dos três *M. musculus* não foi isolada nenhuma bactéria e somente o soro de um animal reagiu contra os sorovars *javanica* e *hebdomadis*.

O estudo de reservatórios de leptospirose em Salvador justificou-se pela escassez de trabalhos com reservatórios, pelos poucos trabalhos a respeito de reservatórios realizados no município em relação a dimensão da doença (ANDRADE & OLIVEIRA, 1954, CALDAS *et al.*, 1979, CALDAS *et al.*, 1979, CALDAS *et al.* 1992). As altas prevalências de leptospirose encontradas, tanto nos animais como em humanos, ratificam a importância desses estudos que podem orientar o controle de roedores na cidade e esclarecer fatores epidemiológicos importantes para o entendimento da doença. Os achados no presente estudo de MAT positivas em *D. marsupialis*, mesmo que para sorovares não patogênicos, sugerem a potencialidade do risco da leptospirose atingir outros reservatórios, reforçando a importância dos estudos constantes e continuados.

Informações detalhadas de estudos de investigação de reservatórios permitem o esclarecimento das situações epidemiológicas urbanas e conseqüentemente o direcionamento de ações de agentes sanitários nas campanhas de combate aos reservatórios e da leptospirose que, nas epidemias, ocasiona muitos internamentos e ocupação de leitos hospitalares, resultando em altos custos para tratamentos médico-hospitalares, num país onde existem poucos recursos para a saúde da população. Os *R. norvegicus*, por sua vez, são os principais reservatórios urbanos de leptospirose e não existem condições de eliminá-los do ambiente. Os problemas sanitários também dependem de muitos recursos e são difíceis de serem resolvidos a curto prazo. O conhecimento de locais onde há maior ou menor prevalência de leptospiras em reservatórios pode direcionar o controle de roedores urbanos e fornecer dados para a Fundação Nacional de Saúde (FNS) e para os CCZ no auxílio ao combate da leptospirose. Os reservatórios por sua vez, podem mostrar variações sazonais de infecções, mudança no tamanho da população e migrações de populações. Esses aspectos podem vir a ser causas de alterações dos fatores de risco e da leptospirose humana e poderão ser esclarecidos utilizando-se a metodologia padrão de captura e investigação diagnóstica.

1.1.5 Métodos diagnósticos para a investigação de reservatórios

Existem dois padrões básicos de métodos para diagnóstico de leptospirose, os diretos e os indiretos. Os diagnósticos diretos verificam a presença do patógeno em observações de preparações a fresco de urina no microscópio de campo escuro, observações em tecidos corados com colorações especiais, como impregnação em prata, IMC ou inoculação do

agente em cobaias, e utilização de amostras variadas, como sangue, urina, fragmentos de rim, líquido cefaloraquidiano, líquido peritonial ou líquido de diálise. Os métodos indiretos pesquisam anticorpos, como o teste de ensaio de ligação imuno enzimática absorvente (ELISA), imunofluorescência e imunohistoquímica em tecidos corporais e os testes de MAT e de macroaglutinação.

Os diagnósticos mais utilizados em reservatórios e na leptospirose humana são o MAT e o IMC, sendo considerados testes padrão ouro. Recentemente tem-se utilizado o PCR. Existem vantagens e desvantagens em cada método utilizado que variam de acordo com a proposta do estudo realizado, as espécies animais avaliadas, o tipo de material biológico disponível, a fase da doença (principalmente nos casos humanos) e o custo do teste.

Os dois meios de cultura mais utilizados para o isolamento de leptospira são o Fletcher e o EMJH, líquidos e semi sólidos. O meio de cultura semi sólido pode ser repicado a cada dois meses, sendo utilizado para a manutenção de isolados e baterias em laboratório. O meio de cultura líquido deve ser repicado semanalmente e é utilizado para as baterias de sorovares utilizadas nos testes de MAT e para o isolamento dos casos novos. Eventualmente, dependendo do tipo do inóculo, são utilizados antibióticos para inibir a contaminação. Os meios de cultura são seletivos, possuem ácidos graxos para a nutrição das bactérias, agentes detoxificantes, e são mantidos em tubos que proporcionam condições de aerobiose. A principal vantagem do IMC é o isolamento e manutenção do agente e a possibilidade de sua estocagem a -70°C . As desvantagens são a contaminação, através do crescimento de outros microorganismos oportunistas, a possível falta de adaptação de cepas selvagens a primeira inoculação, a competição entre duas cepas em caso de dupla infecção (uma não

permitindo o crescimento da outra) e um longo tempo de leitura em microscópio de campo escuro, variando de uma a oito semanas de leitura.

O teste de MAT é outro teste utilizado para o estudo de reservatórios. A sua positividade ocorre com a reação de anticorpos presentes no soro dos animais com uma bateria de antígenos vivos com sorovares conhecidos. A suas principais vantagens são a sua sensibilidade e a possibilidade da identificação do sorogrupo reagente. Os soros retirados dos animais que são utilizados para o MAT também podem ser estocados a -20°C , permitindo estudos retrospectivos. A desvantagem é que requer manutenção de uma bateria de leptospiros com repiques semanais. O método é laborioso, a bateria preconizada pela OMS tem no mínimo 20 sorovares, requerendo a manutenção da mesma com repiques semanais. Outro problema é que ocorrem freqüentemente reações cruzadas entre sorovares permitindo somente a identificação do sorogrupo, podendo existir reações cruzadas entre sorogrupos, e com anticorpos de outras doenças causadas por espiroquetas como a *Borrelia burgdorferi*, tornando o teste difícil de ser interpretado. Uma outra utilização do MAT é para a sorotipagem de bactérias desconhecidas, no entanto, o método requer uma bateria de soros produzidos em coelhos com anticorpos monoclonais, encarecendo o teste, permitindo o seu uso somente em poucas instituições referenciais.

O teste utilizado para o diagnóstico de leptospirose, mais recentemente, é o teste de PCR. No diagnóstico de doenças infecciosas é um método que apresenta vantagens em relação a outros testes pela sua rapidez, alta sensibilidade e especificidade (FREDRIKS & RELMAN, 1999, NABER *et al.* 1994, PRESS *et al.* 1999). Atualmente está sendo desenvolvido esse teste para muitas doenças infecciosas humanas, dentre elas a AIDS (DIAZ *et al.*, 1999), a

microsporídiase (FROZEN & MULLER, 1999), a hepatite C (SILVA *et al.*, 2000), a tuberculose (KAMYAMA *et al.*, 1999) e doenças infecciosas de animais (DESMETTRE, 1999). O teste de PCR para a leptospirose vem sendo desenvolvido para o diagnóstico da doença em humanos. MÉRIEN *et al.*, 1995 compararam as técnicas de MAT, IMC e PCR, demonstrando que o PCR foi mais eficiente pela sua rapidez em detectar o agente e por ser menos trabalhoso que as outras técnicas. Em casos humanos de pacientes com meningite asséptica, a comparação da detecção de leptospiras em líquido cérebro espinal através do ELISA- IgM do MAT e do PCR demonstrou que o PCR é mais eficiente no diagnóstico precoce de alguns casos de leptospirose (ROMERO *et al.*, 1998). Uma outra vantagem do PCR é que a utilização de diferentes "primers" no teste de PCR para o diagnóstico de leptospiras possibilita a detecção de espécies de modo diferenciado (GRAVEKAMP *et al.*, 1992). O uso do PCR "fingerprint" permite a sorotipagem dos diversos sorovares de leptospira permitindo que no futuro o método diagnóstico seja mais preciso e informativo.

O teste de PCR para animais domésticos tem sido utilizado principalmente em centrais de inseminação artificial, no controle do sêmen de reprodutores e em criações de animais de produção. No Canadá o teste de PCR foi desenvolvido para a detecção de leptospiras da espécie *Leptospira borgpeterseni* utilizando os "primers", para teste de seleção de entrada bovinos em centros de inseminação artificial (SAAD, *et al.*, 1997). A utilização do método para o diagnóstico de reservatórios silvestres de leptospirose também já está sendo realizada. Na Coreia foi estabelecido o limite de detecção de dez genomas de leptospiras para os primers LP1 e LP2 que amplificam um segmento de genoma de 274 pares de bases. Conseguiu-se detectar a presença de leptospiras em gérbis infectados com 10^5 leptospiras após 2 dias de infecção com *L. interrogans*, sorovar lai, cepa KH1 (KEE *et al.*, 1993). O teste

de PCR foi utilizado no estudo de 222 roedores da espécie *Apodemus agrarius* capturados entre outubro e dezembro de 1996 na Coréia. Os fragmentos de macerado de rim foram testados pelo PCR com os “primers” de Gravekamp, apresentando 15,8% de positividade (12/76) nos animais da Coréia do Norte e 10,9% (16/146) animais da Coréia do Sul. Ao isolamento em meio de cultura de macerado de tecido renal a positividade foi de 14,5% (11/76) na Coréia do Norte e 7,5% (11/146) na Coréia do Sul, sendo que 22 isolados apresentaram reação cruzada em teste de MAT, 100% com o sorovar lai e 25% com o sorovar copenhageni e 15 com o sorogrupo Canicola (CHO *et. al.*, 1998). A rapidez, a alta sensibilidade e especificidade, e a possibilidade de rastrear diferentes espécies garantem a utilização do método pela sua rapidez e eficiência. A sua utilização em animais de produção e em investigações epidemiológicas urbanas permitirá o esclarecimento de epidemias e endemias, fornecendo indicativos para a atuação dos serviços de controle de roedores e para as iminentes campanhas de saneamento básico.

1.1.6 Alterações morfológicas e patogenia renal no homem e nos reservatórios

Estudos histopatológicos humanos de autópsia e de biópsia demonstram lesões renais características. Em estudo realizado com humanos em 88 autópsias foi demonstrado que as lesões renais principais foram infiltrado inflamatório mononuclear difuso com predomínio de linfócitos e plasmócitos, de disposição peri-glomerular e em torno de túbulos contornados proximais, existindo cilindros biliares e hemáticos dentro desses túbulos (DUARTE, 1992). Em estudo realizado em autópsias de 9 pacientes humanos, todos infectados com o sorovar bataviae, foi encontrada nefrite intersticial, glomerulite aguda e depósitos hialinos nos túbulos (SITPRIJA E EVANS, 1970). Em biópsias renais realizadas em quatro pacientes infectados com o sorovar pomona foi encontrado edema intersticial, infiltrado de linfócitos e plasmócitos peritubulares, necrose tubular, depósitos proteicos tubulares e dois pacientes apresentaram evidência de proliferação de matriz mesangial (LAI *et al.*, 1982). GONÇALVES, *et al.* 1992, ao examinarem seis pacientes com leptospirose, que apresentaram hemoptise e vieram a óbito, encontraram glomérulos distendidos por material hialino eosinofílico, degeneração e regeneração tubular e infiltrados corticais de mono e polimorfonucleares e nefrose colêmica, confirmando os achados mais comuns da histopatologia da leptospirose.

Nos animais não susceptíveis, como ratos e camundongos e nos animais domésticos que resistem a doença aguda as leptospirosas persistem nos tecidos, como os túbulos contorcidos proximais, o cérebro, a parte anterior do globo ocular e o trato genital. No rim, elas continuam a se multiplicar e migram através dos espaços intersticiais e entre as células epiteliais renais para as bordas em escova, interdigitando-se com os microvilos da superfície tubular sendo excretadas por várias semanas, meses ou por toda a vida (MARSHALL, 1974, 1976, FONTE:

FAINE, 1999). Hamsters e cobaias são susceptíveis. A susceptibilidade dos animais jovens é confirmada e muito utilizada para testes de vacina, ensaios clínicos, trabalhos de patogenese e patogenia. PEREIRA, *et al.*, 1997, utilizando camundongos C3H/HeJ, comprovaram que essa linhagem de camundongos, principalmente os animais jovens, são susceptíveis a doença. Os animais foram tratados com anticorpos anti CD4+ e anti CD8+ e aos dezessete dias foram realizados exames histológicos. Ocorreram aumentos significativos na hemorragia pulmonar difusa associada a vasculite, uma amplificação da persistência do infiltrado inflamatório mononuclear em torno de vasos sanguíneos pulmonares, bronquíolos e interstício renal e a persistência de necrose tubular aguda e focos de nefrite. Nos focos de nefrite intersticial encontraram-se poucos antígenos de leptospiros, sugerindo que esse tipo de lesão deve ser ocasionada por produção de citocinas ou metabólitos tóxicos, como interleucina 1 (IL-1), interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF), produzidos por macrófagos que desempenham papel na defesa murina para a leptospirose.

O mesmo autor, em trabalho anterior realizado com hamsters infectados com o sorovar icterohaemorrhagiae, por um período de 30 dias (após esse período os animais já se comportam como hospedeiros crônicos), observaram degeneração e necrose, afetando principalmente regiões córtico medulares, não sendo demonstradas alterações vasculares (PEREIRA *et al.*, 1998). Outro trabalho realizado com hamsters infectados por 7 dias com os sorovares pomona, canicola e icterohaemorrhagiae relata necrose e degeneração tubular, além de outros órgãos afetados, como o fígado, sendo que as lesões foram menos intensas com o sorovar icterohaemorrhagiae (OLIVA *et al.*, 1994). Trabalhos realizados com cobaias infectados diariamente até os seis dias demonstraram congestão vascular em pulmão e coração do primeiro para o segundo dia. O início dos sinais clínicos e de lesões

histopatológicas começaram no terceiro dia, com depósito de fibrina em vasos capilares do fígado, rins e músculos. No quarto dia foi encontrada uma necrose de coagulação no fígado, achado pouco freqüente para a leptospirose. No quinto dia encontrou-se necrose tubular, nefrite intersticial, miocardite e miosite, seguidas por hemorragia (SILVA, 1995). Os relatos de histopatologia renal em animais domésticos demonstram nefrite intersticial, hemorragias e necrose intersticial em rins de bovinos (LANGHAM *et al.* 1958, WEST, 1997), fibrose glomerular e intersticial em cães (MORRISON, *et al.* 1976). necrose em rins de suínos (ELLIS, 1985) e atrofia glomerular e depósitos proteicos glomerulares em pequenos ruminantes (ANDREANI, *et al.*, 1983).

A patogenia da leptospirose de um modo geral está relacionada com a destruição do endotélio da microcirculação, com extravasamento de células e hemorragias. As outras lesões parecem ter relação com a adesão celular e os mecanismos de toxicidade. A adesão da leptospira com os túbulos renais parece não causar lesões celulares, nem ocasionam reações inflamatórias ao redor dos túbulos não causa cicatrização na infecção aguda. Existem estudos que demonstram adesividade e endocitose através de receptores em células endoteliais de cultura de bactérias pertencentes a sorovares patogênicos (MÉRIEN, 2000).

A relação da leptospira com os reservatórios crônicos é um processo dinâmico e recíproco que envolve fatores relacionados com as características naturais do parasita e com as defesas imunológicas do hospedeiro. As bactérias penetram pelas mucosas, lesões de pele, trato respiratório, trato genital, via hematogênica, transplacentária, conjuntiva, atingindo dessa forma a circulação sanguínea ou a corrente linfática, porém, todas as vias e

mecanismos pelos quais se dá a entrada do patógeno não foram totalmente esclarecidos. A patogenia da doença está relacionada aos mecanismos de toxicidade, atribuídos principalmente ao LPS (MASUZAWA, 1990 e MIDWINTER, 1994) e a produção de hemolisinas (BAUER, 1960) e adesão da bactéria a superfícies celulares (DAVID *et. al.*, 1998). Os mecanismos de defesa do hospedeiro estão relacionados em grande parte com a imunidade humoral (MYRON, *et al.*, 1971). Estudos de pacientes relatam a diminuição de células CD3+ e CD4+, mas não uma diminuição irreparável (YAMASHIRO, 1991), o que pode explicar a recuperação dos animais infectados, inclusive o homem e da grande quantidade de casos subclínicos.

2 OBJETIVOS

- 1) Caracterizar os reservatórios de leptospirose no município de Salvador
 - a. Capturar e determinar os reservatórios de leptospirose através do teste de MAT e IMC.
 - b. Caracterizar os sorogrupos de leptospiras nos animais capturados e comparar com os sorogrupos dos casos humanos.
- 2) Desenvolver um teste de diagnóstico rápido para as leptospiras nos reservatórios através do teste de PCR.

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A leptospirose em Salvador é uma doença epidêmica e têm elevados índices de letalidade. Existem ao menos 300 casos clínicos por ano da doença, somente no hospital Couto Maia, onde 5 a 15% desses casos clínicos desenvolvem os sinais graves da doença, ocupando leitos hospitalares, requerendo tratamentos com hemodiálise, antibióticos e apresentando uma letalidade de 5 a 15%. Até o presente momento, no nosso meio, foram realizados poucos estudos sobre a doença e seus reservatórios (ANDRADE & OLIVEIRA, 1954, CALDAS *et al.*, 1977, MACHADO & COSTA, 1977, KO, *et al.*, 1999).

Os estudos epidemiológicos mais completos realizados com leptospirose humana foram realizados conjuntamente com estudos dos reservatórios. O estudo de reservatórios auxilia nas correlações com fatores de risco e na determinação dos sorovares relacionados com o homem e reservatórios. Os estudos de reservatórios no mundo geralmente são realizados com métodos diagnósticos padrão ouro (MAT e IMC), embora esses métodos permitam a determinação do sorogrupo dos animais e do isolamento do patógeno, eles ainda são muito demorados e trabalhosos. Para estudos epidemiológicos mais extensos nos reservatórios é necessário um método de diagnóstico rápido como o PCR. Método que no futuro poderá auxiliar os CCZ nas campanhas de desratização, direcionando os principais locais para o combate dos roedores.

Os ratos são os principais reservatórios de leptospirose humana, no entanto não existem estudos recentes a respeito dos atuais reservatórios de leptospirose em Salvador. Os estudos da patogênese da leptospirose, além de escassos, raramente são realizados em

reservatórios urbanos, que representam os portadores crônicos do parasita e convivem com os sorovares mais virulentos da doença, responsáveis pela doença grave.

No intuito de esclarecer as questões relacionadas acima foram estabelecidos os seguintes objetivos: identificar os reservatórios da leptospirose epidêmica em Salvador, determinar a prevalência de leptospirose nesses reservatórios e correlacionar os sorovares dos reservatórios com os sorovares dos casos humanos, desenvolver um teste de diagnóstico rápido através do teste de PCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CAPTURAS

4.1.1 Locais de captura

A escolha dos locais de captura dos animais foi realizada de acordo com a ocorrência de epidemias, desde maio de 1998 a março de 1999. Foram escolhidos nove bairros onde ocorreram casos humanos de leptospirose, uma semana a três meses até o início das capturas (Federação, Brotas, São Caetano, Liberdade, Dóron, Matatu, Mata Escura, Alto do Cruzeiro e Pernambués) e dois bairros sem casos de leptospirose humana nos últimos três anos (Ondina e Graça).

Nos bairros foram identificadas as casas dos pacientes, os principais habitats de roedores urbanos e colocadas armadilhas nas proximidades desses habitats. Os habitats desses roedores foram identificados através da visualização de tocas, pegadas e fezes em locais próximos a matagais, lixos, esgotos a céu aberto e outros locais de trânsito desses animais, nos quintais dessas residências e seus arredores. A identificação do local de captura foi estabelecida para melhorar a eficiência da captura e para que as armadilhas colocadas fossem direcionadas para a captura de animais com potencialidade de serem reservatórios de leptospirose. Os dados referentes a esses locais foram relacionados em tabelas referendadas no Anexo 1.

O período no qual as armadilhas foram colocadas em cada local de captura foi chamado de sessão de captura. As armadilhas foram colocadas no local de captura entre o período de 18 horas até às 9 horas do dia seguinte ou entre o período de 10 horas de um dia às 10 horas do dia seguinte.

4.1.2 Métodos de Captura e Transporte dos Animais

Os animais foram capturados com armadilhas para a captura de animais vivos da marca Tomahawk[®] (Tomahawk Company), nas dimensões de 20X20X60 cm, com iscas de toucinho defumado, queijo, banana e pasta de amendoim. Para cada bairro foram escolhidos de um a quatro locais de captura próximos das residências onde ocorreram casos humanos de leptospirose. Os animais capturados foram recolhidos nas próprias armadilhas que foram embaladas com sacos plásticos, manipuladas com luvas de borracha e roupa de proteção e transportadas no período menor do que duas horas para o laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz onde foi fornecida água e ração "ad libitum" para esses animais até que fossem necropsiados. Os animais foram necropsiados entre 1 a 24 horas depois da captura. A metodologia de captura foi adaptada a partir de métodos previamente estabelecidos para a captura de reservatórios em doenças infecciosas (MILLS *et al.*, 1995).

4.1.3 Identificação dos reservatórios e suas características

O gênero e a espécie a que pertenciam os animais foram identificados por característica fenotípicas. O tamanho das orelhas, do corpo, da cauda, da pata e a coloração da pelagem.

A idade aproximada dos *R. norvegicus* foi determinada através da medida do corpo. De acordo com as características fenotípicas desses animais estabeleceu-se o tamanho menor e igual a 19 cm para os animais jovens. O sexo foi identificado de acordo com os órgãos genitais. As demais alterações morfológicas externas, como cicatrizes, ferimentos e perdas de partes do corpo foram anotadas. Os dados de mensuração e alterações morfológicas foram relacionados em tabelas que encontram-se no Anexo 2.

4.2 NECRÓPSIA

4.2.1 Anestesia

Os animais, antes de retirados das armadilhas, foram colocados em uma caixa de madeira nas dimensões de 30X30X70 cm, onde foram submetidos a uma pré- anestesia inalatória com éter etílico. Os animais em estágio três de anestesia (sem reflexo caudal ou palpebral) foram retirados das armadilhas onde foram submetidos a uma anestesia intramuscular de quetamina a 3 mg/kg para a garantia de sua sedação durante a retirada dos órgãos. Os dados relacionados a anestesia foram anotados em tabelas e referendados em tabelas semelhantes as do Anexo 3.

4.2.2 Coleta de amostras: sangue, urina e tecido renal

Os animais, anestesiados, foram colocados numa bandeja de contenção. Posteriormente foi realizada a punção cardíaca utilizando uma seringa de 10 ml com agulha 25 X 8, 21 g. Inoculou-se a agulha por entre o primeiro espaço intervertebral acima do externo atingindo o

coração de onde foram retirados de 2 a 10 ml de sangue para obtenção do soro usado no teste de MAT. O sangue foi mantido em temperatura ambiente por 30 min até coagular e em seguida centrifugado a 200 g por 15 min. O soro obtido foi aliquoteado em tubos de plástico da marca eppendorf® com capacidade para 1,5 ml e mantidos no freezer a -20°C.

Para a necrópsia foi realizada assepsia na região abdominal com álcool etílico hidratado a 70%. Posteriormente foi realizada uma incisão longitudinal no abdômen e novamente foi realizada assepsia na região subcutânea abdominal com uma seqüência, respectiva, de três tampões de gaze, embebidos em álcool etílico hidratado a 70%, álcool iodado e álcool etílico hidratado a 70%. Após a assepsia foi realizada a incisão da região subcutânea e da camada muscular abdominal expondo a cavidade abdominal.

Através de punção direta da bexiga com seringa de 1 ml e agulha de 25X7 (descartáveis e estéreis) foram colhidas amostras de urina para os testes de IMC e PCR. A inoculação em meio de cultura EMJH foi imediata e foram estocadas alíquotas em tubos eppendorf® para a posterior realização do teste de PCR. A alíquota mínima coletada para a realização de PCR foi de 0,5 ml, de acordo com dados de BAL, *et al.*, 1994. Nos animais que não tinham essa quantidade de urina o PCR não foi realizado. As artérias e veias renais do rim direito foram clampeadas utilizando-se uma pinça hemostática estéril em seguida foi retirado um fragmento do rim com uma tesoura estéril de ponta curva que foi macerado com uma seringa de 1 ml estéril e descartável. O rim esquerdo foi retirado e cortado longitudinalmente em dois fragmentos que foram fixados imediatamente em formalina tamponada. Após a coleta das amostras foram examinados os órgãos do sistema urinário, reprodutor e digestivo. As alterações macroscópicas foram anotadas em tabelas representadas no Anexo 4.

4.2.3 Estocagem das amostras

O soro dos animais foi estocado à -20°C logo após a coleta. As leptospiras isoladas em meio de cultura que iriam ser submetidas ao teste de sorotipagem foram estocadas em meio de cultura EMJH semi sólido, até que fossem enviadas ao Centro Nacional de Referência para a Letospirose (CNRL) para a sorotipagem. Todos os isolados de leptospiras foram colocados em meio de cultura EMJH semi-sólido com glicerol a 20% e congelados a -70°C . As amostras de urina depois da extração do DNA foram congeladas a -70°C por até três meses, antes da realização dos testes de PCR. Os rins coletados para as análises histológicas foram armazenados por 30 a 40 dias no formol tamponado, antes de serem emblocados em parafina. Os dados relacionados com a coleta e estocagem de amostra foram anotados em tabelas relacionadas no Anexo 5.

4.3 ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA

4.3.1 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura EMJH líquido (ELLINGHAUSEN & MCCULLOUGH, 1965) utilizado para o isolamento das bactérias foi preparado dissolvendo-se 2,3 g de EMJH desidratado (Difco, Detroit, MI, EUA) em 900 ml de água destilada, sendo o pH ajustado para 7,2 e autoclavado a 121°C durante 15 min. Depois de autoclavado foram adicionados 100 ml de suplemento de albumina (Difco, Detroit, MI, EUA). Foram distribuídas alíquotas de 5 ml em tubos de vidro estéreis com capacidade para 20 ml. Esses meios foram colocados em estufa a 30°C por

três dias e testados quanto a contaminação. O meio para a estocagem dos isolados foi o meio de cultura EMJH semi sólido. O preparo do meio foi realizado adicionando 1g de Bacto ágar (Difco, Detroit, MI, EUA) a 450 ml de meio líquido EMJH, aquecido e dissolvido por 4 min em forno de microondas na potência máxima. O pH foi ajustado e o meio foi autoclavado, distribuído e testado do mesmo modo que o meio líquido EMJH.

4.3.2 Inoculação do meio

Quatro gotas da urina coletada com seringa estéril foram, imediatamente, inoculadas em cada um dos quatro tubos de meio de cultura EMJH utilizados para o isolamento das leptospiras da urina. O macerado de rim, realizado em seringa estéril sem agulha, foi inoculado previamente em um tubo de meio de cultura EMJH durante 30 minutos para a sedimentação do tecido no tubo. Posteriormente, foi inoculado 0,5 ml do sobrenadante dessa primeira inoculação em 4 tubos de meio de cultura EMJH para o isolamento da leptospira do rim. Com isso, foram mantidos oito tubos de meio de cultura por animal capturado em estufa biológica a temperatura de 28,4°C, exceto nos animais que não continham urina na bexiga.

4.3.3 Leitura de cultura

As culturas foram lidas semanalmente, no período de uma a oito semanas, em microscópio de campo escuro com aumento de 100 e 400 vezes, até a observação de leptospiras. No aumento de 400 vezes as culturas foram classificadas de uma a três cruces, de acordo com a sua positividade, motilidade e contaminação com microorganismos diferentes de leptospiras. A classificação da positividade foi realizada conforme a quantidade de

leptospiras contadas no campo: de 1 a 5 leptospiras, uma cruz; de 6 a 30 leptospiras, duas cruces; de 30 a 50 leptospiras, três cruces. A classificação da motilidade foi realizada conforme a quantidade de leptospiras móveis no campo em 25, 50, 75 e 100%. A classificação de contaminantes foi realizada de acordo com a observação de microorganismos móveis, diferentes de leptospira, no campo: de 0 a 1 contaminante, uma cruz; de 1 a 6 contaminantes, duas cruces e de 6 a 30 contaminantes, três cruces. Os dados relacionados a positividade, motilidade e contaminação foram anotados em tabela relacionada no Anexo 6.

4.4 TESTE DE MAT

4.4.1 Preparação de antígeno vivo

A bateria de antígenos vivos foi composta de 29 sorovares de leptospiras que representam 18 sorogrupos de 7 espécies de leptospiras relacionados na Tabela 1. As leptospiras foram mantidas em meio de cultura EMJH e repicadas semanalmente. Alguns minutos antes do teste as culturas de leptospiras foram diluídas em solução tampão de salina com 40 g de NaCl, 7,2 g de Na₂HPO₄, 1,2 g KH₂PO₄ dissolvidos e ajustados para uma solução de 1000 ml em água destilada com pH 7,2 (PBS) para que estabelecessem o padrão de 0,5 da escala de McFarland que equivale a $1,5 \times 10^8$ leptospiras por ml. A escala de Mc Farland foi preparada com 0,5875 de BaCl₂ em solução de 50 ml (BaCl₂ a 1,75%) com água destilada e solução de H₂SO₄ a 1%. A escala é preparada para quatro padrões, 0,5 (0,005 BaCl₂ a 1,75% de e 9,995 de H₂SO₄ a 1%), 1,0 (0,1 BaCl₂ a 1,75% de e 9,9 de H₂SO₄ a 1%), 2,0 (0,2 BaCl₂ a 1,75% de e 9,8 de H₂SO₄ a 1%), 3,0 (0,3 BaCl₂ a 1,75% de e 9,7 de H₂SO₄ a 1%), com limites

aceitáveis de absorvância, ao espectrofotômetro com 625 nm com comprimento de onda, entre 0,08-1 para o padrão 0,5 e 0,16 a 0,2 para o padrão 1. Os padrões 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 correspondiam, respectivamente a $1,5 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $6,0 \times 10^8$ e $9,0 \times 10^8$ bactérias por ml.

4.4.2 Triagem e titulação das amostras de soro

Para a triagem, o soro foi descongelado e diluído em PBS para obter uma diluição de 1:50, filtrado em filtros do tipo swinnex (Milipore, São Paulo, SP, Brasil) com $0,22 \mu\text{m}$ de poro para remover as partículas. Utilizando-se placas Falcon contendo 96 poços de fundo chato foi adicionado $50 \mu\text{l}$ de soro a $50 \mu\text{l}$ de cada antígeno. Logo após a adição do antígeno ao soro as placas foram incubadas por duas horas em estufa a $28,4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após a incubação, as amostras das reações coletadas com alça bacteriológica e colocadas em lâmina de vidro foram examinadas ao microscópio de campo escuro, em período não superior a 1 hora. Os resultados positivos foram aqueles que apresentaram mais de 50% de leptospiras aglutinadas no campo com o aumento de 100 vezes. Os soros positivos foram armazenados à -4°C e no dia seguinte foi realizada a titulação com os antígenos vivos. Para a titulação os soros foram diluídos em PBS desde a diluição 1:50 até a diluição 1:51.200. O restante do procedimento foi realizado conforme a triagem, descrita anteriormente. Os resultados foram anotados em tabelas apresentadas no Anexo 7.

Tabela 1 - Sorovares utilizados para o teste de microaglutinação. Espécies, sorogrupos, sorovares e cepas da bateria que foi utilizada para os testes de microaglutinação nas amostras dos soros dos animais capturados.

Num	Espécies	Sorogrupos	Sorovars	Cepas
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
2	<i>L. interrogans</i>	Automnalis	Automnalis	Aklyami A
3	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
4	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola ♦	-
6	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
7	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
8	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
9	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	3294
10	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
11	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
12	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
13	<i>L. interrogans</i>	Sentot	Sentot	Pomona
14	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni*	-
15	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni♣	-
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón 3
17	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
18	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
19	<i>L. borgpetersenii</i>		Woiffi	3705
20	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
21	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
22	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	LT 821
23	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
24	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
25	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
26	<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Cuica	RP 88
27	<i>L. meyeri</i>		Saxkoebing	MUS 24
28	<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH - 11
29	<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1

*Leptospira pertencente ao sorovar copenhageni que foi isolada de um caso humano em Salvador, Bahia. Paciente L1 125.

♣Leptospira pertencente ao sorovar copenhageni que foi isolada de um caso humano em Salvador, Bahia. Paciente L1 130.

♦Leptospira pertencente ao sorovar canicola que foi isolada de um caso humano em Salvador, Bahia. Paciente L1 133.

4.5 SOROTIPAGEM

Os isolados de leptospiros isoladas ao IMC foram enviadas ao CNRL no Rio de Janeiro para a confirmação da sorotipagem. Os isolados em meio de cultura EMJH foram inoculados em coelhos, conjuntamente com os isolados de uma bateria padrão de leptospiros da OMS e testados por duas vezes ao teste de MAT, conforme descrito anteriormente.

4.6 TESTE DE PCR

4.6.1 Limite de detecção

Para a determinação do limite de detecção de leptospiras pelo PCR foram utilizadas culturas crescidas por sete dias em meio de cultura EMJH e ajustadas sua concentração com PBS com leptospiras da espécie *L. interrogans*, sorovar copenhageni, cepa M20 para os “primers” A/B e G1/G2 e com leptospiras da espécie *L. kirschneri*, sorovar cynopteri e cepa 3522 C para os “primers” B64I/B64II. Todas as culturas utilizadas para a determinação do limite de detecção foram diluídas em 1 ml de urina de ratos Wistar nas concentrações de 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 leptospiras contadas na câmara de Petroff (FAINE, 1999), a partir da concentração de 2×10^8 leptospiras. Para o controle positivo foram utilizadas amostras de DNA de leptospiras diluídas em PBS. O controle negativo para o limite de detecção consistiu de 1 ml urina de ratos Wistar. Para o controle positivo foram utilizados 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 DNAs de leptospiras diluídas em 1 ml de PBS, contados na câmara de Petroff (FAINE, 1999), a partir da concentração de 2×10^8 DNAs de leptospiras, extraídos a partir de fervura de leptospiras por 15 min a 100°C . O controle negativo do controle positivo foi 1 ml de PBS.

4.6.2 Processamento e extração do DNA das amostras de urina dos animais capturados

As etapas seguintes consistiram na extração do DNA das leptospiras através da fervura (BAL *et al.*, 1994). Para a extração do DNA as amostras de urina dos animais capturados (mínimo de 0,5 e máximo de 1,0 ml) e as amostras de limite de detecção (1,0 ml) foram centrifugadas

a 20.000 g por 15 min. O sobrenadante foi retirado deixando somente 50 μ l de líquido no tubo com o cuidado para não ressuspender os sedimentos. Em seguida os sedimentos foram lavados com 950 μ l de PBS, agitados lentamente e centrifugados a 20.000 g. O sobrenadante do lavado foi retirado, conforme acima mencionado. Os 50 μ l do sobrenadante e o sedimento foram agitados utilizando o aparelho da marca Vortex[®] e fervidos a 100°C por 15 min. As amostras fervidas foram centrifugadas a 20.000 g para separar os sedimentos celulares e os DNAs das leptospiras ficassem no sobrenadante. Os produtos da extração dos limites de detecção foram processados imediatamente após a extração e os produtos de extração das urinas dos animais capturados ficaram congelados a - 70°C até que fossem usados na reação de PCR.

4.6.3 Reação de PCR

Os produtos da extração foram transferidos para um tubo contendo uma mistura de reagentes denominada “mix” de PCR. O “mi” consistia de 2,5 μ l de Tampão 10X, (Life Technologies, Gibco BRL[®], Grand Island, NY, USA), 0,5 μ l de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Life Technologies, Gibco BRL[®], Grand Island, NY, USA) a 10 mM, 0,25 μ l de cada solução do “primer” (1 μ M). Todas as amostras foram testadas separadamente 3 vezes para cada par de “primers” A e B, G1 e G2 e B64I e B64 II (Operon Technologies, Operon[®], Alameda, CA, USA), 5 μ l de MgCl₂ a 100 mM (Life Technologies, Gibco BRL[®], Grand Island, NY, USA), 14,25 μ l água de PCR (Life Technologies, Gibco BRL[®], Grand Island, NY, USA), 0,25 μ l (1 unidade) Taq Polimerase Life Technologies (Gibco BRL[®], Grand Island, NY, USA) e 5 μ l do extrato de DNA da amostra testada.

Os “primers” utilizados A (5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG) e B (TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT) (MÉRIEN, 1992) amplificam 331 pares de bases, os G1 (5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT) e G2 (5'GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT) amplificam 285 pares de bases (GRAVEKAMP, 1993) e os primers B64I (5' CTG AAT TCT CAT CTC AAC TC) e B64II (5' GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT) amplificam 563 pares de bases. Após o preparo do “mix” as amostras foram colocadas em máquina sequenciadora de PCR (Perken Elmer®, PCR System 2400). Para o “primers” A/B foi usado um tempo de desnaturação inicial de 3 min a 94 °C e 35 ciclos, com um tempo de desnaturação de 60 s a 94°C, um tempo de anelamento de 90s a 63 °C e um tempo de alongação de 120 s a 72 °C e com um tempo de alongação final de 10 min a 72 °C (Mérien, 1992). Para os “primers” G1/G2 e B64I/B64II foram usadas as mesmas condições acima exceto para o tempo de anelamento que foi de 60 s a 55 °C (GRAVEKAMP, 1993). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (Sigma®) a 1,5% de brometo de etídeo a 0,001% em tampão TAE (121 g de Tris base, 28,55 ml de ácido acético glacial e 50 ml de EDTA, ajustados para um volume final de 500 ml de água 18 Mohm). Em cada gel foram utilizados como controle negativo água destilada (Life Technologies, Gibco BRL®, Grand island, NY, USA) e como controle positivo DNAs de leptospiros em concentrações de 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 (*L. interrogans*, sorovar copenhageni e cepa M20 para os “primers” A/B e G1/G2 e leptospiros da espécie *L. kirschneri*, sorovar cynopteri e cepa 3522 C para os “primers” B64I/B64II).

4.6.4 Visualização do produto de PCR

Para a visualização dos pares de bases formados utilizou-se luz ultravioleta e programa de análise de imagens EAGLE EYE®. As amostras dos animais capturados foram comparadas

com as amostras dos controles positivos de DNAs de leptospiras em cada gel, tendo sido consideradas positivas todas as amostras que apresentaram bandas iguais ou maiores que os controles positivos de 10^0 DNAs de leptospiras.

4.7 ANÁLISE DE DADOS

Os cálculos entre as comparações dos testes foram realizados utilizando os cálculos de Qui-quadrado, exato de Fischer, com significância de 95% e índice de kappa no programa de análises de dados EPI INFO.

4.7.1 Reservatórios de leptospirose

Foram considerados como reservatórios de leptospirose os animais que obtiveram positividade ao teste de IMC.

4.7.2 Teste de MAT

Foram considerados positivos ao MAT, somente os animais que obtiveram títulos superiores a 1:100 (FAINE, 1999). O teste de MAT somente determinou a que sorogrupo os animais pertenciam, os animais que apresentaram reações misturadas de sorovares de sorogrupos não tiveram seu sorogrupo determinado.

4.7.3 Sorotipagem das amostras

Aqueles isolados testados que obtiveram títulos iguais, nas duas vezes em que foram submetidos ao teste de MAT, com diferença mínima de 10% dos isolados da bateria padrão foram considerados como pertencentes ao mesmo sorovar.

4.7.4 Teste de PCR

Os limites de detecção dos teste de PCR foram estabelecidos através do número mínimo de leptospiras em urina de ratos Wistar infectados com leptospiras (conforme descrição anterior) que apresentaram visualização de bandas.

Para os cálculos de sensibilidade e especificidade do teste de PCR foram incluídos e testados um grupo controle de 20 amostras de urina de ratos de laboratório Wistar e 3 amostras de urina de raposas da espécie *Cerdocyon thous*, oriundas da cidade baiana de Jacobina (testadas negativamente ao IMC). Os cálculos de especificidade e sensibilidade do teste de PCR foram realizados utilizando-se como padrão os testes de IMC (teste padrão ouro para a leptospirose).

Para o cálculo de sensibilidade do teste de PCR em relação ao teste de IMC foram escolhidas todas as amostras positivas ao IMC que foram testadas ao PCR. Através da divisão das amostras verdadeiramente positivas pelas amostras verdadeiramente positivas mais as amostras falso negativas foi obtida a sensibilidade do PCR. Através da divisão das amostras verdadeiramente positivas pelas amostras verdadeiramente positivas mais as

amostras falso positivas foi obtido o valor preditivo positivo do PCR. Para o cálculo de especificidade do teste de PCR foram escolhidas todas as amostras negativas ao IMC que foram testadas ao PCR, inclusive as 20 amostras de urina de ratos Wistar e as amostras das urinas das 4 raposas *Cerdocyon thous* capturadas em Jacobina para o estudo de leishmaniose. Através da divisão das amostras verdadeiramente negativas pelas amostras verdadeiramente negativas mais as amostras falso positivas foi obtida a especificidade do PCR. Através da divisão das amostras verdadeiramente negativas pelas amostras verdadeiramente negativas mais as amostras falso negativas foi obtido o valor preditivo negativo do PCR. Os dados coletados foram colocados em questionário (Anexo 8) e analisados a partir de programa de análise de dados EPIINFO 6.0, distribuído pela OMS.

5 RESULTADOS

5.1 CAPTURAS

Foram colocadas armadilhas em 12 bairros de Salvador (Federação, Brotas, São Caetano, Liberdade, Mata Escura, Dóron, Matatu, Alto do Cruzeiro, Pernambués, Lobato, Ondina e Graça) (Figura 1). Foram capturados ao todo 150 animais, 142 *R. norvegicus* e 8 *D. marsupialis*. Foram realizadas 109 sessões de captura no período de maio de 1998 a março de 1999 em dez bairros de Salvador, excetuando-se o bairro de Ondina. A média de *R. norvegicus* capturados foi de 1,3 animais por sessão de captura (Tabela 2). No bairro de Ondina foram realizadas 5 sessões de captura com a captura de apenas 1 *D. marsupialis*.

Figura 1 - O mapa de Salvador demonstra os locais onde foram capturados animais (circunferências). Os locais circunscritos pelas linhas referem-se a 2006 sítios sensitários da grande Salvador. Os números de casos referidos na legenda correspondem a 708 casos graves de leptospirose humana no período de março de 1996 a março de 1999.

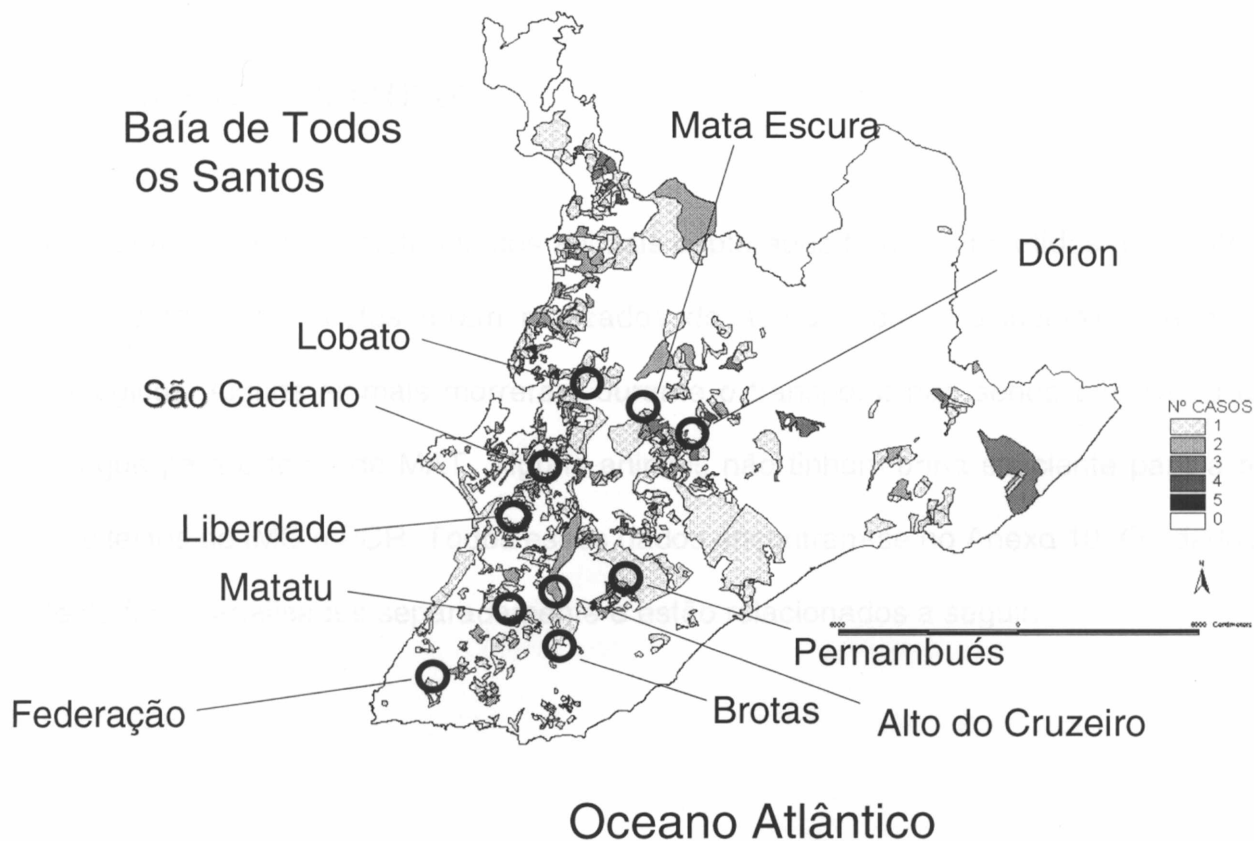


Tabela 2- Demonstração das sessões de captura (cada dia no qual as armadilhas foram armadas em cada local de captura) e o número de animais que foram capturados por sessão. A divisão de Período 1 e Período 2 refere-se, respectivamente, aos períodos de maior e menor precipitação pluviométrica.

Períodos	Período 1													Período 2											Total	
	1998													1999												
	Ano		Mai		Jun		Jul		Ago		Set		Dez		Jan		Fev		Mar							
Número da semana em relação ao mês	4	3	5	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	1	2	1	2	3	4	23 sem	
Total	Capturados	1	7	6	6	2	2	7	6	10	15	9	3	4	6	5	5	13	9	7	2	9	2	3	3	142
	Nº Sessões	1	1	2	3	2	2	1	1	5	5	11	1	2	4	3	6	18	9	3	1	15	4	2	3	109
	Cap / Ani	1	7	3	2	1	1	7	6	2	3,4	0,8	3	2	1,5	1,7	0,8	0,7	1	2,3	2	0,7	0,5	1,5	1	(1,3)
Federação	Capturados	-	7	-	-	-	-	-	-	10	13	4	-	4	2	-	-	-	-	7	2	9	0	1	1	53
	Nº Sessões	-	1	-	-	-	-	-	-	5	4	2	-	2	3	-	-	-	-	3	1	14	1	1	2	39
	Cap / Ani	-	7	-	-	-	-	-	-	2	3,8	2	-	2	0,7	-	-	-	-	2,3	2	0,6	0	1	0,5	(1,3)
Brotas	Capturados	1	-	4	-	2	7	7	6	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
	Nº Sessões	1	-	1	-	2	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
	Cap / Ani	1	-	4	-	1	7	7	6	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(3,6)
São Caetano	Capturados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	12	6	-	-	-	-	-	-	27
	Nº Sessões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	6	12	3	-	-	-	-	-	-	24
	Cap / Ani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	0,8	1	2	-	-	-	-	-	-	(1,3)
Liberdade	Capturados	-	-	2	5	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
	Nº Sessões	-	-	1	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	Cap / Ani	-	-	2	2,5	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1,2)
Mata Escura	Capturados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	0	2	2	2	2	9
	Nº Sessões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	3	1	1	1	7
	Cap / Ani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	0	0,7	2	2	2	(1,3)
Doron	Capturados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	5
	Nº Sessões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	-	-	-	-	-	-	12
	Cap / Ani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,5	-	-	-	-	-	-	(0,4)
Malatu	Capturados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Nº Sessões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
	Cap / Ani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0,4)
Alto do Cruzeiro	Capturados	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Nº Sessões	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	Cap / Ani	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)
Pernambúes	Capturados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Nº Sessões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Cap / Ani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(3)
Lobato	Capturados	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Nº Sessões	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Cap / Ani	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)

5.2 TESTES DIAGNÓSTICOS

O material biológico coletados dos animais capturados foram submetidos aos testes de IMC, MAT e PCR. Os testes foram realizados de acordo com a disponibilidade de materiais biológicos. Alguns animais morreram durante o transporte não sendo possível a coleta de sangue para o teste de MAT. Alguns animais não tinham urina suficiente para a realização dos testes de IMC e PCR. Todos esses dados encontram-se no Anexo 10. Os dados de cada teste foram analisados separadamente e estão relacionados a seguir.

5.2.1 Isolamento em meio de cultura EMJH (IMC)

A urina e o macerado de rim dos 142 *R. norvegicus* e 4 entre os 8 *D. marsupialis* capturados foram submetidos ao teste de IMC. A positividade dos *R. norvegicus* ao IMC foi de 80% (114/142), variando de acordo com o bairro de captura de captura de 55% (15/27) em São Caetano a 100% em Matatu, Pernambués e Lobato. Todos os *D. marsupialis* foram negativos ao teste de IMC (Tabela 3).

Tabela 3 – Isolamento de leptospiros em meio de cultura EMJH dos *R. norvegicus* e *D. Marsupialis* capturados em 11 bairros de Salvador.

Bairros	<i>R. norvegicus</i>			<i>D. marsupialis</i>		
	Total	Positivos	Negativos	Total	Positivos	Negativos
Federação	53	46 (87%)	7 (13%)	2	0	2 (100%)
Brolas	29	27 (93%)	2 (7%)	0	0	0
São Caetano	27	15 (55%)	12 (45%)	0	0	0
Liberdade	9	8 (89%)	1 (11%)	0	0	0
Mata Escura	9	6 (67%)	3 (33%)	1	0	1 (100%)
Dóron	5	3 (60%)	2 (40%)	0	0	0
Matatu	3	3 (100%)	0	0	0	0
Alto do Cruzeiro	3	2 (67%)	1 (33%)	0	0	0
Pernambués	3	3 (100%)	0	0	0	0
Lobato	1	1 (100%)	0	0	0	0
Ondina	0	0	0	1	0	1 (100%)
Total	142	114 (80%)	28 (20%)	4	0	4 (100%)

Dos 142 *R. norvegicus* testados, 6% (9) tiveram as culturas de rim e urina com contaminação de grau 3 e dos 4 *D. marsupialis* testados, 25% (1) teve a cultura de rim e urina com contaminação de grau 3 (Anexo 10). O isolamento de leptospiros utilizando-se como inóculo amostras de urina foi de 76% (87/113) e 71% (86/121) utilizando-se como inóculo macerado

renal. Sete culturas foram negativas para o isolamento de macerado renal e positivas para o isolamento de urina e 9 culturas foram negativas para o isolamento de urina e positivas para o isolamento de macerado renal, o coeficiente kappa foi de 0,56 (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados de isolamento em meio de cultura de leptospiras através de dois inóculos diferentes, tecido renal e urina, nos *R. norvegicus*.

		Urina (92)	
		CULTURA + (66)	CULTURA – (26)
Rim (92)	CULTURA + (68)	59	9
	CULTURA – (24)	7	17

Coeficiente kappa = 0,56

Os resultados do teste de IMC nos *R. norvegicus* variaram em relação ao sexo e as faixas etárias. As fêmeas e os animais adultos tiveram maior positividade. Considerando todos os *R. norvegicus* capturados a positividade das fêmeas adultas foi de 94% (51/54) e das jovens de 100% (5/5). Nos machos adultos a positividade foi de 78% (55/70), os jovens tiveram 42% de positividade (5/12). Essa relação de positividade teve comportamento semelhante em todos os bairros, exceto nos bairros onde não foram capturados animais de todos os sexos e faixas etárias. O bairro que apresentou o maior número de *R. norvegicus* negativos foi o bairro de São Caetano, com 12 animais negativos, entre os machos adultos a negatividade foi de 46% (6/13), entre as fêmeas adultas a negatividade foi de 27% (3/12) e entre os machos jovens a negatividade foi de 100% (3/3) (Tabela 5). Os resultados do teste de IMC nos *D. marsupialis*, quanto a idade e faixa etária, não foram avaliados.

Tabela 5 – Demonstração do isolamento de leptospiros em melo de cultura EHJH do macerado de tecido renal e/ou de urina de *R. norvegicus* (diferentes sexos e faixas etárias) nos dez bairros do município de Salvador, Bahla, capturados e testados durante o período de 24/5/1998 a 30/3/1999.

	Adultos N=124				Jovens N=17			
	Machos N=70		Fêmeas N=54		Machos N=12		Fêmeas N=5	
Total N=141	55 (78%)	15 (12%)	51 (94%)	3 (6%)	5 (42%)	7 (58%)	5 (100%)	0
Bairros	Positivos	Negativos	Positivas	Negativas	Positivos	Negativos	Positivas	Negativas
Federação N=52	18 (90%)	2 (10%)	24 (100%)	0	3 (60%)	2 (40%)	3 (100%)	0
Brotas N=29	17 (94%)	1 (6%)	7 (100%)	0	2 (67%)	1 (33%)	1 (100%)	0
São Caetano N=27	7 (54%)	6 (46%)	8 (73%)	3 (27%)	0	3 (100%)	0	0
Liberdade N=9	5 (83%)	1 (17%)	3 (100%)	0	0	0	0	0
Mata Escura N=9	3 (50%)	3 (50%)	3 (100%)	0	0	0	0	0
Dóron N=5	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0
Matatu N=3	0	0	2	0	0	0	1 (100%)	0
Alto do Cruzeiro N=3	1 (50%)	1 (50%)	1	0	0	0	0	0
Pernambúes N=3	2 (100%)	0	1 (100%)	0	0	0	0	0
Lobato N=1	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0

Foi excluído um *R. norvegicus* do bairro da Federação cujo sexo não foi determinado.

5.2.1.1 *R. norvegicus* testados ao IMC e sua relação ecológica

Foram observadas variações de positividade nos *R. norvegicus* testados ao IMC. Os resultados foram comparados aos casos humanos de leptospirose, variações temporais e variações climáticas. Em bairros que apresentaram poucos casos de leptospirose humana (zero a um) a prevalência de leptospirose entre os *R. norvegicus* foi alta, como observado em Brotas e Matatu. No bairro de São Caetano, onde a prevalência ao teste de IMC nos *R. norvegicus* foi a mais baixa entre todos os bairros estudados, ocorreram de 3 a 6 casos de

leptospirose humana no período do estudo (Figura 2). Ocorreu uma variação temporal da positividade dos *R. norvegicus* testados ao IMC. As positivities foram menores que 50% na segunda semana de julho, 25% (1/4), na primeira semana de janeiro, 33% (2/6) e na segunda semana de janeiro, 14% (1/7). Nas outras 21 semanas de captura as positivities foram maiores que 50% ao teste de IMC. Os dados relativos a essa variação de positividade encontram-se relacionados na Figura 3.

Figura 2 – O mapa de Salvador demonstra o resultado dos *R. norvegicus* testados ao isolamento em meio de cultura e também os casos graves de leptospirose no período de maio de 1998 a março de 1999.

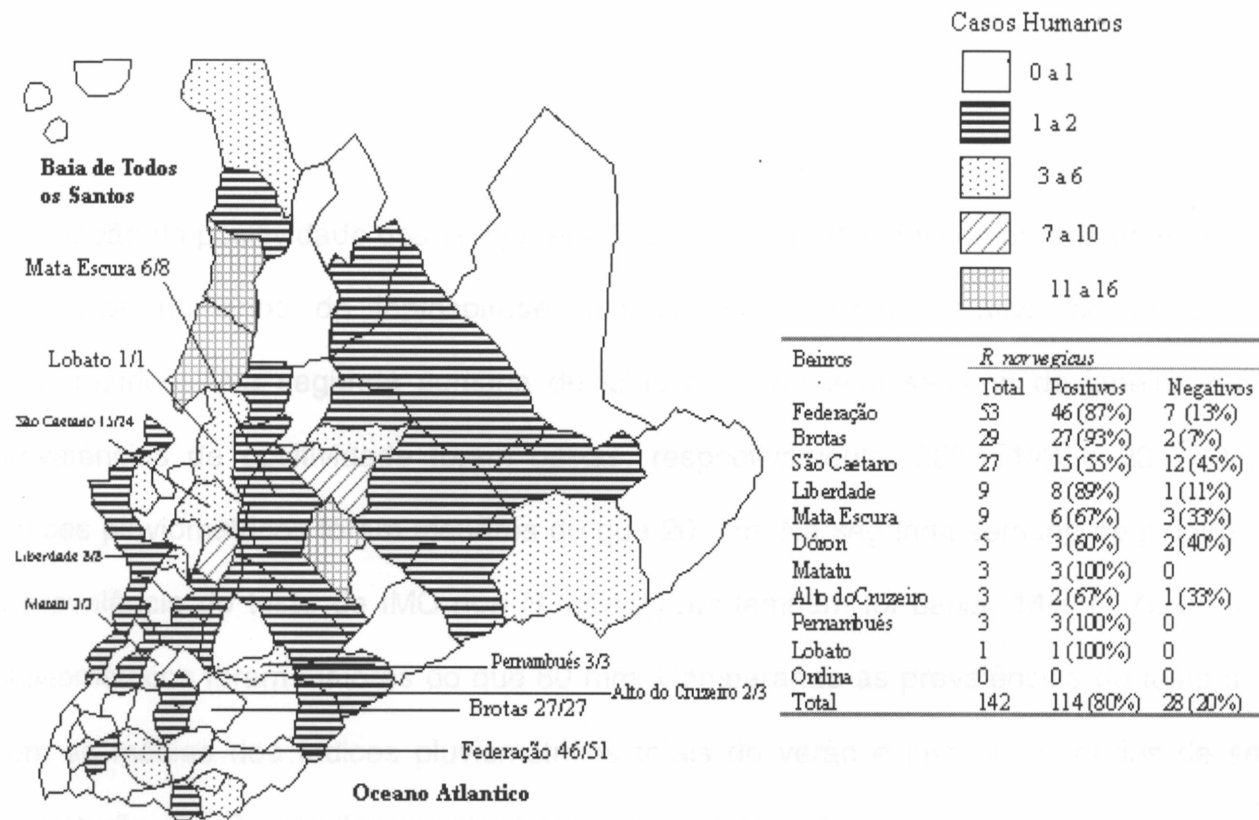
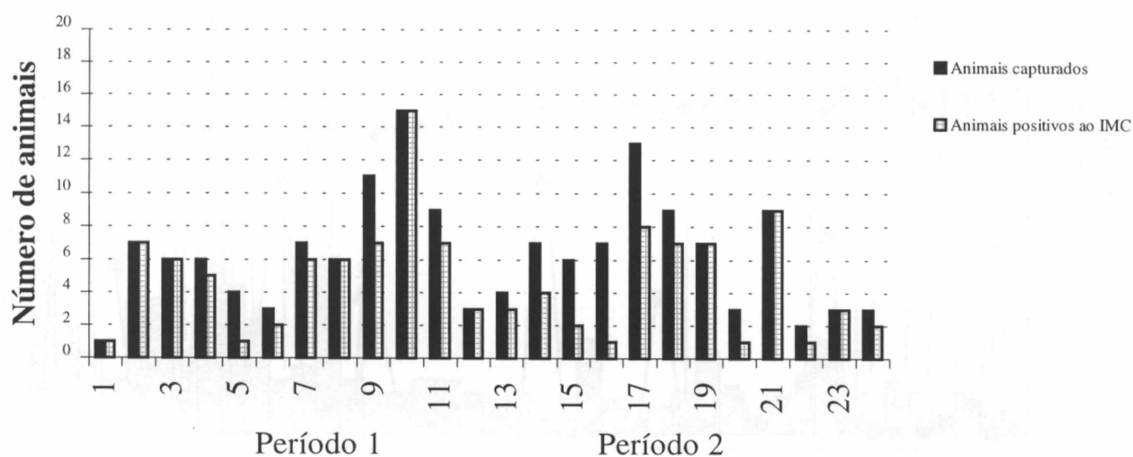
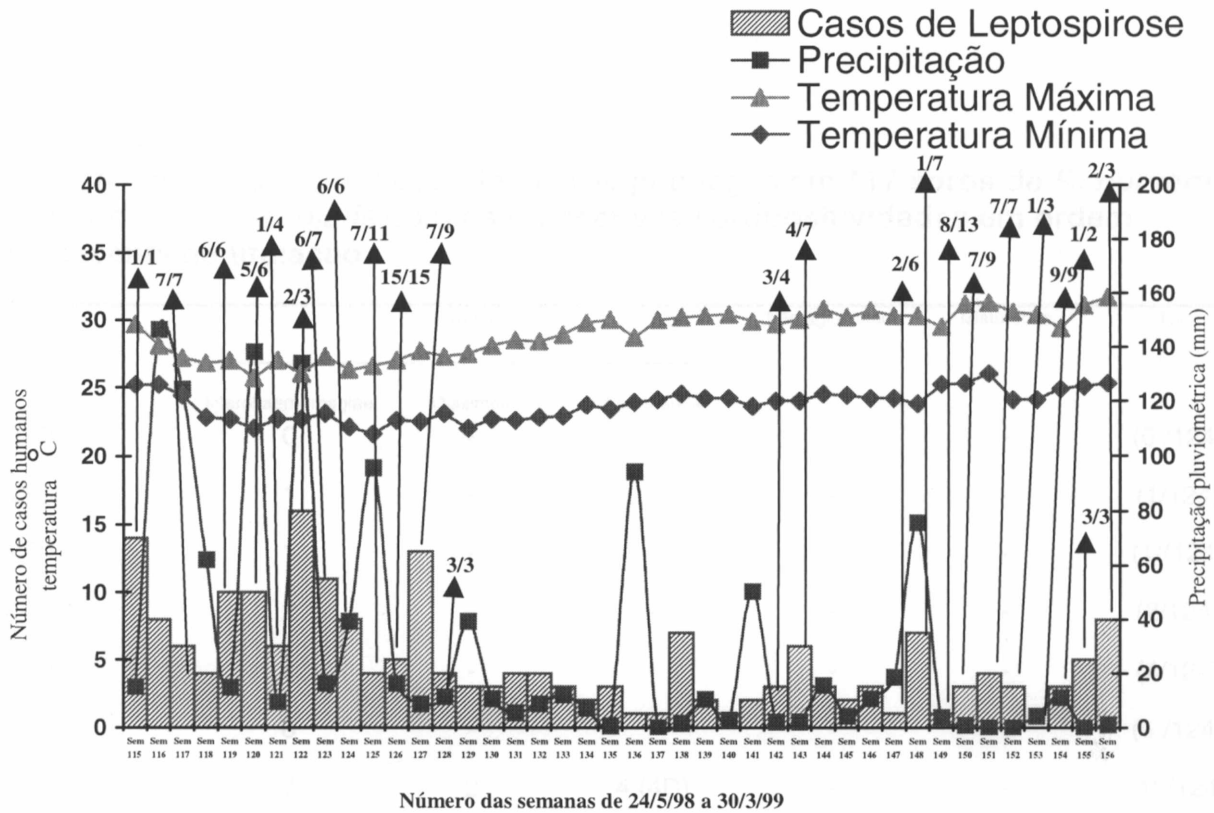


Figura 3 – O gráfico demonstra os *R. norvegicus* testados ao isolamento de leptospiras em meio de cultura EMJH durante as 24 semanas de captura nos períodos de inverno (Período 1, da semana 1 a 15) e de verão (Período 2, da semana 15 a 24).



A variação da positividade dos *R. norvegicus* testados ao IMC foi comparada com os índices de casos humanos de leptospirose, temperatura, umidade relativa do ar e índices pluviométricos. Na segunda semana de julho e na primeira semana de janeiro, onde as prevalências de positividade foram baixas, respectivamente, 25% (1/4) e 33% (2/6), os índices pluviométricos foram menores do que 20 mm. Na segunda semana de janeiro, onde a prevalência do teste de IMC nos *R. norvegicus* também foi baixa, 14% (1/7), os índices pluviométricos foram maiores do que 80 mm. Comparando as prevalências do teste de IMC com as médias dos índices pluviométricos totais do verão e inverno (períodos de seca e chuva) não são observadas correlações positivas (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico dos casos humanos de leptospirose, relacionando temperatura, precipitação pluviométrica e os *R. norvegicus* positivos testados ao isolamento em meio de cultura EMJH (setas), durante 24/5/98 a 30/3/99.



5.2.2 Teste de microaglutinação (MAT)

Foram testados 124 soros pelo teste de MAT, sendo 117 soros de *R. norvegicus* e 7 soros de *D. marsupialis*. A positividade nos soros dos *R. norvegicus* foi de 68% (80/117) e os títulos variaram de 1:50 a 1:12800. O título de maior prevalência foi o 1:200. Foram considerados positivos somente os animais com título maior que 1:100, 3,5% (3/80) tiveram reações misturadas (títulos de 1:200 entre sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Autumnalis, 1:400 entre os sorogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae e 1:1600 aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Djasiman) e foram excluídos dos resultados para a determinação do sorogrupo. Os sorogrupos determinados foram Icterohaemorrhagiae 96% (74/77) e Djasiman

4% (3/77). Os *D. marsupialis* tiveram 71% (5/7) de positividade para o sorogrupo Semarang, quatro pertencentes ao sorovar patoc e um pertencente ao sorovar sentot (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados do teste de microaglutinação em 117 soros de *R. norvegicus* e 7 soros de *D. marsupialis* com as respectivas soropositividades em ordem decrescente de titulação.

Título	Sorogrupo			Não aglutinados	Misturados	Total
	Icterohaemorrhagiae	Djasiman	Semarang			
51600	0	-	-	-	-	(0/124)
12800	1	-	-	-	-	(1/124)
6400	1	-	-	-	-	(1/124)
50	2	-	-	-	-	(2/124)
3200	4	-	-	-	-	(4/124)
1600	8	-	-	-	1	(9/124)
100	7	2	4 (4D)	-	-	(13/124)
400	13	-	-	-	1	(14/124)
800	17	-	-	-	-	(17/124)
200	23	1	1 (1D)	-	1	(26/124)
0	-	-	-	37(2D)	-	(37/124)
Total	76	3	5 (5D)	37(2D)	3	124 (7D)

Os (XD) representam o número de *D. marsupialis*, os demais são *R. norvegicus*.

No teste de MAT nos *R. norvegicus* a prevalência foi maior nas fêmeas do que nos machos; e, nos jovens, do que nos adultos. Nas fêmeas adultas foi de 77% (37/48) e machos adultos foi de 60% (36/60). A positividade fêmeas jovens foi de 100% (4/0) e nos machos jovens foi de 80% (4/5) (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados do teste de microaglutinação no soro dos *R. norvegicus* capturados em dez bairros do município de Salvador, Bahia, durante o período de 24/5/1998 a 30/3/1999. Os animais estão separados por bairros, sexo e faixa etária.

Bairros	Adultos (108)				Jovens (9)			
	Machos (60)		Fêmeas (48)		Machos (5)		Fêmeas (4)	
	Positivos (36) (60%)	Negativos (24) (40%)	Positivas (37) (77%)	Negativas (11) (23%)	Positivos (4) (80%)	Negativos (1) (20%)	Positivas (4) (100%)	Negativas (0)
Federação (50)	11 (62%)	7 (38%)	20 (83%)	4 (17%)	4 (80%)	1 (20%)	3 (100%)	0
Brotas (26)	12 (64%)	7 (36%)	5 (84%)	1 (16%)	0	0	1 (100%)	0
SãoCaetano (18)	6 (58%)	5 (42%)	4 (57%)	3 (43%)	0	0	0	0
Liberdade (9)	2 (40%)	4 (60%)	1 (33%)	2 (67%)	0	0	0	0
Mata Escura (5)	1 (50%)	1 (50%)	3 (100%)	0	0	0	0	0
Dóron (2)	0	0	2 (100%)	0	0	0	0	0
Matalu (2)	0	0	1 (50%)	1 (50%)	0	0	0	0
Alto do Cruzeiro (1)	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0
Pernambúes (3)	2 (100%)	0	1 (100%)	0	0	0	0	0
Lobato (1)	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0

Foi excluído um *R. norvegicus* cujo sexo não foi determinado.

5.2.2.1 Comparação entre IMC e MAT

Os testes de IMC e MAT quando interpretados conjuntamente para obtenção da positividade dos *R. norvegicus* a ao menos um dos testes determina uma prevalência de 87% (124/142).

A comparação entre todos os animais, nos quais foram realizados os dois testes, demonstrou que 89% (100/112) dos *R. norvegicus* apresentaram positividade a pelo menos um dos testes, 25% (25/100) apresentaram-se positivos ao IMC e negativos ao MAT 33% (4/12)

apresentaram-se negativos ao IMC e positivos ao MAT. A sensibilidade do MAT em relação ao IMC é de 75% (75/100). O coeficiente kappa foi de 0,23 (Tabela 8). Os resultados dos *D. marsupialis* não foram comparados, pois, todos foram negativos ao IMC, prevalecendo os resultados somente do MAT, citados anteriormente.

Tabela 8 – Comparação dos testes de microaglutinação (MAT) no soro e isolamento de leptospiras em meio de cultura EMJH(IMC) de 112 *R. norvegicus*.

		IMC (112)	
		IMC + (100)	IMC – (12)
MAT (112)	MAT + (79)	75	4
	MAT – (33)	25	8

Coeficiente kappa = 0,23

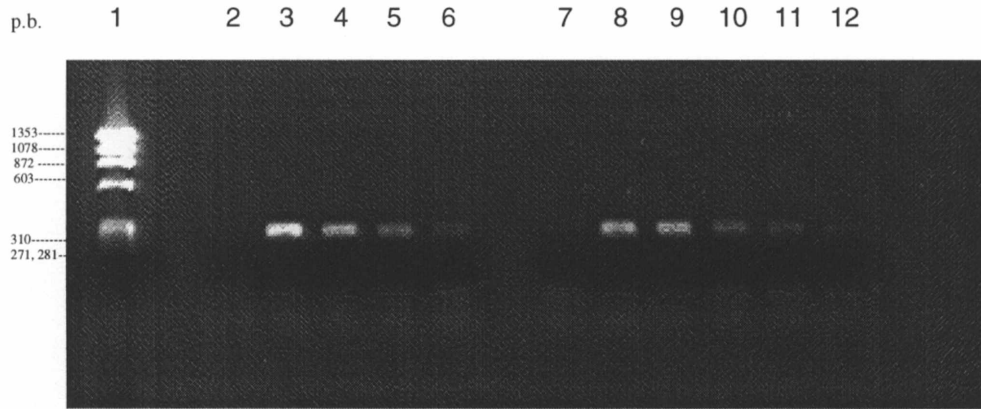
5.2.3 Sorotipagem dos isolados e comparação dos reservatórios e casos humanos

Foram encaminhadas 59 amostras dos isolados de leptospiras em IMC ao CNRL para que fosse realizada a sorotipagem dessas amostras. Todas as amostras foram sorotipadas como pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, 32 de Brotas, 16 da Federação, 7 da Liberdade, 3 de Matatu e 1 de Lobato.

5.2.4 Teste de PCR

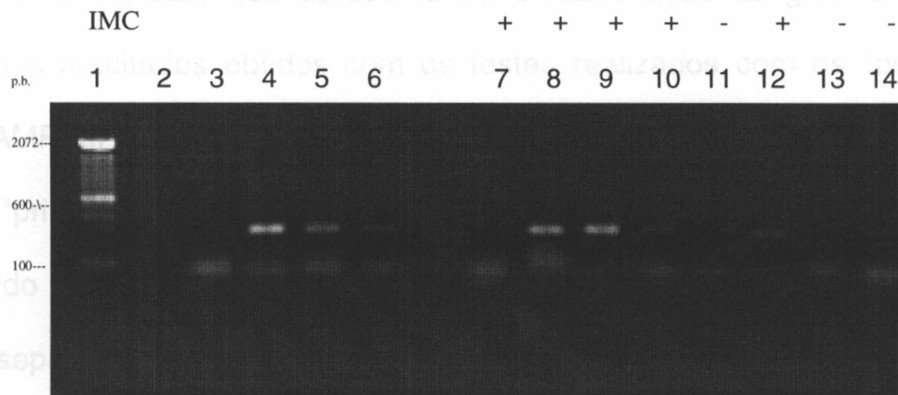
No teste de PCR o limite de detecção estabelecido para os "primers" de GRAVEKAMP *et al.*, 1993 foi de 1 leptospira (Figura 5). Os animais foram testados separadamente para esse tipo de "primer" (Figura 6), utilizando também como controles negativos a urina de ratos Wistar de laboratório

Figura 5 – Limite de detecção de leptospiiras do teste de reação em cadeia da enzima Taq DNA polimerase em urina de ratos Wistar utilizando os "primers" G1/G2 de GRAVEKAMP, et al., 1993.



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o limite de detecção do teste de PCR em urina de ratos Wistar. O sorovar de leptospira utilizado foi o copenhageni e os "primers" foram os G1 e G2 que determinam 284 pares de bases. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado ϕ X174, ao lado estão os números de pares de base que o marcador determina. Nos poços 3, 4, 5 e 6 estão, respectivamente, 1000, 100, 10 e 1 DNAs de leptospiiras fervidos e diluídos em água destilada. No poço 7 está o controle negativo com água destilada centrifugada em urina de rato Wistar. Nos poços 8, 9, 10, 11 e 12 estão, respectivamente, 10000, 1000, 100, 10 e 1 DNAs de leptospiiras centrifugadas em urina de rato Wistar.

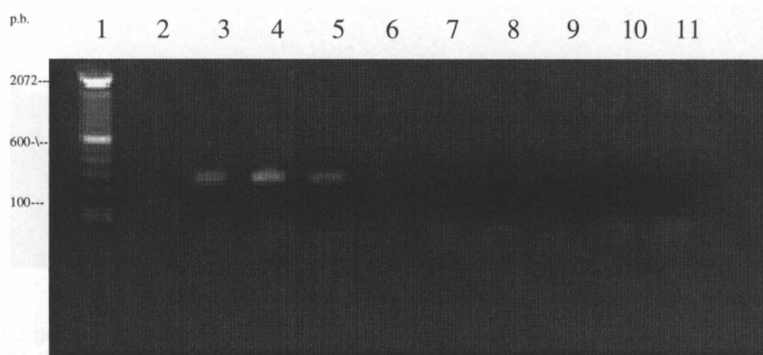
Figura 6 – Teste de reação em cadeia da enzima Taq DNA polimerase para leptospiiras em urina de *R. norvegicus* utilizando os "primers" G1 e G2 de GRAVEKAMP, et al., 1993.



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o teste de PCR realizado na urina de *R. norvegicus* com os "primers" G1 e G2. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado DNA ladder 100, ao lado esquerdo estão os números de pares de base que o marcador determina. No poço 2 está o controle negativo com água destilada. Nos poços 3, 4, 5 estão, respectivamente, 100, 10 e 1 DNAs de leptospiiras fervidos. No poço 7 está o controle negativo de água destilada centrifugada em urina de ratos Wistar. Nos poços 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 estão as urinas dos *R. norvegicus* de número 92, 93, 96, 102, 125, 134, 136 e 148. Acima da numeração dos poços estão os resultados dos testes de isolamento em meio de cultura EMJH (IMC) nos animais.

(Figura 7) e as urinas dos *D. marsupialis* e dos *C. thous* somando ao todo 87 testes, 61 nos *R. norvegicus*, 3 nos *D. marsupialis*, 3 nos *C. thous* e 20 nos ratos de laboratório Wistar.

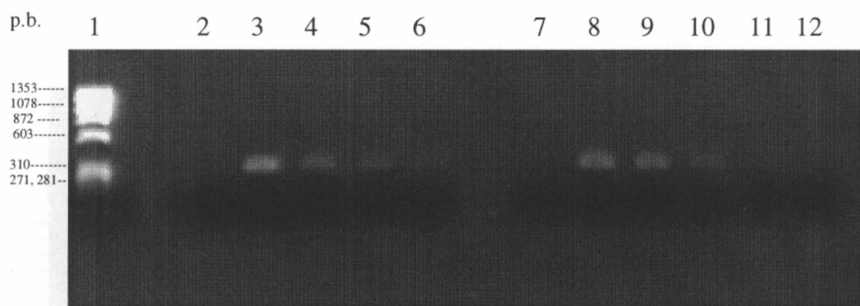
Figura 7 – Animais testados ao PCR com os primers de GRAVEKAMP, et al., 1993 e seus controles negativos



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o teste de PCR realizado na urina de *R. norvegicus* com os "primers" G1 e G2. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado DNA ladder 100, ao lado esquerdo estão os números de pares de base que o marcador determina. No poço 2 está o controle negativo com água destilada. Nos poços 3, 4, 5 e 6 estão, respectivamente os *R. norvegicus* 144, 145, 146 e 147. Nos poços 7, 8, 9, 10 e 11 estão as urinas dos ratos Wistar números 16, 17, 18, 19 e 20. Acima da numeração dos poços estão os resultados dos testes de isolamento em meio de cultura EMJH (IMC) nos animais.

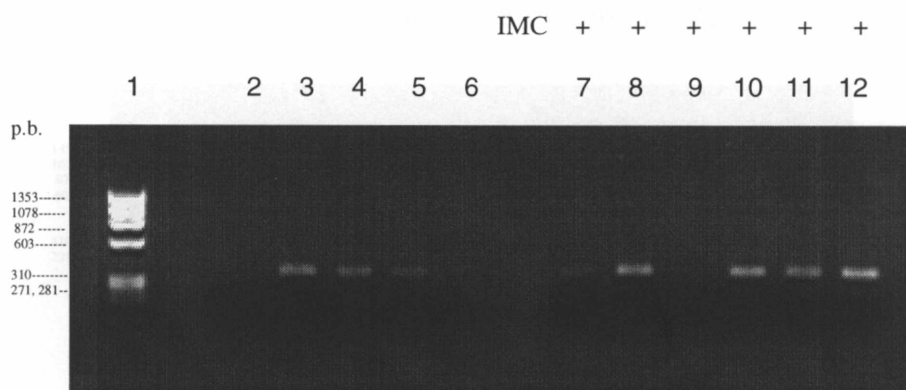
Para o cálculo da sensibilidade e da especificidade do teste de PCR foram excluídos dois animais (*R. norvegicus*) que apresentaram contaminação de grau 3 no IMC e resultado negativo. Os resultados obtidos com os testes realizados com os "primers" G1 e G2 de GRAVEKAMP, et al., 1993, foram somados aos testes realizados com os dois outros tipos de pares de "primers" para o cálculo da sensibilidade e especificidade. O limite de detecção estabelecido para os "primers" foi de 10 leptospiiras (Figura 8). Os animais então foram testados separadamente para esse tipo de "primer" (Figura 9), utilizando também como controles negativos a urina de ratos Wistar (Figura 10) e as urinas dos *D. marsupialis* e dos *C. thous* somando ao todo 90 testes, 62 nos *R. norvegicus*, 5 nos *D. marsupialis*, 3 nos *C. thous* e 20 nos ratos de laboratório Wistar.

Figura 8 – Limite de detecção de leptospiras icterohaemorrhagiae do teste de reação em cadeia da enzima Taq DNA polimerase em urina de ratos Wistar utilizando os "primers" de MÉRIEN, *et al.*, 1992.



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o limite de detecção do teste de PCR em urina de roedores. O sorovar de leptospira utilizado foi o copenhageni, a urina foi de ratos Wistar e os "primers" foram os de Mérien (A e B), que determinam 331 pares de bases. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado ϕ X174, ao lado estão os números de pares de base que o marcador determina. No poço 2 está o controle negativo com água destilada. Nos poços 3, 4, 5 e 6 estão, respectivamente, 1000, 100, 10 e 1 DNAs de leptospiras fervidos. No poço 7 está o controle negativo com água destilada centrifugada em urina de rato Wistar. Nos poços 8, 9, 10, 11 e 12 estão, respectivamente, 10000, 1000, 100, 10 e 1 leptospiras centrifugadas em urina de rato Wistar.

Figura 9 - Teste de reação em cadeia da enzima Taq DNA polimerase para leptospiras em urina de *R. norvegicus* utilizando os "primers" de MÉRIEN, *et al.*, 1992.



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o teste de PCR realizado na urina de *R. norvegicus* com os "primers" A e B. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado ϕ X174, ao lado estão os números de pares de base que o marcador determina. No poço 2 está o controle negativo com água deionizada. Nos poços 3, 4, 5 e 6 estão, respectivamente, 1000, 100, 10 e 1 DNAs de leptospiras fervidos. Nos poços 7, 8, 9, 10, 11 e 12 estão as urinas dos *R. norvegicus* de número 107, 120, 129, 130, 135 e 141. Acima da numeração dos poços estão os resultados dos testes de isolamento em meio de cultura EMJH (IMC) nos animais.

Figura 10 - Teste de reação em cadeia da enzima Taq DNA polimerase para leptospiros em urina de *R. norvegicus* e ratos de laboratório Wistar utilizando os “primers” de MÉRIEN, *et al.*, 1992.

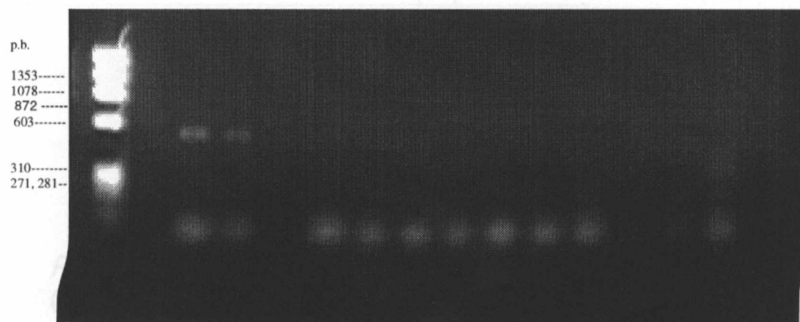
	IMC		+	+	+	+					
p.b.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o teste de PCR realizado na urina de *R. norvegicus* com os “primers” A e B. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado DNA ladder 100, ao lado estão os números de pares de base que o marcador determina. No poço 2 está o controle negativo com água destilada. Nos poços 3, 4, 5 e 6 estão, respectivamente os *R. norvegicus* 144, 145, 146 e 147. Nos poços 7, 8, 9, 10 e 11 estão as urinas dos ratos Wistar números 16, 17, 18, 19 e 20. Acima da numeração dos poços estão os resultados dos testes de isolamento em meio de cultura EMJH (IMC) nos animais.

Figura 11 – Teste de reação em cadeia da enzima Taq DNA polimerase para leptospiros em urina de *R. norvegicus* utilizando os “primers” B64I/II de GRAVEKAMP, *et al.* 1993

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----



A imagem acima demonstra o gel de agarose iluminado com luz ultravioleta e capturado em programa de análises de imagem Eagle Eye. Esse gel demonstra o teste de PCR realizado na urina de *R. norvegicus* com os “primers” B64I/II. No poço 1 está o marcador de pares de bases denominado ϕ X174, ao lado estão os números de pares de base que o marcador determina. No poço 2 está o controle negativo com água deionizada. Nos poços 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 estão as urinas dos *R. norvegicus* de número 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 55, 71 e 82. Acima da numeração dos poços estão os resultados do teste de isolamento de leptospiros em meio de cultura EMJH (IMC) nos animais.

Para o cálculo da sensibilidade e da especificidade do teste de PCR foram excluídos dois testes realizados com o *R. norvegicus*, pois apresentaram contaminação de grau 3 no IMC e resultados negativos. Os resultados obtidos com os testes realizados com os "primers" de Mérien, *et al.*, 1992 foram somados aos testes realizados com os dois outros tipos de pares de "primers" para o cálculo da sensibilidade e especificidade. Para os cálculos de especificidade do teste de PCR foram utilizados 61 *R. norvegicus*, 3 *D. marsupialis*, 3 *C. thous* e 20 ratos de laboratório Wistar. A especificidade foi de 97% (32/33). A sensibilidade foi de 89% (48/54). O valor preditivo positivo foi de 98% (48/49) e o valor preditivo negativo foi de 84% (32/38) (Tabela 9). Os resultados dos testes em cada um dos animais encontram-se no Anexo 9.

Tabela 9 – Tabela comparativa entre os testes de isolamento em meio de cultura (IMC) e PCR

	Animais capturados <i>Rattus norvegicus</i> <i>Didelphis marsupialis</i> (64)		Animais Laboratoriais e <i>Cerdocyon thous</i> (23)
	IMC + (54)	IMC – (10)	
PCR + (49)	48	1	0
PCR (84)			
PCR – (38)	6	9	23

6 DISCUSSÃO

O trabalho foi desenvolvido no meio urbano visando a identificação de reservatórios animais sinantrópicos de leptospirose em Salvador, Bahia. Os reservatórios animais de leptospirose são responsáveis pela manutenção da leptospira viva e sua disseminação no ambiente. A leptospira pode sobreviver e multiplicar-se fora dos organismos animais, desde que existam ácidos graxos disponíveis, no entanto, a presença de reservatórios animais é determinante para o estabelecimento da doença. No meio urbano, de um modo geral, os principais reservatórios de leptospirose são os *R. norvegicus* e os *R. rattus*.

Um dos principais estudos a respeito de leptospirose em Salvador foi realizado na década de 50 por ANDRADE & OLIVEIRA, 1954, através do teste de Levaditi com a captura do *R. rattus* e do *R. norvegicus*. Os autores determinaram somente os *R. norvegicus* como sendo reservatório de leptospirose. Após esse estudo CALDAS *et al.*, 1979 determinaram como prováveis fontes de infecção água, esgoto, rato, lama e o lixo. Na década de 90 CALDAS *et al.*, 1992 examinaram hemossoros de *R. norvegicus* e de *D. marsupialis* encontrando os sorovares grippothyphosa, icterohaemorrhagiae e australis para o primeiro grupo de animais e o sorovar patoc para o segundo grupo, na porcentagem de 20% para ambos os animais. Após esses estudos não foram realizados outros estudos examinando reservatórios de leptospirose em Salvador, deixando uma grande lacuna no conhecimento dos reservatórios da doença no município.

Segundo dados de 1991 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), da década de 50 até a década de 90 ocorreu um aumento de 350% no número de casos da doença no Brasil. A mudança dos padrões epidemiológicos da doença (de uma doença ocupacional

para uma doença com epidemias urbanas) acompanharam o aumento do número de casos humanos o que provavelmente deve ter sido seguido por aumento no número de reservatórios urbanos da doença. A comparação dos dados de ANDRADE & OLIVEIRA, 1954 em relação aos dados atuais demonstram que ocorreu um aumento na prevalência de leptospiros nos *R. norvegicus* de 29,25% em 1954 pelo teste de Levaditi para 80% de positividade ao teste de IMC em 1999. Os dois tipos de testes têm diferenças quanto a sensibilidade e especificidade que serão discutidas nos próximos tópicos, no entanto, mesmo considerando que o teste de IMC é mais sensível do que o teste de Levaditi, as diferenças de prevalência são altas, indicando um provável aumento na prevalência de leptospiros nos *R. norvegicus* neste período. Em 1954 foram capturados três *R. rattus* que não foram positivos ao teste de Levaditi, no estudo de CALDAS, *et al.*, 1992 e no presente estudo foram capturados somente *R. norvegicus* e *D. marsupialis*. De um modo geral o *R. rattus* está mais associado ao meio rural, na década de 50, provavelmente, ainda havia características geográficas mais semelhantes ao meio rural na cidade de Salvador, o que justificaria a captura desses animais. Evidentemente isso não esgota a possibilidade de ocorrência de *R. rattus* em localidades não pesquisadas nesse estudo. O *D. marsupialis* é um marsupial comum no território nacional e é visualizado à noite, em regiões de Mata Tropical ainda remanescentes na cidade. Não foram isoladas leptospiros nos *D. marsupialis* ao teste de IMC, determinando assim, de acordo com os estudos realizados, que o *R. norvegicus* é, provavelmente, o principal reservatório sinantrópico de leptospirose de Salvador, desde a década de 50.

A colocação das armadilhas a partir da identificação dos casos de leptospirose humana mostrou-se adequada para a identificação dos reservatórios de leptospirose. Os casos

humanos direcionaram a localização dos reservatórios. Os bairros de Ondina e da Graça foram escolhidos com sendo bairros onde não ocorreram a doença humana, no entanto, devido a baixa média de captura por sessão de captura as capturas nesses locais foram suspensas. Os bairros onde não ocorrem a leptospirose humana as capturas de roedores são dificultosas. Embora, casualmente, sejam vistos *R. norvegicus* circulando por esses locais os animais escondem-se em esgotos canalizados e a sua circulação em residências é menos freqüente do que nos bairros onde ocorre a leptospirose. Provavelmente esse fator esteja ligado aos fatores de risco, muito em bora os *R. norvegicus* desses locais possam também albergar o parasita.

A metodologia empregada para a captura dos animais foi a metodologia utilizada para o estudo de reservatórios de doenças infecciosas (MILLS *et al.*, 1995) e reservatórios de leptospirose (FAINE, 1999). A captura de animais vivos permitiu a retirada de sangue e a obtenção de material biológico íntegro. Os animais que morreram durante o transporte foram necropsiados e encontram-se no Anexo 9. Os sete animais que foram necropsiados foram incluídos no estudo, pois três deles apresentaram cultura positiva. A explicação para os animais positivos pode ser dada pela sobrevivência da leptospira na urina por algumas horas. O tamanho dos gradis das armadilhas utilizadas (20X20mm) não permitiu a captura de *R. norvegicus* muito jovens e de *M. musculus*.

A média de captura foi de 1,3 *R. norvegicus* por sessão de captura. Não foram realizadas comparações entre as médias de captura de outros trabalhos, pois, não existem esses tipos de dados em trabalhos realizados com capturas de *R. norvegicus*. A média de captura dos animais pode servir de apoio para estudos futuros, como previsões da quantidade de animais

que poderão ser capturados, estabelecimento de dados de infestação de roedores para avaliação do impacto de programas de detetização e estudos ecológicos de uma forma geral. Uma das aplicações imediatas para esses tipos de dados no Brasil é que até o presente a Fundação Nacional de Saúde ainda não estabeleceu os parâmetros para a estimativa de infestação de roedores, informação essencial para o direcionamento das campanhas de combate a roedores, nos programas de combate a leptospirose e outras doenças transmitidas pelos mesmos.

A captura de 142 *R. norvegicus* e oito *D. marsupialis* demonstra que esses animais são os principais animais sinantrópicos que habitam as vizinhanças das residências no município de Salvador e que são os potenciais reservatórios de leptospirose. As duas espécies animais não são susceptíveis a doença e podem eliminar leptospiras nos esgotos, lamaçais, lavanderias, cozinhas, hortas e matagais, onde existem condições de umidade, pH e temperatura adequadas para a sobrevivência das leptospiras. O *R. norvegicus* é um reservatório clássico da leptospirose, principalmente no meio urbano, responsável por carrear os sorovares mais patogênicos como o icterohaemorrhagiae e o copenhageni. O *D. marsupialis* é um marsupial que já foi determinado como carreador de um sorovar denominado bratislava (SANTA ROSA, 1970), não existem dados a respeito de doença humana ocasionada por esse sorovar e carreador do sorovar patoc (CALDAS, *et al.*, 1992), não patogênico. O presente estudo determinou o *R. norvegicus* como sendo reservatório de leptospirose através do teste de IMC. No *D. marsupialis* foram determinadas reações de anticorpos contra leptospiras vivas crescidas em meio de cultura, o que não determina a presença ativa do parasita e não o classifica como sendo reservatório de leptospirose. Os dados acima apontam o papel do *R. norvegicus* como o principal reservatório sinantrópico de

leptospirose em Salvador. Não foi possível determinar com exatidão papel do *D. marsupialis*, devido a pouca quantidade de animais capturados, no entanto, pelos achados esses animais são resistentes a leptospirose e não carregam parasitas vivos.

Os testes diagnósticos empregados para o estudo da leptospirose foram o IMC, o MAT e o PCR. O IMC e o MAT são os mais utilizados para o diagnóstico de leptospirose em animais, são considerados padrão ouro e indicados pela OMS. O PCR é um método de diagnóstico rápido preconizado para o diagnóstico de doenças infecciosas e foi desenvolvido e testado para que pudesse ser avaliada a sua eficiência como teste de diagnóstico rápido para identificação de reservatórios animais de leptospirose. Os problemas citados em literatura quanto a laboriosidade dos testes de IMC e MAT foram confirmados nesse estudo. O IMC requer leituras semanais que duram até oito semanas no caso dos *R. norvegicus*. O MAT requer a manutenção de uma bateria de leptospiras vivas com repiques semanais (nesse estudo 23 sorovares diferentes) que são colocados em reação com cada amostra testada, limitando o número de amostras a ser testada a cada exame, pelo grande número de sorovares diferentes. Além disso, as leituras têm sido realizadas em menos de duas horas, necessitando de duas pessoas do teste e a titulação tem que ser feita em até 24 horas após a triagem, para que os anticorpos ainda estejam preservados.

No presente estudo o PCR mostrou-se adequado para a identificação dos reservatórios, no entanto, nos estudos onde são necessários dados a respeito dos sorovares e o isolamento do parasita, os testes de IMC e de MAT ainda são necessários. O teste de MAT permite identificação do sorogrupo do parasita de um modo mais rápido e o teste de IMC consegue-se dispor do parasita em meio de cultura, permitindo estudos de patogenese e a identificação

do sorovar do parasita através da sorotipagem. A utilização de três pares de "primers" distintos utilizados nesse estudo permitiu a identificação de leptospiras de espécies diferentes, pois os "primers" A e B detectam sete bactérias patogênicas e uma não patogênica, os pares G1 e G2 detectam seis bactérias patogênicas menos a *L. kirshneri* e os pares B64I e B64II detectam apenas a espécie *L. kirshneri* (MÉRIEN *et al.*, 1992, GRAVEKAMP *et al.*, 1993). Para o cálculo da sensibilidade e especificidade e valores preditivos do teste de PCR foi utilizado o teste de IMC. A especificidade de 97% e a sensibilidade de 89% do PCR demonstraram que a aplicabilidade da técnica em animais sinantrópicos é viável. Em estudos futuros o PCR permitirá trabalhos de identificação de reservatórios com maior rapidez, poderão ser identificados outros tipos de reservatórios como cães e animais silvestres.

A prevalência de anticorpos antileptospiras no soro dos *R. norvegicus* testados ao IMC foi de 80% (114/133). A positividade encontrada de 80% demonstra a maior positividade de IMC encontrada na literatura mundial. Os trabalhos de reservatórios testados ao IMC, mais antigos e anteriores as epidemias urbanas de leptospirose, apresentaram prevalências menores. Em São Paulo no ano de 1948, 15,05% de 259 *R. norvegicus* foram positivos para a leptospirose pela cultura de macerado de fragmentos renais (GOMES *et al.*, 1950). Em Barbados nos anos de 1964/65 a positividade ao IMC de fragmentos de tecido renal e exame direto ao microscópio de campo escuro foi de 27% (37/138) para os *R. norvegicus* e 15% (15/98) para os *R. rattus* (TAYLOR *et al.*, 1991). Em Israel no ano de 1956, 14% (13/56) dos *R. rattus* e 26% (5/35) dos *R. norvegicus* foram positivos ao teste de IMC de fragmentos de tecido renal (HOEDEN & SZENBERG, 1956). Em trabalhos realizados no meio rural os índices de positividade são muito baixos, quando comparados aos índices do meio urbano.

Na Inglaterra entre os anos de 1991 e 1993 em fazendas nos municípios de Oxfordshire, North Wales e Hampshire a positividade foi 4% (8/219) nos *R. norvegicus* ao teste de IMC em fragmentos de tecido renal (WEBSTER *et al.*, 1995).

Em trabalhos mais recentes, em locais onde a leptospirose é uma doença de impacto na saúde pública e ocorrem epidemias urbanas, os índices de positividade ao IMC ainda são menores do que os desse estudo, mais apresentam índices de positividade mais altos em relação aos trabalhos antigos e aos realizados no meio rural. No meio urbano a positividade que mais se aproximou foi à do presente estudo foi a da cidade de Detroit, Michigan, EUA, entre os anos de 1975/76, onde, 59,2% (221/373) dos *R. norvegicus* foram positivos ao teste de IMC em fragmentos de tecido renal (THIERMANN, 1983), no entanto, em Detroit a leptospirose humana não é considerada uma doença de muita importância. Em Barbados foram capturados animais nos arredores domésticos e em fazendas, nos anos de 1986/87 a positividade foi 19% (12/63) (26 *R. rattus* e 37 *R. norvegicus*) e nos anos de 1994/95 a positividade foi de 16% (16/100) (24 *R. rattus* e 76 *R. norvegicus*) para o teste de IMC em sangue, urina e fragmento de tecido renal (LEVETT *et al.*, 1998).

Todos esses dados da literatura mundial a respeito do teste de IMC de leptospiras em *R. norvegicus*, nos diversos ambientes os quais podem ser encontrados casos de leptospirose humana (meio urbano sem epidemias da doença; em épocas mais antigas, antes das epidemias urbanas mundiais; nos trabalhos mais recentes, em locais de epidemias urbanas e no meio rural) indicam o *R. norvegicus* como reservatório cosmopolita da doença. O fato do presente estudo determinar um índice de positividade maior do que os outros estudos estabelece que provavelmente o alto índice de prevalência do leptospiras nos *R. norvegicus*

de Salvador seja um fator determinante para o aumento dos fatores de risco associados a doença.

Os dados do presente estudo demonstram que o teste de IMC é adequado para o estudo de reservatórios com uma sensibilidade muito alta e pode ser usado com segurança para o diagnóstico de leptospiras em reservatórios de leptospirose e como teste padrão para outros testes diagnósticos. Entretanto, existem os problemas para a realização do teste, considerando que ele é um teste demorado, pois o tempo para o crescimento de leptospiras varia de 1 a 8 semanas, com a necessidade de ser lido semanalmente. Algumas espécies de leptospira talvez não cresçam no meio EMJH, seja por competição com outra espécie ou no caso de reservatórios com infecções mistas com mais de uma espécie, ou por contaminação com outros microorganismos presentes normalmente na microfiora da urina dos animais, ou pela não adaptação de leptospiras “selvagens” as condições biológicas do meio de cultura. A contaminação com outros microorganismos pode ser visualizada na observação ao microscópio de campo escuro. Culturas com uma contaminação superior a 60 microorganismos contaminantes a observação em objetiva de 40X foram descartadas para o uso do IMC como padrão para o cálculo da sensibilidade e especificidade do teste de PCR, pois esses microorganismos poderiam estar competindo com as leptospiras e inibindo o seu crescimento.

O estudo demonstrou uma maior positividade ao teste de IMC nos *R. norvegicus* adultos quando comparados aos animais jovens (90%, 106/118, nos adultos e 71%, 10/14, nos jovens). Todos os estudos que fizeram essa comparação também obtiveram esses resultados, em São Paulo, no ano de 1948, 6,25% dos *R. norvegicus* jovens eram positivos

ao isolamento de fragmentos renais em meio de cultura em relação a 15,63% de positividade dos *R. norvegicus* adultos. No Rio de Janeiro 9,7% dos jovens eram positivos em relação a positividade de 58,7% dos adultos ao isolamento em cultura de fragmentos renais (PEREIRA & ANDRADE, 1988). Em Salvador, 49,3% dos jovens eram positivos em relação a positividade de 50,7% dos adultos ao teste de impregnação em prata do tecido renal (ANDRADE & OLIVEIRA, 1954). Em Detroit, 13,5% dos *R. norvegicus* jovens apresentavam positividade ao isolamento em meio de cultura de fragmentos de tecido renal, em relação a positividade de 75,1% dos *R. norvegicus* adultos (THIERMANN, 1983). Deste modo, todos os achados comprovam a maior positividade dos animais adultos em relação aos animais jovens. O fato pode ser explicado pela transferência de anticorpos maternos aos animais jovens, muito embora, as infecções de leptospiros através da placenta e do leite materno também sejam admitidas; também por sucessivas infecções dos animais adultos devido ao grande contato que os animais têm nas tocas, devido a brigas, contato sexual, disputa de alimentos, ingestão de animais mortos, etc. O estudo determinou uma maior positividade, 96% (53/58), em *R. norvegicus* fêmeas em relação a, 81% (60/74), nos *R. norvegicus* machos. Os dados conferem com os achados de PEREIRA & ANDRADE, 1988 que determinaram uma positividade de 40,3% em *R. norvegicus* fêmeas em relação a positividade de 38,1% em *R. norvegicus* machos. Outros estudos não fizeram essa comparação. No entanto, a diferença de infecção entre os animais machos e fêmeas relacionadas com diferenças biológicas não são sugestivas para extrapolações biológicas.

O critério para a determinação de qual sorogrupo o animal pertence através do teste de MAT merece cuidados na avaliação, podendo o animal apresentar positividade para um sorogrupo e não pertencer a esse sorogrupo, pois as leptospiros podem aglutinar com anticorpos

diferentes dos anticorpos anti-leptospiras, como, por exemplo, a *Borrelia borgdorferi*, uma espiroqueta encontrada em roedores reservatórios de leptospirose. Deve-se, também, levar em consideração as aglutinações misturadas ou coaglutinações que podem ocorrer com mais de um sorogrupo. Por isso, para que as análises dos resultados pudessem ser realizadas adotaram-se critérios estabelecidos pela OMS. Os estudos de reservatórios de leptospirose quando realizados com o teste de MAT determinam uma positividade a partir de um título previamente estabelecido pelo autor, de acordo com a OMS os títulos a partir de 1:100 determinariam a positividade de animais para a leptospirose e esse foi o critério adotado por esse estudo. Foram considerados para critério de positividade ao teste de MAT os sorogrupos e não os sorovares, afirmando-se que o animal apresentava positividade para um sorogrupo e não para um sorovar. Ou seja, os animais que apresentaram aglutinações misturadas ou coaglutinações com mais de um sorovar foram considerados pertencentes ao sorogrupo e não aos sorovares, adotando-se como positivo o título do sorovar mais alto. Os títulos variaram de 1:50 a 1:12800. O título de maior prevalência foi o de 1:200. Os dados estabelecem que a presença de anticorpos anti-leptospiras é alta nesses animais, sugestionando a ocorrência de infecções sucessivas. Quando um animal apresentou aglutinações mistas ou coaglutinações com sorovares de sorogrupos distintos afirmou-se que esse animal era positivo, mas não pode-se afirmar a qual sorogrupo ele pertencia. Ao teste de MAT, 70% (80/115) dos *R. norvegicus* foram positivos, sendo que 92,5% (74/80) pertenciam ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, 3,5% (3/80) ao sorogrupo Djasiman e 3,5% (3/80) tiveram reações mistas aos títulos de 1:200 entre sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Autumnalis, 1:400 entre os sorogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae e 1:1600 aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Djasiman. Os *D. marsupialis* tiveram 71% (5/7) de positividade para o sorogrupo Semarang.

No município do Rio de Janeiro, PEREIRA E ANDRADE, 1988, determinaram 36% (37/104) de positividade para o teste de MAT nos *R. norvegicus*, sendo a prevalência dos sorogrupos a seguinte: 75% (28/37) Icterohaemorrhagiae, 16% (6/37) Djasiman, 2% (1/37) Tarassovi, 2% (1/37) Javanica e 5% (2) com aglutinações mistas. No município de Duque de Caxias, RJ, LILENBAUM *et. al.*, 1993, determinaram a positividade de 36% (22/47) nos *R. norvegicus* ao teste de MAT, sendo 94% pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae e 6% pertencentes ao sorogrupo Canicola, o autor adotou como positividade o título 1:100. Na Inglaterra, WEBSTER *et al.*, 1994, determinaram 1% (3/259) dos *R. norvegicus* positivos ao teste de MAT todas as amostras pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, considerados positivos o títulos maiores que 1:30. Em Tel Aviv e Jerusalem, Israel, HOEDEN, 1964, determinou 6% (27/439) dos *R. norvegicus* positivos ao teste de MAT, sendo que 92% (25/27) pertenciam ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae e 8% (2/27) pertenciam ao sorogrupo Ballum, considerados positivos os títulos maiores que 1:25. Nos Estados Unidos, Detroit, Michigan, THIERMANN, 1977 demonstrou que 77% (277/350) de *R. norvegicus* foram positivos ao teste de MAT, todos pertenciam ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Em Barbados, TAYLOR *et. al.*, 1991, determinaram que dos 25% (35/138) *R. norvegicus* positivos ao teste de MAT, 80% (28/35) foram do sorogrupo Icterohaemorrhagiae e 20% (7/35) pertencentes ao sorogrupo Autumnalis. Na Índia LEVETT, *et al.*, 1989 determinaram 15% (17/113) de *R. norvegicus* positivos ao teste de MAT 82% (14/17) pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, 12% (2/17) pertencentes ao sorogrupo Ballum e 6% (1/17) pertencente ao sorogrupo Autumnalis. Os dados coincidem com os achados do presente trabalho, que confirmou o sorogrupo Icterohaemorrhagiae como sendo o sorogrupo prevalente nos *R. norvegicus*, como em outros locais, Rio de Janeiro e

Duque de Caxias, RJ, Inglaterra, Estados Unidos, Israel e Barbados. O sorogrupo Djasiman também foi encontrado em *R. norvegicus* de Duque de Caxias, RJ, juntamente com o sorogrupo Canicola.

No presente estudo, a positividade ao teste de MAT foi maior nos *R. norvegicus* jovens, 88% (8/9), do que nos *R. norvegicus* adultos, 67% (73/108). Nos Estados Unidos, Detroit, MICHIGAN, THIERMAN, 1977 determinou 90,3% de positividade ao teste de MAT nos animais adultos e 38,8% de positividade ao teste de MAT nos animais jovens. Em Barbados, TAYLOR *et al.*, 1991 determinaram que a soroprevalência ao teste de MAT foi de 12% nos animais jovens, 29% nos animais sub adultos e 41% nos animais adultos. Os resultados do presente estudo ao teste de MAT demonstraram que a positividade de 78% (41/52) nos *R. norvegicus* fêmeas, foi maior do que a positividade nos machos, 61% (40/65). A positividade dos *R. norvegicus* machos jovens, 80% (4/5) foi maior do que positividade dos machos adultos, 60%, (36/60). A positividade dos *R. norvegicus* fêmeas jovens foi de 100% (4/0), maior do que a positividade dos *R. norvegicus* dos fêmeas adultas, 77%, (37/48). Não existem outros estudos no Brasil comparando a positividade ao teste de MAT de machos e fêmeas. Os dados do presente estudo quando comparados com os casos humanos testados ao MAT em Salvador indicam que os sorogrupo dos reservatórios *R. norvegicus* é o mesmo do que os dos casos humanos, ou seja, Icterohaemorrhagiae.

Os cinco *D. marsupialis* positivos para o teste de MAT no presente estudo eram pertencentes ao sorogrupo Semarang. No municípios de Cotia e Casa Grande e Nova Odessa no estado de São Paulo, SANTA ROSA, 1970, após o isolamento de leptospiras em cinco *D. marsupialis* determinou que essas leptospiras pertenciam aos sorogrupos Mini, Bataviae,

Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae. Em Salvador, CALDAS *et al.*, 1992 determinaram 20% (1/5) de *D. marsupialis* positivos ao teste de MAT, pertencente ao sorovar patoc. Deste modo, o presente estudo determinou *D. marsupialis* positivos ao teste de MAT, pertencentes a sorogrupos diferentes dos achados de SANTA ROSA, 1970 e semelhantes aos achados de CALDAS *et ai.*, 1992.

A soma entre os animais positivos ou ao teste de IMC ou ao teste de MAT demonstraram que 87% (124/142) dos *R. norvegicus* são positivos a pelo menos um dos testes, aumentando desse modo a positividade. Diversos estudos utilizam a somatória dos diversos testes para o determinar a positividade dos reservatórios de leptospirose. No Rio de Janeiro, 23% (24/101) dos *R. norvegicus* e 0/3 *Mus musculus* foram positivos ao isolamento de leptospiras em fragmentos renais em meio de cultura, exame direto ou sorologia (PEREIRA & ANDRADE, 1988). Em Israel, na região sul de Tel-Aviv, HOEDEN, 1958, determinou 27% (25/92) de positividade para os ouriços do mato, seja em isolamento em meio de cultura ou em teste de microaglutinação. No Distrito de Puna, na Ilha do Hawaii, MINETTE, 1964 determinou 55,9% (343/614) de positividade para os *R. norvegicus* testados ao teste de macroaglutinação e isolamento de fragmentos renais em meio de cultura Fletcher, em ambos os testes. WEBSTER *et al.*, 1995 determinou que 259 *R. norvegicus*, capturados em 11 fazendas da Inglaterra nos município de Oxfordshire, North Wales e Hampshire, 14% (37/259) foram positivos para ao menos um teste (MAT, ELISA, Tintura de Prata).

Em tabela 2X2 os dados do teste de IMC e MAT foram comparados. Dos *R. norvegicus*, 33% (4/12) apresentaram cultura negativa e MAT positivo e 25% (25/100) apresentaram cultura positiva e MAT negativo. Dos *D. marsupialis* 67% (2/3) apresentaram cultura negativa e

microaglutinação positiva. O índice kappa baixo confirma o fato de que os testes diagnósticos avaliam fatores biológicos distintos e não são excludentes para o diagnóstico da leptospirose e sugerem outras interpretações mais biológicas do que de comparação dos testes diagnósticos. Os 4 *R. norvegicus* e os 2 *D. marsupialis* que apresentaram cultura negativa e MAT positivo sugerem que os animais não estão eliminando leptospiras, no entanto podem ter entrado em contato com as mesmas e estão produzindo anticorpos, ou então, as leptospiras não cresceram no meio de cultura por motivos já discutidos anteriormente. Os 25 *R. norvegicus* que apresentaram cultura positiva e MAT negativo sugerem que os níveis baixos de anticorpos circulantes no sangue, devido aos animais encontrarem-se na fase leptospírica e não mais na fase imunológica.

O teste de PCR foi realizado no intuito de desenvolver um teste mais rápido para o diagnóstico de leptospirose nos reservatórios. Dentre as diversas técnicas de extração de DNA utilizadas para o teste de PCR foi utilizada a mais simples, a fervura à 100°C. A desvantagem desse método de extração é que as amostras têm que ser processadas logo após a coleta. A vantagem é o baixo custo e a facilidade do método. Foram utilizados os pares de "primers" A/B descritos por Mérien que detecta 7 espécies patogênicas mais a *L. biflexa* (a oitava espécie patogênica, *L. faine*, foi descrita recentemente e não existem estudos a respeito da sua detecção pelo PCR). Os "primers" G1/G2 detectam 6 espécies patogênicas exceto a *L. kirshneri*. Foram também utilizados os "primers" B-64I/II que detectam somente a *L. kirshneri*, no entanto, de todas as amostras testadas foram determinados somente 4 animais positivos e o limite de detecção desse par de "primers" não foi estabelecido. As evidências de infecções mistas são os resultados positivos de uma amostra para dois pares distintos de "primers".

Para o cálculo da especificidade do teste de PCR foram acrescentados mais 20 ratos de laboratório Wistar criados em biotério e como teste padrão foi utilizado o IMC (teste padrão ouro reconhecido pela OMS que detecta a infecção ativa). Os testes de PCR demonstraram, respectivamente, uma sensibilidade e especificidade de 89% e 97%. Um valor preditivo positivo de 98% e um valor preditivo negativo de 84% do teste de PCR. Os resultados sugerem que o teste tem aplicação, alguns fatores que, normalmente, são responsáveis pela diminuição da sensibilidade do teste, como a extração mal realizada, inibidores e degradadores de DNA, devem ser considerados. A especificidade, provavelmente, foi diminuída por contaminação ocorrente durante a realização do teste ou o que é mais provável por inibição do crescimento de leptospiras no IMC que foi o teste utilizado como padrão para o cálculo da especificidade.

Os resultados de sensibilidade e especificidade e os valores preditivos do teste de PCR são bastantes satisfatórios, permitindo a sua recomendação para o diagnóstico de leptospirose em animais reservatórios. CHO, *et al.*, 1998, utilizou os “primers” G1/G2 para o diagnóstico de leptospirose em roedores reservatórios de leptospirose na Coreia, tendo sido detectado 12% (28/222) de animais positivos para o teste de PCR, enquanto o IMC determinou 10% (22/222) de positividade. Esses dados sugerem também uma boa eficiência do teste de PCR em grupos de animais com baixos níveis de infecção, embora o autor não tenha determinado a sensibilidade e especificidade do teste.

Foram realizadas análises histológicas dos rins dos *R. norvegicus* com o objetivo de prover material para no futuro investigar-se antígenos de leptospiras nesses rins, o fato de terem

sido encontradas 11 lesões diferenciadas nos rins dos *R. norvegicus* levou a elaboração de uma discussão a respeito de lesões morfológicas renais e leptopirose, muito embora as lesões encontradas nos *R. norvegicus* não estejam totalmente relacionadas somente com a leptopirose. A discussão das lesões renais de leptopirose no *R. norvegicus* deve iniciar com o entendimento da patogênese da doença, pois, não existe ainda, uma explicação satisfatória para o fato da bactéria permanecer no animal e ser eliminada por muitas semanas, meses ou por toda a vida. Infecções experimentais, através de inoculações experimentais de leptopiras vivas, mortas ou atenuadas ocasionam lesões inflamatórias em 24 a 48 horas, no entanto, o parasita vivo, na infecção natural, ao penetrar no hospedeiro, não ocasiona processo inflamatório. As espécies de bactérias não patogênicas são inativadas pelo sistema imunológico do hospedeiro e não têm acesso à circulação sanguínea, no entanto, algumas vezes, ocorre o mesmo com bactérias patogênicas. Os fatores que levam ao sucesso ou não dessa defesa imune inicial, não estão estabelecidos, porém, devido ao comportamento de resistência e susceptibilidade dos vários sorovares em diferentes animais, provavelmente esses fatores são uma somatória de interações entre proteínas de superfície das células do hospedeiro e do parasita.

A resposta mais comum à lesão é a resposta imune humoral. A leptopirose na forma grave nos animais domésticos e no homem, induz a lesões vaculares, lesões hepáticas e renais, chegando a completa falência renal em alguns casos. Os reservatórios crônicos de leptopirose, como é o caso dos *R. norvegicus*, não demonstram ser afetados pela doença (FAINE, 1999). No caso da resistência a fase inicial, que é leptospirêmica, a bactéria aloja-se em vários órgãos, como o cérebro, a região anterior do globo ocular, o fígado, o baço e o rim. Nos rins, elas são encontradas preferencialmente nas bordas em escova dos túbulos

contorcidos proximais. As lesões renais características da leptospirose, tanto nos homens como nos animais, são a nefrite intersticial crônica e a necrose tubular aguda. A nefrite intersticial crônica é mais associada a metabólitos tóxicos provenientes da resposta inflamatória (TNF- α , IFN- γ , IL-1) do que a presença do parasita, uma vez que ele não é encontrado nos sítios inflamatórios (PEREIRA, *et al.*, 1996). A necrose tubular aguda é associada aos casos nos quais o parasita lesa as células renais e o paciente apresenta sintomas de proteinúria, oligúria, anúria e hematúria e está, provavelmente, ligada a presença do parasita nos túbulos renais. Alguns trabalhos, sugerem que existe uma relação mediada por receptores a qual permite que não ocorra lesões endoteliais nas células renais (MÉRIEN *et al.*, 2000).

A partir do conhecimento da patogênese da doença, dos trabalhos experimentais realizados e dos achados histopatológicos em animais e no homem, podem ser estabelecidas correlações entre as lesões teciduais encontradas e a presença da leptospira nos *R. norvegicus* que são os principais reservatórios de leptospirose urbana no mundo e extremamente adaptados a presença da leptospira no seu organismo. Deste modo representam um modelo animal resistente ao parasita, o que pode esclarecer fatores de resistência a doença. O estudo morfológico renal realizado nesse trabalho foi qualitativo e abordou um número não muito grande animais, não permitindo extrapolações biológicas afirmativas e sim sugestões, que embora não qualifiquem totalmente os achados, permitiram interpretações não realizadas até então, pois os trabalhos com análises histopatológicas em *R. norvegicus* testados são inexistentes.

Os principais achados de alterações morfológicas nos *R. norvegicus* foram: glomerulonefrite proliferativa focal segmentar mesangial, alterações histológicas glomerulares mínimas, degeneração tubular hialino-goticular, necrose tubular, proteinúria cortical, glomerular e tubular, proteinúria medular com dilatação tubular, regeneração tubular, nefrite intersticial crônica, pielite crônica, pielonefrite aguda (abscessos), fibrose intersticial e calcificação multifocal; foram também encontrados dois parasitas nos ureteres. As lesões são inúmeras e, provavelmente, não são todas associadas a leptospirose, pois, embora não tenha sido pesquisado nesse estudo, os *R. norvegicus* são reservatórios de inúmeros parasitas e estão expostos a diversos outros patógenos que poderiam causar lesões histopatológicas renais.

A glomerulonefrite proliferativa focal segmentar mesangial tem como causa a deposição de complexos imunes no glomérulo devido a uma reação imunológica no glomérulo ou na corrente sanguínea. Na leptospirose de um modo geral, são ocasionadas pela presença de antígenos nos sítios de lesão. Uma possível explicação para esses achados e sua correlação com as alterações morfológicas seria a destruição desse parasitas por mecanismos imunológicos e a presença de antígenos e toxinas nos tecidos renais ocasionadores dessas lesões. Futuramente, será feita a pesquisa desses antígenos através da técnica de imunohistoquímica.

As alterações histológicas glomerulares mínimas podem ser o início da glomerulonefrite proliferativa focal segmentar mesangial, pois as células consideradas dentro dos limites máximos de celularidade eram células mesangiais, bem como, em alguns casos ocorreu o espessamento de matriz mesangial. A necrose tubular geralmente é a causa de falência renal nos animais susceptíveis a leptospirose e no homem. A pielonefrite aguda

provavelmente está relacionada a outros tipos de bactérias causadoras de abscessos, como o *Stafilococcus aureus*, uma vez que as leptospiras não são bactérias que causam abscessos.

A proteinúria tubular poderia estar sendo ocasionada por lesões no endotélio tubular e glomerular e conseqüentemente estar levando a alterações de absorção endotelial com depósito de proteínas. A proteinúria tubular medular foi alta e teve prevalência semelhante em todos os grupos de animais testados, desse modo pode ser considerada como uma alteração comum nos *R. norvegicus* sem relação com a leptospira. A regeneração tubular conseqüência de diferentes infecções que ocasionam lesões renais. A nefrite intersticial crônica sugere uma ação de produtos de reação imunológica agindo como fator determinante da nefrite intersticial crônica. A calcificação distrófica pode ser devida a fatores extrínsecos ao rim.

As lesões renais da leptospirose, em infecções experimentais em cobaios e golden syrian hamsters, e em achados de autópsia e biópsia humanos têm como principais achados a nefrite intersticial crônica, necrose tubular, espessamento de matriz mesangial e depósito de complexos antígeno-anticorpo (SITPRIJA & EVANS, 1970, LAI *et al.*, 1982, DUARTE *et al.*, 1992, OLIVA *et al.*, 1994, SILVA *et al.*, 1995). Todos esses achados foram referentes a casos graves e letais da doença que se referem geralmente a doença na fase aguda. As lesões nos *R. norvegicus* não foram estabelecidas como lesões crônicas ou agudas, devido a, prováveis, constantes infecções, sofridas por esses animais. Todas as lesões foram encontradas nos rins dos *R. norvegicus*, como citado anteriormente. A necrose tubular nos *R. norvegicus* estudados foi menor que 5% em todos os grupos positivos testados, enquanto que nos achados dos casos graves e letais dos trabalhos citados foi comum e em alguns

trabalhos foi associada com a presença do parasita lesando a parede tubular. Deste modo, pode-se estabelecer que a prevalência desse tipo de lesão é determinante dos casos graves e letais e rara nos *R. norvegicus*, não susceptíveis a doença.

A outra lesão renal, comum aos achados de literatura dos casos graves e letais e aos *R. norvegicus*, foi a nefrite intersticial crônica. No entanto, diferente da necrose tubular, ela foi teve prevalência maior que 50% em todos os grupos positivos dos *R. norvegicus* estudados. Conforme citado anteriormente, a lesão está associada a presença de metabólitos de reações imunológicas, ao invés da presença de parasitas. Desse modo, pode-se admitir que a lesão não é patognomônica dos casos letais e graves, podendo estar presente em animais que não são susceptíveis a doença. O espessamento de matriz mesangial foi encontrado em alguns dos casos graves e letais e com uma prevalência de 33% nos grupos positivos dos *R. norvegicus* estudados, mostrando-se uma lesão característica dos animais que desenvolvem os casos graves e dos animais resistentes. O depósito de complexo antígeno-anticorpo não foi encontrado nos *R. norvegicus*, sendo que o método de AZAN utilizado para a visualização do mesmo foi diferente dos trabalhos realizados com os casos graves e letais que utilizou métodos mais sensíveis, como o a imunofluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão.

7 CONCLUSÕES

1) Os *Rattus norvegicus* constituíram mais de 90% dos animais capturados, constituindo-se nos principais pequenos mamíferos sinantrópicos encontrados nos locais com casos de leptospirose em Salvador.

2) A presença de infecção de leptospirose em mais de 80% dos *R. norvegicus* indica grande contaminação ambiental de leptospirose. O estudo desenvolveu metodologia para investigar a importância dos cães como reservatórios da doença.

3) Todos os isolados dos *R. norvegicus* foram sorotipados como *Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae e sorovar copenhageni sendo os mesmos isolados nos casos humanos, confirmando a importância desses animais como reservatórios da doença.

4) A prevalência do teste de microaglutinação foi menor do que a do teste de isolamento, 68% contra 80%, demonstrando que o teste de microaglutinação subestima a prevalência da infecção. O sorogrupo de maior prevalência foi o Icterohaemorrhagiae, demonstrando que a eficiência do teste de microaglutinação no diagnóstico do sorogrupo.

5) Ocorreu uma correlação positiva da presença de leptospirose com os *R. norvegicus* adultos e com os *R. norvegicus* fêmeas, indicando possíveis fatores biológicos relacionados com a infecção de leptospirose.

6) Dos oito *D. marsupialis* capturados nenhum apresentou presença de leptospirose. Cinco apresentaram anticorpos anti-leptospirose pertencentes ao sorogrupo Semarang, indicando infecção desses animais por outra espécie de leptospirose e possível resistência a manutenção da mesma no organismo.

7) O teste de PCR demonstrou sensibilidade e especificidade adequados para serem utilizados na identificação de reservatórios animais de leptospirose.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. P.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S.; GERMANO, P. M. L. Levantamento soropidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Rev. Saude Publ.**, **28**: 76-81, 1994.
- ANDRADE, A. Z. & OLIVEIRA, J. C. Estudos sobre a Leptospirose na Bahia. **Bol. Fund. Gonçalo Moniz**, **3**: 1-28, 1954.
- ANDREANI, E.; F. TOLARI; FARINA R. Experimental infection in sheep with *Leptospira interrogans* serotype Hardjo. **Brit. Vet. J.**, **139**:165-70, 1983.
- BAUER D. C.; EAMES L. N.; SLEIGHT D. S.; FERGUNSON L. C. The significance of leptospiral hemolysin in the pathogenesis of *Leptospira pomona* infections. **Mich. Agric. Exp. Sta.**, **2650**: 229-36, 1960.
- BENNETT S. & EVERARD C. O. R. Absence of epidemicity of severe leptospirosis in Barbados. **Epidem. Infect.**, **106**: 151-156, 1991.
- BOLIN C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Semin. Vet. Med. Surg., (Small Animal)** **11**: 166-71, 1996.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspectos Epidemiológicos. In:Manual de leptospirose. Brasília: Ministério da Saúde, 1995. p. 7-18.
- BRANKA, V.; LALIC, M.; SEGULJEV, Z.; GRGIC, Z. Seroprevalence of leptospira interrogans serovar hardjo in cows and isolation from urine. **Acta Vet.**, **47**: 15-22, 1997.
- CACCIAPUOTI, B.; NUTI, M.; PINTO, A.; SABRIE, M. Human leptospirosis in Somalia: a serological survey. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **76**: 178-82, 1982.
- CACCIAPUOTI, B.; CICERIONI, L.; PINTO, A.; APOLLINI, M.; RONDINELLA, V.; BONOMI, U.; BENEDETTI, E.; CINCO, M.; DESSI, S.; DETTORI, G.; GRILLO, R.; FALOMO, R.; MANSUETO, S.; MICELI D.; MARCUCCIO, C.; PIZZOCARO, P.; SCHIVO, M. L.; VARALDO, E.; LUPIDI, R.; IOLI, A.; MARZOLINI, A; ROSMINI, F. Survey on the prevalence of leptospira infections in the Italian population. **Eur. J. Epidemiol.**, **10**: 173-80, 1994.
- CALDAS, E. M. & SAMPAIO, M. B. Aspectos soro-epidemiológicos da leptospirose em Salvador, Bahia. **Rev. Med. Bahia**, **23**: 90-106, 1977.
- CALDAS E. M.; SAMPAIO M. B.; COSTA E.; MIRANDA G. Estudo epidemiológico de surto de leptospirose ocorrido na cidade do Salvador, Bahia, em maio e junho de 1978. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **39**: 85-94, 1979.

- CALDAS E. M. & SAMPAIO M. B. Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brasil, A case-control seroepidemiologic study **Int. J. Zoon.**, 6: 85-96, 1979.
- CALDAS, E. M.; FEHRINGER W. T.; SAMPAIO M. B. Aglutininas antileptospira em *Rattus norvegicus* e *Didelphis marsupialis* em Salvador-BA. **Arq. EMV-UFBA**, 15: 43-50, 1992.
- CHILDS, E.; SCHWARTZ, Z. S.; KSIAZEK, T. G.; GRAHAM, R. R.; LEDUC, J W.; GLASS, G. E. Risk factors associated with antibodies to leptospire in inner-city residents of Baltimore; a protective role for cats. **Am. J. Publ. Health**, 82: 597-99, 1992.
- CHO, M. K., KEE H. S., SONG H. J., KIM K. H., SONG K. J., BAEK L. J., KIM H. H., OH H. B., KIM Y. W., CHANG W. H. Infection rate of *Leptospira interrogans* in the field rodent, *Apodemus agrarius*, in Korea. **Epidemiol. Infect.**, 121: 685-90, 1988.
- CRUZ, M. L. S.; ANDRADE J.; PEREIRA M. M. Leptospirose em crianças no Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27: 5-9, 1994.
- DAVID A. H.; WALKER E. M.; BLANCO D. R.; BOLIN C. A.; MILLER J. N.; LOVETT M. A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa during in vitro cultivation. **Infec. Immun.**, 59:1131-140, 1968.
- DHALIWAL, G. S.; MURRAY R. D.; ELLIS W. A. reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans*, serovar hadjo relative to the year of diagnosis. **Vet. Rec.**, 138: 272-76, 1996.
- DIAZ, K. S.; De OLIVEIRA C. F.; PARDINI R.; OPERSKALSLI E.; MAYER A. J.; BUSCH M. P. HIV type 1 tat gene heteroduplex mobility assay as a tool to establish epidemiologic relationships among HIV type 1 – infected individuals. **Res. Hum. Retrov.**, 115: 1151-56, 1999.
- DEMERS, R. Y.; THIERMANN, A.; DEMERS, P.; FRANK, R. Exposure to *Leptospira icterohaemorrhagiae* in Inner City and Suburban Children: A serologic comparison. **J. Fam. Prac.**, 17: 1007-11, 1983.
- DESMETTRE P. Diagnosis and prevention of equine infectious diseases: present status, potential and challenges for the future. **Adv. Vet. Med.**, 41: 359-77, 1999.
- DESMACHELIER, P. M. Human leptospirosis in New South Wales, 1975-1985. **Med. J. Aust.**, 146: 353-57, 1987.
- DUARTE F., PAOLA D., MADI K., RIOS- GONÇALVES A. J. Patologia da Leptospirose. Ensaio de correlação anatomo-clínica. **Arq. Bras. Med.**, 66: 325-34, 1992.
- EVERARD, C. O. R.; FRASER, C.; EVERARD, J. D. The incidence of severe leptospirosis in Trinidad. **Trop. Geog. Med.**, 39: 126-32, 1986.

- EVERARD, C. O. R.; MAUDE G. H.; HAYES R. J. Leptospirosis infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **84**: 255-66, 1989.
- EVERARD, J. D. & EVERARD, C. O. R. Leptospirosis in the Caribbean. **Rev. Med. Microbiol.**, **4**: 114-22, 1993.
- EVERARD, C. O. R.; EDWARDS J. D.; EVERARD J. D. & CARRINGTON D. G. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. **Eur. J. Epidemiol.**, **11**: 311-20, 1995.
- FAINE S.; ADLER, B.; BOLIN C.; PEROLAT P. *Leptospira and leptospirosis*. Australia: MedisSci, Melbourne, 1999. 272 p.
- FREDRIKS, D. N.; RELMAN D. A. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.**, **29**: 475-86, 1999.
- FROZEN C.; MULLER A. Molecular techniques for detection species differentiation and phylogenetic analysis of microsporidia, **Clin. Microbiol. Rev.**, **12**: 243-85, 1999.
- GONÇALVES, A. J. R.; ROZENBAUM, R.; VIEIRA, A. R. M.; CARVALHO, J. E. M.; SILVA, J. B. G. Mudanças nos padrões clínicos e anatomopatológicos da leptospirose na cidade do Rio de Janeiro e Grande Rio. **Jornada Bras. Med.**, **64**: 127-37, 1993.
- GOMES L. S.; RIBAS J. C.; CORREA A. M.; JORDÃO M. F. Incidência de leptospira em ratos nas cidades de São Paulo e Santos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, **10**: 111-15, 1950.
- GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP H.; FRANZEN M.; CARRINGTON D.; SCHOONE G. J.; VAN EYS G. J. J. M.; EVERARD C. O. R.; HARTSKEEL R. A.; TERPSTRA W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. **J. Gen. Microbiol.**, **139**:1691-700, 1993.
- HARTSKEERL, R. A. & TERPSTRA, W. J. Leptospirosis in wild animals. **Vet. Quart.**, **18**: 149-50, 1996.
- HOEDEN, J. V. Leptospirosis infections in the hedgehogs. **J. Infect. Dis.**, **103**: 225-38, 1958.
- INADA, R.; IDO, Y.; HOKI R.; KANEKO R.; ITO H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of weill's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **Vet. Quart.**, **18**: 149-50, 1996.
- KAMYAMA K.; HORIE N.; YASHIMURA M.; OKANE M.; TSUCHIYA H.; TAJIMA M.; NAGAI H.; TSUCHUYA M.; SHIMAYAMA T.; MORO I. Rapid diagnosis of oral tuberculosis by amplification of Mycobacterium dna from paraffin embedded specimens. **J. Oral Sci.**, **40**: 31-6, 1998.
- KO, A. I., REIS M. G., DOURADO C. M. R., JOHNSON W. D., RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, **354**: 820-25, 1999.

- KURIAKOSE, M.; EAPEN C. K.; PAUL, R. Leptospirosis in Kolenchery, Kerala, India: Epidemiology, prevalent local serogroups and serovars and a new serovar. **Eur. J. Epidemiol.**, **13**: 691-97, 1997.
- LAI, K. N.; AARONS I.; WOODROFFE A. J.; CLARKSON A. R.; Renal lesions in Leptospirosis. **Aust. N. Z. J. Med.**, **12**: 276-79, 1982.
- LEVETT, P. N.; WHITTINGTON, C. U.; CAMUS E. Serological survey of leptospirosis in the livestock animals in the Lesser Antilles. **Ann. New York Acad. Sci.**, 369-77, 1995.
- LEVETT, P. N.; WALTON D.; WATERMAN L. D.; WHITTINGTON, C. U.; MATHISON G. E.; EDWARDS C. O. Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. **West Indian Med. J.**, **47**: 15-7, 1998.
- LINS, A. Novas observações do *Leptospira icterohemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. **Brasil Méd.**, **2**: 243-46, 1925.
- MACHADO, R. & COSTA E. Leptospirose em Salvador. Alguns aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Med. Bahia**, **23**: 194-207, 1977.
- MAROTTO, P., C., S.; MAROTTO, M. S.; SANTOS D. L.; SOUZA T. N. L.; SEGURO A. C. Outcome of leptospirosis in children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **56**: 307-10, 1997.
- MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 2219-24, 1992.
- MERIEN, F.; TRUCCOLO J.; BARANTON G.; PEROLAT P. Identification of 36 kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Microbiol. Letters**, **185**: 17-22, 2000.
- MILLS, J. N.; CHILDS, J. E.; KSIAZEK, T. G.; PETERS, C. J. *Methods for Tapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, 1995, 61 p.
- MINETTE, H. P. Leptospirosis in rodents and mongooses on the island of Hawaii. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **13**: 826-32, 1964.
- MOLNER, J. G.; KARL, M. F.; HERBERT, A. B. Leptospiral Infections. **J. Am. Med.**, **136**: 814-19, 1948.
- NAGY, T. *Normas Operacionais de Centros de Controle de Zoonoses*. Brasília: Ministério da Saúde, Centro Nacional de Saúde, 1993, 70 p.
- NICODEMO, A. C.; DUARTE, I. S.; ALVES, V. A. F.; TAKAKURA, C. F. H.; SANTOS, R. T. M.; NICODEMO E. L. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **56**: 181-87, 1997.

- NOGUCHI, H. Spirocheta icterohaemorrhagiae in american wild rats and its relation to the japanese and european strains. **J. Exp. Med.**, 755-63, 1917.
- OLIVA, R.; INFANTE, J. F.; GONZALEZ, M.; PEREZ, V.; SINFONTES, S.; MARRERO, O.; VALDES, Y. FARINAS, M.; ESTEVEZ, L.; GONZALEZ, I. Pathologic-clinical characterization of leptospirosis in a golden syrian hamster model, **Arch. Med. Res.** **25**:165-70, 1994.
- PEREIRA, M. M.; ANDRADE, J.; LACERDA M. D.; BATOREU N. M.; MARCHEVSKY R. S. SANTOS R. R. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining, **Exp Toxic Pathol**, **49**: 505-511, 1997.
- PEREIRA, M. M. & ANDRADE, J. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospires and specific antibodies in rodents. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **82**, 768-70, 1988.
- PRESS N.; ROMNEY M.; TAKAYA S.; CONWAY B. Molecular diagnosis of infectious in the new millenium **Clin. Microbiol. Journ**, **161**: 1294, 1999.
- RAMACHANDRAN, S. & PEREIRA M. V. F. Cardiac and Pulmonary involvement in leptospirosis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **71**: 56-9, 1977.
- ROMERO, C. E., BILLERBECK, A. E. C., LANDO V. S., CAMARGO, E. D., SOUZA, C. C., YASUDA P. H. Detection of *Leptospira* DNA in patients with asseptic meningitis by PCR. **J. Clin. Microb.**, **36**:1453-455, 1998.
- SAAD, M. A., PHUONG N. T., GALE S. P., HOWARD C. J., JUNG S. C. A polimerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira spp.* in bovine semen. **Can J. Vet. Res.**, **61**: 15-20, 1995.
- SAKATA, E. E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C.; SILVA, M. V.; LOMAR A. V. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo , Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **34**: 217-21, 1992.
- SANTA ROSA C. A. **Leptospirose em animais silvestres isolamento de um novo sorotipo, brasiliensis, no sorogrupo Bataviae.** São Paulo, 1970. 55p. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciencias Médicas e Biológicas de Botucatu, 1970.
- SANTOS, M. A ocorrência de leptospira icterohemorrhagiae nos ratos do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Med.**, **4**: 424-26, 1947.
- SANCHEZ, R. M.; LA PAZ, R. C.; ACOSTA, C. L. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la leptospirosis humana en Cuba. **Rev. Cub. Med. Trop.**, **45**: 32-41, 1993.
- SEBASTIAN, E. & JOHNSON, R. Leptospirosis. **J. Am. Vet. Med.**, **205**: 1518-22, 1994.

- SILVA L. K.; PARANÄ R.; SOUZA S. P.; BERBY F.; KAY A ; TREPÓ C.; SANTANA N.; COTRIM H.; LYRA L. G.; REIS M. G. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **62**: 257-60, 2000.
- STOKES, A.; RYLE, J. A.; TYTHER, W. H. Weils disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica) in the British army in Flanders. **Lancet**, **1**: 142-53, 1917.
- TAYLOR, K. D.; TURNER, L. H.; EVERARD, J. D. Leptospire in *Rattus spp.* on Barbados. **J. Trop. Med. Hyg.**, **94**: 102-03, 1991.
- ZAMORA, J., RIEDEMANN, S., CABEZAS, X., VEJA, S. Comparación de quatro tecnicas microscópicas para el diagnóstico de leptospirosis en roedores silvestres en la area rural de Valdivia, Chile. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, **37**: 267-72, 1995.
- WATT G. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, **10**: 149-52, 1997.
- WEBSTER, J. P.; ELLIS, W. A.; MACDONALD, D. W. Prevalence of *Leptospira spp.* in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. **Epidemiol. Infec.**, **114**: 195-201, 1995.
- WEIL, A. Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. **Deutsch. Arch. f. klin. Med.**, 209-232, 1886.

Anexo 1 - Tabela de anotações dos locais de captura

End.referência: _____ Código: _____ Estudo: _____ Data da primeira visita: _____ Morador: _____

DATA DE CAPTURA	Habitats mais comuns do local de captura	habitat específico	TAMANHO DO HABITAT (metros)	Nº ANIMAIS CAPTURADOS	<u>Rattus Rattus</u>	<u>Rattus norvegicus</u>	OUTROS	DISTÂNCIA DO LOCAL DE REFERÊNCIA (metros)	Nº DA GAIOLA	OBSERVAÇÕES

1-Lixo Orgânico em Recipiente; 2-Lixo Orgânico Sem Recipiente; 3-Entulho; 4-Galeria Pluvial; 5-Esgoto Canalizado; 6-Esgoto a céu aberto; 7-Fossas; 8-Matagal 9-Criação Animal; 10-Rio; 11-Córrego; 12-Lagoa; 13-Leito Ferroviário; 14-Parque; 15-Jardim; 16-Praça

MAPA DOS HABITATS EM RELAÇÃO AO LOCAL DE REFERÊNCIA

Anexo 2 - Tabela de anotações dos animais capturados

End.referência: _____

Morador: _____

Código: _____

Estudo: _____

Data de captura: _____

Data de Necropsia	Nº do rato	Espécie e subespécie	I D A D E	S E X O	Tamanho (cm)	PESO (g)	C O R				Isolamento		MAT				Histologia	
					CAUDA	CORPO	ORELHA	PATA			U R I N A	RIM	Sorogrup o	Sorovar	Título máximo	Sorogrup o	IM	PRA TA

Maturidade: J - jovem; A - adulto; V - velho.**Cor:** C - cinza; B - branco; P - preto; M - marrom**IM** (imunofluorescência): 1-brilhante (+++), 2-claro(++), 3-visível(+), 4-pouco detectável(+/-), 5-negativo**OBSERVAÇÕES:** _____

Anexo 3 - Tabela de anotações da anestesia nos animais

ANIMAL NÚMERO:

DATA:

	INÍCIO	TÉRMINO	DOSAGEM
ÉTER ETÍLICO			
QUETAMINA (50 MG/ML)			
XILAZINA (20MG/ ML)			
OUTROS:			

ANIMAL NÚMERO:

DATA:

	INÍCIO	TÉRMINO	DOSAGEM
ÉTER ETÍLICO			
QUETAMINA (50 MG/ML)			
XILAZINA (20MG/ ML)			
OUTROS:			

ANIMAL NÚMERO:

DATA:

	INÍCIO	TÉRMINO	DOSAGEM
ÉTER ETÍLICO			
QUETAMINA (50 MG/ML)			
XILAZINA (20MG/ ML)			
OUTROS:			

ANIMAL NÚMERO:

DATA:

	INÍCIO	TÉRMINO	DOSAGEM
ÉTER ETÍLICO			
QUETAMINA (50 MG/ML)			
XILAZINA (20MG/ ML)			
OUTROS:			

Anexo 4 - Tabela de anotações das necrópsias nos animais

NÚMERO DO ANIMAL:

DATA:

INÍCIO	TÉRMINO	NÚMERO DE TUBOS DE URINA, RIM, SANGUE COLETADOS	ALTERAÇÕES DE NECRÓPSIA

NÚMERO DO ANIMAL:

DATA:

INÍCIO	TÉRMINO	NÚMERO DE TUBOS DE URINA, RIM, SANGUE COLETADOS	ALTERAÇÕES DE NECRÓPSIA

NÚMERO DO ANIMAL:

DATA:

INÍCIO	TÉRMINO	NÚMERO DE TUBOS DE URINA, RIM, SANGUE COLETADOS	ALTERAÇÕES DE NECRÓPSIA

NÚMERO DO ANIMAL:

DATA:

INÍCIO	TÉRMINO	NÚMERO DE TUBOS DE URINA, RIM, SANGUE COLETADOS	ALTERAÇÕES DE NECRÓPSIA

NÚMERO DO ANIMAL:

DATA:

INÍCIO	TÉRMINO	NÚMERO DE TUBOS DE URINA, RIM, SANGUE COLETADOS	ALTERAÇÕES DE NECRÓPSIA

Anexo 8- Questionário elaborado no programa de análise de dados EPIINFO 6, programa fornecido pela Organização Mundial de Saúde para estudos epidemiológicos..

Questionário de EPI INFO para o estudo de reservatórios de leptospirose

A. Identificação e Dados de Captura

O. Data de captura: {dat} <dd/mm/yyyy>
 1. O Numero Do Rato: {num} R1- ####
 2. Endereco: {end} _____
 3. Bairro: {bai} _____
 4. Zona de Informacao-Epimap: {zi} _____
 5. Distrito Sanitario: {ds} _____
 6. Nicho Especifico: {nic} ##

1=Lixo Organico Em Recipiente	9=Criacao Animal
2=Lixo Organico Sem Recipiente	10=Rio
3=Entulho	11=Corrego
4=Galeria Pluvial	12=Lagoa
5=Esgoto Canalizado	13=Leito Ferroviario
6=Esgoto A Ceu Aberto	14=Parque
7=Fossas	15=Jardim
8=Matagal	16=Praca
	17=Horta
	18=Terreno Baldio
	19=Quintal limpo
88=Nao se aplica	99=Nao Sabe

7. Especie e subespecie: {esp} # 0=Rattus rattus
 1=Rattus norvegicus
 2=Outro
 9=NS

8. Se outro, qual e o especie e subespecie:

{oesp} _____

9. Maturidade: {mat} #
 0=Jovem (R. rattus: corpo menos que 16cm)
 (R. norvegicus: corpo menos que 18cm)
 1=Adulto (O resto com o excepcao dos velhos)
 9=NS

10. Sexo {sex} # 0=Masc,1=Fem,9=NS

11. Tamanho (cm): Cauda {caud} ##.#

Corpo {corp} ##.#

Orelha {orel} ##.#

Pata {pata} ##.#

NOTE: 888 = Nao Foi Feito
999 = Nao Sabe

B. Confirmacao Diagnostica pela Cultura

1. Urina:

- a. {ucult} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS
b. Isolado Foi Perdido {uisol} # 0=Nao,1=Sim,8=NSA,9=NS
c. Quantia De Contaminacoes:{ucont} # 0=NC,1=+,2=++,3=+++8=NFF

2. Rim:

- a. {rcult} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS
b. Isolado Foi Perdido: {risol} # 0=Nao,1=Sim,8=NSA,9=NS
c. Quantia De Contaminacoes:{rcont} # 0=NC,1=+,2=++,3=+++8=NFF

3. Sorotipo:

- a. Sorogrupo {sorogrupo} _____
b. Sorovar {sorovar} _____

C. Resultados da PCR

1. Urina: Sumario {upcr} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS

- a. primer de merian {mer} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS
b. primer de G1/G2 {grav} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS
c. primer de B64-I/II {b64} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS

D. Confirmacao Diagnostica: Histologia

1. Imunofluorescencia: {imun} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS
2. Prata: {prat} # 0=Neg,1=Pos,8=NFF,9=NS

E. Confirmacao Diagnostica: MAT

Sorovar:

Titulo Maximo:

- | | | |
|-------------------|-------|-------|
| 1. andamana | {p1} | ##### |
| 2. australis | {p2} | ##### |
| 3. automnalls | {p3} | ##### |
| 4. bataviae | {p4} | ##### |
| 5. canicola | {p5} | ##### |
| 6. castellanis | {p6} | ##### |
| 7. celledoni | {p7} | ##### |
| 8. copenhageni | {p8} | ##### |
| 9. cuica | {p9} | ##### |
| 10. cynopteri | {p10} | ##### |
| 11. djasiman | {p11} | ##### |
| 12. grippotyphosa | {p12} | ##### |
| 13. hebdomadis | {p13} | ##### |
| 14. ictero 3294 | {p14} | ##### |
| 15. ictero RGA | {p15} | ##### |
| 16. javanica | {p16} | ##### |

17. panama	{p17}	#####
18. patoc	{p18}	#####
19. pomona	{p19}	#####
20. pyrogenis	{p20}	#####
21. saxkoebing	{p21}	#####
22. sejroe	{p22}	#####
23. sentot	{p23}	#####
24. shermani	{p24}	#####
25. tarassovi	{p25}	#####
26. wolffi	{p26}	#####

NOTE: 88888 = NFF

99999 = NS

- a. MAT Confirmado ^{0¹}
 (um titulo mais que ou igual a 1:50): {mat} # 0=N,1=S,8=NSA,9=NS
- b. Titulo Maximo: {maxt} #####
- c. Sorovar Predominante Reconhecido: {msv1} ## 88=NFF,99=NS
 {msv2} ## 88=NFF,99=NS
 {msv3} ## 88=NFF,99=NS
- d. Sorogrupo Predominante Reconhecido: {mserg} __

Anexo 9 – Tabela com os resultados dos testes de IMC, MAT e PCR em todos os animais

Legenda: o.m.- necropsiado morto; linhas em negrito – animais excluídos do cálculos para a validação do PCR NR-não realizado

Mi- Michael; Ma- Marcos

Federação		Culturas						Microaglutinação			PCR				
Data	An	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Titulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Pág
3/8/98	47	-	2	-	2	-	3	-	-	-	48Mi	-	48Mi	-	53 Mi
3/8/98	48	+	1	+	1	+	3	+	200 copenhagen 400 icterohaemorrhagiae 3294 800 copenhagen L1 130	+	48Mi	+	48Mi	-	53 Mi
5/8/98	49	+	1	+	1	+	1	+	200 copenhagen 1600 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 800 copenhagen L1 130	+	49Mi	-	50Mi	-	53 Mi
6/8/98	50	+	0	+	2	+	0	+	800 copenhagen 800 icterohaemorrhagiae 3294 800 copenhagen L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53 Mi
6/8/98	51	-	3	-	3	-	3	-	-	NR		NR		NR	
7/8/98	52	+	0	+	0	NR	NR	-	-	+	49Mi	+	50Mi	-	53 Mi
7/8/98	53	+	0	+	0	NR	NR	+	1600 copenhagen 800 icterohaemorrhagiae 3294 400 icterohaemorrhagiae RGA 100 sentot 400 copenhagen L1 130	NR		NR		NR	
7/8/98	54	+	1	+	1	NR	NR	-	50 copenhagen L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53 Mi
7/8/98	55	+	0	+	0	+	0	+	1600 copenhagen 100 cynopteri 800 icterohaemorrhagiae 3294 800 icterohaemorrhagiae RGA 1600 sentot 800 copenhagen L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
7/8/98	56	+	1	+	2	+	1	+	100 copenhagen	NR		NR		NR	
9/8/98	58	+	1	+	1	+	1	+	400 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhagen L1 130	NR		NR		NR	
9/8/98	59	+	2	+	2	+	2	+	100 copenhagen 100 copenhagen L1 130	NR		NR		NR	
9/8/98	60	+	0	+	0	+	1	+	800 copenhagen 100 icterohaemorrhagiae 3294 400 copenhagen L1 130	+	49Mi	-	50Mi	-	53 Mi
9/8/98	61	+	1	+	1	+	2	+	800 copenhagen 800 icterohaemorrhagiae 3294 800 icterohaemorrhagiae RGA 800 copenhagen L1 130	+	49Mi	-	50Mi	-	53 Mi
9/8/98	62	+	1	+	1	+	1	-	-	NR		NR		NR	
9/8/98	63	+	0	+	1	+	0	+	200 copenhagen	NR		NR		NR	
12/8/98	64	+	0	-	1	+	0	-	-	+	49Mi	+	50Mi	-	53 Mi
17/8/98	65	+	0	+	1	+	0	+	400 copenhagen	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi

									400 icterohaemorrhagiae 3294 400 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhageni L1 130							
17/8/98	66	+	0	+	0	+	0	+	200 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	+	53Mi	+
17/8/98	67	+	1	+	0	+	0	+	200 copenhageni 100 hebdomadis 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 400 sentot 200 copenhageni L1 130	+	49Mi	-	50Mi	-	53Mi	+
17/8/98	68	+	1	+	1	+	2	+	400 copenhageni 400 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
17/8/98	69	+	3	NR	NR	+	3	+	400 australis 800 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
17/8/98	70	+	1	+	1	-	2	+	100 copenhageni 100 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhageni L1 130	-	49Mi	-	50Mi	-	53Mi	-
18/8/98	73	+	1	+	1	+	1	Sem soro		+	49Mi	-	50Mi	-	53Mi	+
19/8/98	79	+	0	+	0	+	0	+	1600 copenhageni 3200 icterohaemorrhagiae 3294 1600 icterohaemorrhagiae RGA 1600 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi	+
20/8/98	80	-	2	-	2	-	2	-	-	-	49Mi	-	50Mi	+	53Mi	+
20/8/98	81	-	2	-	2	-	3	-	-	NR		NR		NR		NR
9/12/98	86	-	1	NR	NR	-	1	+	200 copenhageni	NR		NR		NR		NR
9/12/98	87	+	0	+	0	-	0	+	200 copenhageni 1600 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhageni L1 130	+	98Ma	+	97Ma	-	102 Ma	+
9/12/98	88	+	0	NR	NR	+	0	+	200 copenhageni	NR		NR		NR		NR
9/12/98	89	+	0	NR	NR	+	0	+	100 djasiman	NR		NR		NR		NR
15/12/98	90	+	1	+	1	-	0	-	-	+	98Ma	+	97Ma	-	102 Ma	+
16/12/98	91	-	1	NR	NR	-	1	+	200 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA	NR		NR		NR		NR
2/2/99	129	+	0	+	0	+	1	+	1600 copenhageni 1600 icterohaemorrhagiae 3294 1600 icterohaemorrhagiae RGA 3200 copenhageni L1 130	-	97Ma	-	98Ma	-	101 Ma	-
4/2/99	130	+	1	+	1	+	1	-	-	+	97Ma	+	98Ma	-	101 Ma	+
4/2/99	131	+	0	NR	NR	+	0	+	200 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 200 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
4/2/99	132	+	0	NR	NR	+	0	+	100 copenhageni 100 icterohaemorrhagiae 3294	NR		NR		NR		NR

5/2/99	133	+	1	+	1	+	1	-	-	+	99Ma	+	99Ma	-	103 Ma	+
5/2/99	134	+	1	-	1	+	1	+	100 copenhagen 1600 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhagen L1 130	-	96Ma	+	96Ma	-	102 Ma	+
5/2/99	135	+	0	+	1	+	0	-	-	+	97Ma	+	97Ma	-	101 Ma	+
9/2/99	136	-	3	-	3	-	-	-	-	+	96Ma	-	96Ma	-	102 Ma	+
9/2/99	137 o m	+	3	NR	NR	+	3	+	200 icterohaemorrhagiae 3294 800 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
2/3/99	138	+	0	+	0	-	1	+	400 copenhagen 800 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 800 copenhagen L1 130	-	98 Ma	-	97Ma	-	103 Ma	-
2/3/99	139	+	0	+	0	+	0	-	-	+	98Ma	+	97Ma	-	103 Ma	+
2/3/99	140	+	1	+	1	-	1	+	3200 australis 800 copenhagen 3200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 12600 copenhagen L1 130	+	98Ma	+	97Ma	-	103 Ma	+
2/3/99	141	+	0	+	0	+	0	+	200 copenhagen 800 icterohaemorrhagiae 3294 100 patoc 100 sentot 400 copenhagen L1 130	+	97Ma	+	98Ma	-	101 Ma	+
4/3/99	143	+	0	NR	NR	+	0	Sem Soro		NR		NR		NR		NR
4/3/99	144	+	0	+	0	+	0	+	800 copenhagen 200 hebdomadis 800 icterohaemorrhagiae 3294 400 icterohaemorrhagiae RGA 1600 copenhagen L1 130	+	97Ma	+	98 Ma	-	101 Ma	+
4/3/99	145	+	0	+	0	+	1	+	100 copenhagen 100 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhagen L1 130	+	97Ma	+	98Ma	-	101 Ma	+
5/3/99	146	+	0	+	0	+	0	+	100 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 200 copenhagen L1 130	+	97Ma	+	98Ma	-	101 Ma	+
5/3/99	147	+	0	+	0	+	0	+	200 canicoia L1 133	-	97Ma	-	98Ma	-	101 Ma	-
18/3/99	151	+	1	+	1	+	0	+	100 copenhagen 100 hebdomadis 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhagen L1 130	+	99Ma	-	99Ma	-	103 Ma	+

30/3/99	154	+	0	+	0	+	0	+	200 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhagen L1 130	+	99Ma	+	99Ma	-	103 Ma	+	
Total 53 ratos		Culturas Totais (53) Positivas 87% (46) Negativas 13% (7) Culturas sem contaminação 3 (51) Positivas 92% (47) Negativas 8% (4)						MAT Totais (51) Positivas 72,5% (37) Negativas 37,5% (14) Icterohamorrhagiae 86% (32) Djasiman 6% (2) Canicola 2% (1) Misturadas 6% (2)			Mer Total (35) Positivos 80% (28) Negativos 20%(7)		Grav Total (35) Positivos 63% (22) Negativos 37% (13)		B64 Total (35) Positivos 6% (2) Negativos 94% (33)		PCR Total Pos 86% (30) Neg 14% (5)
2/3/1999	142 (s)	-	1	-	1	-	1	+	200 patoc	-	98Ma	-	97Ma	-	103 Ma	-	
16/3/1999	150 (s)	-	1	-	1	NR	NR	-	-	-	96Ma	-	96Ma	-	102 Ma	-	
Total 2 sariguês		2 culturas totais, todas sem cont 3- 100% neg (2)						MAT Totais Positivas (1) 50% Negativas (1)50%			2 PCR 100% neg (2)		2 PCR 100% neg (2)		2 PCR 100% neg (2)		

Brotas		Culturas						Microaglutinação		PCR						
Data	An	Cult	cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Pág	PCR Tot
24/5/98	1	+	0	+	0	NR	NR	+	100 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 200 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
18/6/98	2	+	0	+	0	+	0	-	50 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
18/6/98	3	+	0	+	0	+	0	+	100 icterohaemorrhagiae 3294 800 icterohaemorrhagiae RGA 50 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
18/6/98	4	+	0	+	0	+	0	Sem Soro		NR		NR		NR		NR
18/6/98	5	+	0	+	0	+	0	+	200 copenhagen 400 cynopteri 800 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
18/6/98	6	+	2	+	2	+	3	+	100 copenhagen 400 icterohaemorrhagiae 3294 400 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
18/6/98	7	+	0	+	0	+	0	+	800 copenhagen 3200 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 1600 copenhagen L1 130	NR		NR		NR		NR
18/6/98	8	+	0	+	0	+	0	Sem Soro		NR		NR		NR		NR
30/6/98	9	+	0	+	0	+	0	Sem		NR		NR		NR		NR

								Soro								
30/6/98	10	+	2	+	2	+	2	-	-		NR		NR		NR	NR
30/6/98	11	+	0	+	0	+	0	-	-		NR		NR		NR	NR
30/6/98	12	+	2	+	2	+	3	-	-		NR		NR		NR	NR
9/7/98	21	+	0	+	0	NR	NR	+		3200 copenhageni 100 cuica 100 hebdomadis 6400 icterohaemorrhagiae 3294 6400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR	NR
9/7/98	22	-	3	-	3	-	3	-	-		NR		NR		NR	NR
21/7/98	33	+	0	+	0	NR	NR	+		200 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 400 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	+	53Mi
21/7/98	34	+	0	+	0	+	0	+		200 copenhageni 800 icterohaemorrhagiae 3294 200 copenhageni L1 130	NR		NR		NR	NR
21/7/98	35	+	0	+	0	NR	NR	+		100 copenhageni 100 icterohaemorrhagiae 3294 200 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
21/7/98	36	-	3	-	3	-	3	-	-		NR		NR		NR	NR
21/7/98	37	+	0	+	0	NR	NR	+		100 icterohaemorrhagiae 3294 200 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
21/7/98	38	+	1	+	1	NR	NR	+		200 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
21/7/98	39	+	1	+	+	NR	NR	+		200 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 400 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
29/7/98	40	+	0	+	0	NR	NR	-	-		-	49Mi	-	50Mi	-	53Mi
29/7/98	41	+	0	+	0	+	0	+		200 copenhageni 800 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 800 copenhageni L1 130	NR		NR		NR	NR
29/7/98	42	+	0	+	0	NR	NR	+		200 copenhageni 800 icterohaemorrhagiae 3294 800 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
29/7/98	43	+	0	+	0	NR	NR	+		400 copenhageni 1600 icterohaemorrhagiae 3294 1600 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
29/7/98	44	+	0	+	0	+	0	+		200 copenhageni 400 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 800 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
29/7/98	45	+	0	+	0	+	0	+		400 copenhageni 400 icterohaemorrhagiae 3294 1600 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi
17/8/98	71	+	0	+	0	+	0	+		100 copenhageni 200 copenhageni L1 130	+	49Mi	-	50Mi	-	53Mi

17/8/98	72	+	0	+	0	+	0	-	-	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi	+	
Total 29 ratos		Culturas Totais (29) Positivos (27) Negativos (2) Culturas sem contaminação 3 (27) Positivos (27)						MAT total (26) Positivos (18) Negativos (6) Icterohaemorrhagiae (18)			Mer Total (12) Positivos 98% (11) Negativos 2% (1)		Grav Total (12) Positivos 83% (10) Negativos 7% (2)		B64 (12) Positivos 2% (1) Negativos 98% (11)		PCR Total Pos 98%(11) Neg 2% (1)

São Caetano		Culturas						Microaglutinação		PCR						
Data	An	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Pág	PCR Tot
6/1/99	96 om	+	1	-	1	+	1	+	200 copenhageni 100 copenhageni L1 130	+	96Ma	+	96Ma	-	103 Ma	+
6/1/99	97	-	2	NR	NR	-	2	-	-	NR		NR		NR		NR
7/1/99	98	+	1	NR	NR	+	1	-	-	NR		NR		NR		NR
8/1/99	99	-	1	NR	NR	-	1	Sem soro		NR		NR		NR		NR
8/1/99	100	-	3	-	3	-	3	Sem soro		NR		NR		NR		NR
14/1/99	101	-	3	NR	NR	-	3	Sem soro		NR		NR		NR		NR
14/1/99	102	+	3	+	1	-	3	Sem soro		+	96Ma	+	96Ma	-	103 Ma	+
14/1/99	103	-	3	NR	NR	-	3	+	3200 copenhageni 800 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 800 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
14/1/99	104	-	1	-	1	-	1	-	-	-	98Ma	-	97Ma	-	103 Ma	-
14/1/99	105	-	1	-	1	-	1	Sem soro		NR		NR		NR		NR
17/1/99	106	+	1	NR	NR	+	1	+	200 copenhageni 400 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
17/1/99	107	+	1	+	1	+	1	+	400 copenhageni 400 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhageni L1 130	+	97Ma	-	98Ma	-	103 Ma	+
17/1/99	108	+	1	NR	NR	+	1	+	100 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA	NR		NR		NR		NR
17/1/99	109	-	0	-	0	-	0	-	-	-	97Ma	-	98Ma	-	103 Ma	-
17/1/99	110	+	0	NR	NR	+	0	+	200 autumnalis 100 copenhageni 100 cynopteri 200 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhageni L1 125 100 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
18/1/99	112	+	2	+	1	+	0	+	400 copenhageni 400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
18/1/99	113	-	0	NR	NR	-	0	Sem soro		NR		NR		NR		NR
21/1/99	115	+	1	-	2	+	1	-	-	NR		NR		NR		NR
22/1/99	117	-	0	NR	NR	-	0	+	200 Copenhageni 100 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA	NR		NR		NR		NR

22/1/99	118	+	1	+	1	+	1	+	200 copenhagen 100 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhagen L1 130	+	99Ma	+	99Ma	-		+		
22/1/99	119	-	1	-	2	-	1	-	-	NR	NR	NR		NR		NR		
27/1/99	122 om	+	3	+	3	+	3	Sem soro		NR	NR	NR		NR		NR		
26/1/99	123	+	0	-	3	+	0	-	-	NR		NR		NR		NR		
26/1/99	124	+	1	NR	NR	+	1	-	-	NR		NR		NR		NR		
27/1/99	125	-	1	-	2	-	1	+	800 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 200 copenhagen L1 130	-	96Ma	-	96Ma	-	103 Ma	-		
27/1/99	126 om	+	0	NR	NR	+	0	Sem soro		NR		NR		NR		NR		
27/1/99	127 om	+	0	NR	NR	+	0	Sem soro		NR		NR		NR		NR		
Total 27 ratos		Culturas totais (27) Positivos 55% (15) Negativos 45% (12) Cultura totais (24) Positivos 62,5% (15) Negativos 37,5% (9)							MAT totais (18) Positivos 55% (10) Negativos 45% (8) 9 icterohaemorrhagiae 1 Autumnalis			Mer Total (7) Pos 57% (4) Neg 43% (3)		Grav Total (7) Pos 43% (3) Neg 57% (4)		B64 Pos (0) Neg (7)		PCR total Pos 57% (4) Neg 43% (3)

Liberdade		Culturas							Microaglutinação		PCR					
Data	An	Cult	Cont	urina	c o nt	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Pág.	PCR Tot
1/7/98	13	+	1	+	1	+		+	200 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 copenhagen L1 130	NR		NR				NR
1/7/98	14	+	1	+	1	NR	NR	-	-	NR		NR				NR
2/7/98	15	+	1	+	1	NR	NR	+	200 copenhagen 400 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhagen L1 133	NR		NR				NR
2/7/98	16	-	3	-	3	-	3	-	-	NR		NR				NR
2/7/98	17	+	0	+	0	NR	NR	-	-	NR		NR				NR
3/7/98	19	+	0	+	0	NR	NR	-	-	NR		NR				NR
3/7/98	20	+	1	+	1	NR	NR	+	100 sentot	NR		NR				NR
16/7/98	27	+	0	+	0	NR	NR	-	-	+	49Mi	+	50Mi	-		+
14/7/98	31	+	0	+	0	NR	NR	+	200 copenhagen 200 icterohaemorrhagiae 3294 400 icterohaemorrhagiae RGA 400 copenhagen L1 130	NR		NR				NR

Total 9 ratos		Culturas Totais (9) Positivos 89% (8) Negativos 11% (1)						Total MAT Positivos 4 Negativos 5		1 PCR 100%p (1)	1 PCR 100%p (1)	0 PCR	1 PCR 100%p (1)			
		Culturas sem contaminação 3 (8) Positivos (8) Negativos (0)						Icterohaemorrhagiae (3) Djasiman (1)								
1/7/98	24(s)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	NR		NR				
1/7/98	25(s)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	100 patoc 200 sentot	NR		NR				
1/7/98	26(s)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	100 patoc	NR		NR				
16/7/98	32(s)	-	3	-	3	-	3	+	100 patoc	-	48 Mi	-	50 Mi	-	53 Mi	-
Total 4 sariguês		Culturas Totais (1) Negativos 100% (1)						Total MAT (4) Positivos 75% (3) Negativos 25% (1)		PCR Mer (1) Negativos (1)	PCR Grav Negativos (1)	PCR B64 Negativos (1)	PCR Total Neg (1)			
		Culturas sem contaminação 3 (0)						Semaranga 67% (2) Djasiman 33% (1)								

Mata Escura		Culturas						Microaglutinação		PCR						
Data	An	Cult	cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Pág.	PCR Tot
17/12/98	92	+	3	-	1	+	3	Sem soro		-	96 Ma	-	96Ma	-	102 Ma	-
17/12/98	93	+	0	-	1	+	0	Sem soro		+	96Ma	+	96Ma	-	102 Ma	+
17/12/98	94	-	3	NR	NR	-	3	Sem soro		NR		NR		NR		
17/12/98	95	+	3	NR	NR	+	3	+	100 copenhageni 100 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		
12/3/99	148 om	-	3	-	3	-	3	Sem soro		-	96Ma	+	96Ma	-	102 Ma	+
12/3/99	149	+	2	+	2	-	1	+	1600 copenhageni 100 griptophosa 800 icterohaemorrhagiae 3294 800 icterohaemorrhagiae RGA 1600 copenhageni L1 130	+	96Ma	+	96Ma	-	102 Ma	+
18/3/99	152	+	1	+	2	+	1	-	-	+	99Ma	+	99Ma	-	101 Ma	+
30/3/99	155	+	0	+	1	+	0	+	100 copenhageni 100 djasiman 400 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA 100 patoc 400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		
30/3/99	156	-	1	NR	NR	-	1	+	100 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 3294 100 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		

Total 9 ratos	Culturas totais (9) Positivos 67% (6) Negativos 33% (3) Culturas sem contaminação 3 Positivos 75% (6) Negativos 25% (2)			MAT total Positivos (4) Negativos (1) icterohaemorrhagiae (4)			PCR Mer Pos 60% (3) Neg 40% (2)	PCR Grav Positivos 80% (4) Negativos 20% (1)	PCR B64 Positivos 20% (1) Negativos 80% (5)	PCR Total Pos 80%(4) Neg 20% (1)	
18/3/99 Total 1 Sariguê	153	NR			MAT total (1) Negativos 100% (1)			PCR Mer Neg 100% (1)	PCR Grav Neg 100% (1)	PCR B64 Neg 100% (1)	PCR Total Neg 100%(1)

Dóron		Culturas						Microaglutinação			PCR					
Data	An	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Página	PCR Tot
21/1/99	114	+	1	+	1	+	1	+	100 hebdomadis 400 icterohaemorrhagiae3294 200 icterohaemorrhagiaeRGA 800 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
22/1/99	116 om	-	0	NR	NR	-	0	sem soro		NR		NR		NR		NR
27/1/99	120 om	+	1	+	1	+	1	sem soro		+	97Ma	+	98Ma	-	102 Ma	+
27/1/99	121 om	-	1	-	2	-	1	sem soro		NR		NR		NR		NR
28/1/99	128	+	0	NR	NR	+	0	+	100 copenhageni 200icterohaemorrhagiae3294 100icterohaemorrhagiaeRGA 100 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR
Total 5 ratos	Culturas totais Pos 60% (3) Neg 40% (2)			MAT Total (2) Positivos 100% (2) Icteroaemorrhagiae (2)			PCR Mer (1) Positivos 100% (1)	PCR Grav (1) Pos 100% (1)	PCR B64 Neg 100 %(1)	PCR Total Pos 100%(1)						

Matatu		Culturas						Microaglutinação			PCR					
Data	An	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Página	PCR Tot
17/8/98	74	+	NR	NR	+	1	1	-	-	NR		NR		NR	NR	NR
17/8/98	75	+	0	+	0	+	1	+	200 copenhageni 100 icterohaemorrhagiae 3294 400 copenhageni L1 130	NR		NR		NR	NR	NR
20/8/98	77	+	1	NR	NR	+	1	Sem Soro		NR		NR		NR	NR	NR
Total 3 ratos	Culturas Totais (3) Positivos 100% (3)			MAT total Positivos 50% (1) Negativos 50% (0) Icteroaemorrhagiae (1)			PCR Mer (1) Positivos 100% (1)	PCR Grav (1) Pos 100% (1)	PCR B64 Neg 100 %(1)	PCR Total Pos 100%(1)						
Alto do Cruzeiro		Culturas						Microaglutinação			PCR					
Data	An	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Página	PCR Tot

19/8/98	76	+	1	-	1	+	1	Sem Soro		NR		NR		NR			
19/8/98	78	-	2	NR	NR	-	2	sem soro		NR		NR		NR			
20/8/98	82	+	1	-	1	+	1	+	200icterohaemorrhagiae3294 100icterohaemorrhagiaeRGA 100 saxkoebing 200 copenhageni L1 130	+	49Mi	+	50Mi	-	53Mi	+	
Total Alto do Cruzeiro 3 ratos	Culturas Totais (3) Positivos 67% (2) Negativos 33% (1)							MAT Total Positivos (1) Icterohaemorrhagiae (1)			Mer total Positivos (1)		Grav Total Positivos (1)		B64 Total Negativos (1)		PCR Total (1)
Pernambúes		Culturas						Microaglutinação			PCR						
Data	An	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Página	PCR Tot	
4/9/98	83	+	2	+	2	+	2	+	100 icterohaemorrhagiae 3294	NR		NR		NR		NR	
4/9/98	84	+	1	+	1	+	1	+	800 icterohaemorrhagiae RGA 100 copenhageni L1 130	NR		NR		NR		NR	
4/9/98	85	+	2	+	2	+	2	+	100 copenhageni 100 icterohaemorrhagiae 3294 200 icterohaemorrhagiae RGA	NR		NR		NR		NR	
Total 3 ratos	Culturas totais Positivos 100% (3)							MAT Total Positivos 100% (3) Icterohaemorrhagiae (3)									
Lobato		Culturas						Microaglutinação			PCR						
Data	Na	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Página	PCR Tot	
1/7/98	18	+	0	+	0	NR	NR	+	100 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae3294 100 patoc 100 copenhageni L1 130	NR		NR	NR			NR	
Total 1 rato	Culturas Totais Positivos 100% (1)							MAT Total Positivos 100% (1)									
Ondina		Culturas						Microaglutinação			PCR						
Data	Na	Cult	Cont	urina	cont	rim	cont	MAT	Títulos	Mérien	Página	Grav	Pág	B64	Página	PCR Tot	
16/1/99	111(s)	-	2	-	2	-	2	-		-	98Ma	-	97Ma	-	-	-	
Total 1 sariguê	Cultura totais Negativos 100% (1)							MAT total Negativos 100% (1)			PCR Mer Negativos 100% (1)		PCR Grav Negativos 100% (1)		PCR B64 Negativos 100% (1)		PCR Total neg 100% (1)

Anexo 10- Texto extraído do jornal A Tarde sobre leptospirose.

O texto informa as condições de saneamento básico do bairro de Boa Vista de São Caetano no mês de julho do ano de 1998.

Dique vira fonte de doenças na Boa Vista de São Caetano *Laura Angelim*

O bairro Boa Vista de São Caetano está abandonado e esquecido dos poderes públicos. Montes de lixo podem ser encontrados em qualquer canto de rua, atraindo insetos e ratos. É uma das localidades da cidade que registra maior índice de casos de leptospirose. Só este ano três pessoas morreram vítimas da doença. Também o alto índice de casos de dengue representa mais um problema para a população.

O problema de saúde no bairro, a cada dia que passa, agrava-se mais ainda. Nelson Santana, presidente do Conselho de Moradores, aponta o dique, considerado a segunda maior bacia do Camurujipe em Salvador, como a principal fonte de doenças na área. O dique, que possuía águas límpidas, onde barquinhos navegavam, agora se transformou num tapete de mato e em verdadeiro criatório de ratos e insetos. O pior, alerta o presidente, é que áreas adjacentes a ele foram loteadas e várias famílias estão construindo casas no local.

Além de se expor ao perigo de doenças, correm, também, o risco de terem suas casas encobertas por lama, já que estão sendo construídas ao lado de uma rua, a Travessa São Jorge, que, na verdade, é uma estrada de barro, topo de um barranco. Se não for feito serviço de drenagem, certamente no local poderá surgir outro "Alagados", a exemplo do Dique do Ladrão, localizado na Barriquinha, onde foram construídas casas por cima das águas. O bairro Boa Vista de São Caetano já tem um "Alagados" e não quer que outro surja no local, alerta o presidente.

O presidente do conselho, Nelson Santana, teme pela saúde dos moradores. Ele denuncia que o único posto de saúde existente na Boa Vista de São Caetano está desativado há anos. Mesmo pertencente à prefeitura, o posto, que teve todos os equipamentos roubados, hoje, estranhamente, está servindo de residência para uma família e abriga a sede da Associação de Moradores. A fachada da casa está arruinada. Nelson lembra que o posto integra a Escola Helena de Magalhães e quadra de esportes. Deveria estar incluído nas obras de restauração que vêm sendo realizadas na escola, financiadas pelo Bird (Banco Mundial) em parceria com o MEC e o governo do estado.

Entretanto, tanto o posto como a quadra de esportes estão intocados. O espaço cedeu lugar ao lixo, que rodeia o paredão da escola e serve de local para os motoristas, principalmente os de ônibus, efetuarem manobras. Mesmo cientes de que a quadra pertence à escola, os moradores já estão se cotizando para recuperá-la, já que se localiza extramuros escolar. Se, por um lado, o conselho defende o espaço para os estudantes, a população quer que a quadra permaneça em área livre, servindo de local de lazer para os moradores. Já o posto de saúde, transformado, ilegalmente, em residência, divide a opinião dos moradores. Uns defendem a reinstalação do posto de saúde, enquanto outros acham que o local deve ser ocupado pela associação.

Crateras

A formação de crateras por toda a extensão da principal via do bairro, a Rodovia A, é outro exemplo do descaso dos poderes públicos. O problema se arrasta desde a gestão do prefeito Fernando José. Representantes do Conselho de Moradores estiveram por quatro vezes seguidas na Secretaria da Infra-Estrutura, que prometeu recapear a pista. Já se passaram seis meses e as promessas ainda não foram cumpridas.

A Rodovia A está intransitável, principalmente no trecho que faz bifurcação com a Primeira Travessa Rodovia A. Explicou o presidente do conselho que os motoristas, em consequência da péssima conservação da pista, estão apresentando problemas de saúde, principalmente dores na coluna e braços. Eles fazem malabarismos para desviar os veículos dos ferros das bocas-de-lobo e dos enormes buracos e acabam tendo desgaste físico e emocional. Já os proprietários das empresas de ônibus ameaçam diminuir a frota, já que estão tendo muitos gastos para recuperar os veículos danificados.

Encostas

Como representante da comunidade, ele faz mais um alerta às autoridades: que tomem providências com relação ao problema das encostas. Ele lembra que no ano de 1988 um barranco cedeu na Rua Angélica Rocha, causando a morte de muitas pessoas e ferimentos em outras. Mesmo depois do acidente, muitas famílias continuaram a construir casas irregularmente na área. O problema persiste até hoje e é agravado, ainda mais, com o lixo que é jogado nas encostas. Nelson Santana não descarta a possibilidade de, no próximo inverno, ocorrer outro deslizamento de terra, o que poderia ser fatal para os moradores.