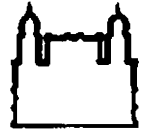




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



**UFBA**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**FIOCRUZ**

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

# **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODOS BASEADOS EM PCR PARA DIAGNÓSTICO E TIPAGEM MOLECULAR DE CEPAS ISOLADAS EM EPIDEMIAS URBANAS DE LEPTOSPIROSE EM SALVADOR - BAHIA**

**SUZANA RAMOS FERRER**

Salvador - Bahia  
2000



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

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODOS  
BASEADOS EM PCR PARA O DIAGNÓSTICO E  
TIPAGEM MOLECULAR DE CEPAS ISOLADAS EM  
EPIDEMIAS URBANAS DE LEPTOSPIROSE EM  
SALVADOR-BAHIA**

**SUZANA RAMOS FERRER**

**PROFESSOR ORIENTADOR:**

**MITERMAYER G. REIS**

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

Salvador – Bahia

2000

**C Pq G M  
Biblioteca**

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

Ferrer, Suzana Ramos

F368d      Desenvolvimento e avaliação do método de PCR para  
diagnóstico e tipagem molecular na leptospirose epidêmica em  
Salvador – Ba / Suzana Ramos Ferrer. \_\_ Salvador: Faculdade  
de Medicina da UFBA / CPqGM, 1999.

70p. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade  
Federal da Bahia, 1999.

1. Leptospirose. 2. Diagnóstico. 3. Tipagem. 4. PCR. 5.  
Salvador. I. Título.

CDU 616.986.7-

212361

1999  
11/11/99  
104040

636.486-079(622.8)  
FERRER

**Desenvolvimento e Avaliação de Métodos Baseados em PCR para o Diagnóstico e Tipagem Molecular de Cepas isoladas em Epidemias Urbanas de Leptospirose em Salvador – BA.**

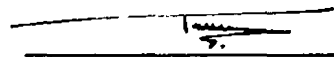
**Suzana Ramos Ferrer**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

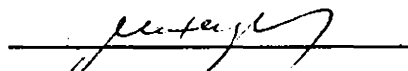
**COMISSÃO EXAMINADORA**



**Dra. Martha Maria Pereira**  
Bióloga, Pesquisadora Titular  
Fundação Oswaldo Cruz



**Dr. José Tavares Neto**  
Médico, Professor Adjunto  
Universidade Federal da Bahia



**Dr. Mitermayer Galvão dos Reis**  
Médico, Pesquisador Titular  
Fundação Oswaldo Cruz

**Ao meu filho Caio e ao meu esposo Eduardo, por compartilhar  
todos os momentos com amor e paciência.**

## **AGRADECIMENTOS**

---

- Aos Drs. Mitermayer Galvão dos Reis e Dr. Albert Ko pela dedicação e ensinamentos prestados em todos os momentos desse trabalho.
- À Prof<sup>ª</sup>. Hygia Maria Nunes Guerreiro pelo incentivo e encorajamento para vencer todas as etapas desse trabalho.
- À Joice Neves Reis e Tânia Fraga Barros pela amizade e companheirismo mostrados em todos os momentos.
- À Patrícia Oliveira Guimarães que contribuiu no processamento das amostras para confirmação diagnóstica da leptospirose.
- A equipe de médicos e servidores do Hospital Couto Maia, em especial, aos Drs. Everaldo Costa, Hagamenon Silva, Edilson, Paulo Malboisson, Silene Dantas, Cibele Dourado, Kátia Salgado e ao Dr. José Tavares-Neto da Faculdade de Medicina pela contribuição para que o estudo fosse realizado.
- Aos estudantes Fernanda Pinheiro, Phill Peters, que participaram da coleta das amostra no Hospital Couto Maia.
- Aos Drs. Warren Johnson e Lee Riley pela disponibilidade de recursos que contribuíram para a realização desse trabalho.
- À Dr<sup>ª</sup>. Martha Maria Pereira do Centro de Referência Nacional para Leptospirose pela caracterização de parte dos isolados de leptospiras.
- Ao Prof. Manuel Barral-Netto, coordenador do curso de pós graduação pelo excelente trabalho que vem desenvolvendo.
- Aos professores do curso de Mestrado em Patologia humana da FAMED/UFBA pela seriedade e eficiência que conduziram o curso.
- Aos colegas do curso de Mestrado pela amizade que se desenvolveu durante a nossa convivência.
- À Graziela Trócoli pela colaboração na análise dos dados.
- Aos colegas e amigos do LPBM pela amizade, disponibilidade e apoio em todos os momentos da realização desse trabalho.
- À Rosália Oliveira da Silva pela imensa dedicação e competência com que exerce suas funções e pela amizade e incansável colaboração.
- À Tânia de Faria, Itamar Crispim, Marcos Mota e Pedro Vivas dos Setores de comunicação visual e informática pelo apoio na elaboração dos recursos visuais e de editoração necessários no desenvolvimento desse trabalho.
- Às bibliotecárias do CPqGM, em especial a Ana Fiscina pelo apoio na organização e consulta bibliográfica.
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz pela disponibilidade de espaço físico, pessoal e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho e ao custeio da minha bolsa de estudo.
- Ao programa Nordeste, CNPq, processo número 521229/98-7, pela disponibilidade de recursos.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 IMPACTO DA LEPTOSPIROSE PARA A SAÚDE PÚBLICA .....	15
1.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL .....	16
1.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>LEPTOSPIRA</i> PARA OS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS..	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 GERAL .....	26
2.2 ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIA</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO .....	30
4.1.1 <i>Local do estudo</i> .....	30
4.1.2 <i>População estudada</i> .....	30
• 4.1.2.1 Critérios de inclusão .....	30
• 4.1.2.2 Seleção dos pacientes e coleta de dados clínicos e epidemiológicos .....	31
• 4.1.2.3 Coleta e processamento das amostras clínicas .....	31
4.2 TESTES DIAGNÓSTICOS PADRÃO PARA A LEPTOSPIROSE .....	33
4.2.1 <i>Diagnóstico sorológico – Teste de microaglutinação</i> .....	33
4.2.2 <i>Diagnóstico microbiológico – cultura de leptospiras</i> .....	35
4.2.3 <i>Definição de caso</i> .....	36
4.3 ENSAIO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) .....	36
4.3.1 <i>Definição do limite de detecção de leptospiras em urina e plasma</i> .....	36
4.3.2 <i>Primers</i> .....	37
4.3.3 <i>Amostras clínicas e controles testados</i> .....	38
4.3.4 <i>Extração de DNA</i> .....	39

4.3.5	<i>Protocolo de amplificação</i>	39
4.3.6	<i>Eletroforese</i>	40
4.4	TIPAGEM BACTERIANA	41
4.4.1	<i>Sorogrupagem e sorotipagem</i>	41
4.5	TIPAGEM MOLECULAR- REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA	42
4.5.1	<i>Primers</i>	42
4.5.2	<i>Cepas</i>	44
4.5.3	<i>Extração de DNA</i>	45
4.5.4	<i>Protocolo de amplificação</i>	46
4.5.5	<i>Eletroforese e análise dos produtos amplificados</i>	46
5	RESULTADOS	48
5.1	CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS CASOS DE LEPTOSPIROSE	48
5.1.1	<i>Identificação dos pacientes e coleta de amostras</i>	48
5.1.2	<i>Confirmação laboratorial pela Microaglutinação</i>	48
5.1.3	<i>Confirmação laboratorial por cultura</i>	50
5.2	AVALIAÇÃO DO PCR PARA DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE	51
5.2.1	<i>Estabelecimento do limite de detecção do PCR</i>	51
5.2.2	<i>Padronização do método</i>	52
5.2.3	<i>Amplificação de amostras clínicas</i>	53
5.3	SOROTIPAGEM	58
5.4	TIPAGEM MOLECULAR	59
5.4.1	<i>Padronização do método de PCR</i>	59
5.4.2	<i>Aplicação do método para isolados dos estudos epidemiológicos</i>	63
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76



## RESUMO

**Desenvolvimento e avaliação de métodos baseados em PCR para diagnóstico e tipagem molecular de cepas isoladas em epidemias urbanas de leptospirose em Salvador-Ba.** A leptospirose, uma zoonose causada por uma espiroqueta do gênero *Leptospira*, é uma doença presente na maioria dos países do mundo sendo um problema de grande impacto social no Brasil. Os objetivos deste estudo foram de confirmar o diagnóstico dos casos com suspeita clínica de leptospirose pela microaglutinação e cultura, desenvolver o ensaio da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico da leptospirose, determinando a sensibilidade e especificidade desse teste e desenvolver e aplicar métodos baseados em reação da polimerase em cadeia para amplificação de regiões intergênicas entre elementos repetitivos de leptospirosas para tipagem molecular de cepas isoladas em estudos epidemiológicos. A população do estudo foi composta por pacientes admitidos no Hospital Couto Maia com diagnóstico clínico de leptospirose na admissão, durante o período de 05/05/97 a 28/11/97. A confirmação diagnóstica foi realizada através da microaglutinação em 51,3% (83/162) dos casos identificados. 36,4% (59/162) dos pacientes não foram confirmados por este teste. O isolamento de leptospirosas foi realizado em 45,5% (30/66) dos pacientes testados. Foram identificados através da hemocultura 56,7% (17/35) dos casos confirmados pela MAT. Para a realização do PCR para diagnóstico foram obtidas amostras de plasma e/ou urina de 129 pacientes. O PCR apresentou uma sensibilidade de 44% (36/83) em amostras de urina, 21% (16/78) em plasma e de 57% (37/65) quando foram testadas amostras pareadas de plasma e urina. No grupo de controles negativo não houve reação positiva pelo PCR, representando uma especificidade de 100%. Nos pacientes nos quais foram colhidas amostras com menos de sete dias de sintoma, a positividade do PCR foi de 42% (13/31) para amostras de urina e 30% (6/23) para amostras de plasma. O PCR de leptospirose mostrou não possuir as condições requeridas para sua implantação a nível ambulatorial, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos testes diagnósticos. Foram tipadas pelo método de PCR 63 (71%) dos isolados de casos humanos e 35 (35%) de ratos em Salvador- Ba e os padrões obtidos foram comparadas com os de cepas de referência. As amostras pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae possuíram padrão semelhante entre si. O método de tipagem molecular pelo PCR demonstrou ser uma técnica reprodutível e fácil de ser realizada, funcionando como uma metodologia alternativa para tipagem de cepas de leptospirosas.

Palavras chave: Leptospirose- PCR- Diagnóstico- Tipagem

## ABSTRACT

Development and evaluation of the PCR method for the diagnosis and molecular typing of urban epidemic leptospirosis in Salvador-Ba. Leptospirosis, a zoonose caused by the spiroquete *Leptospira*, is an illness present in many countries around the world. It's considered a problem of great social impact in Brazil. The objectives of this study were: (1) to confirm the diagnosis of cases with clinical suspicion of leptospirosis by the microagglutination test and culture, (2) to develop the polimerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of leptospirosis, including determination of the sensitivity and specificity of this test, (3) to develop and apply these methods based on the amplification of intervening regions between repetitive elements of leptospira's genome for the molecular typing of strains in Salvador-Ba. The population selected for the study were patients who were to admitted to Couto Maia Hospital, clinically suspected of having leptospirosis in the period between 05/05/97 to 11/28/97. Diagnostic confirmation was done by microagglutination test from 51,3%(83/162) of identified cases. 36,4% (59/162) of the patients were not confirmed by this test. From 45,5%(30/66) of the patients tested, 56,7% had a positive blood culture for *Leptospira*. Polimerase chain reaction was carried out for 129 patients either from plasma or urine samples by using previous described methodology of centrifugation and boiling for extraction of DNA. The PCR resulted in a 44%(36/83) sensitivity when urine samples were tested, 21% (16/78) from plasma samples and 57% (37/95) when both plasma and urine were used. In the negative control group there were no positives PCR reaction, showing thus a 100% sensitivity. From patients whose samples were taken before the seventh day of symptoms, there was a positive reaction from 42% (13/31) of urine samples and 30%(6/23) of plasma samples. The PCR method for leptospira used in this study did not yield the necessary results to be used in out-patient clinics, showing a need for the development of new diagnostic tests. Molecular typing of isolates were also done by PCR methodology. Sixty-three human isolates and 35 rat isolates studied from Salvador Ba were also processed comparing the isolates to reference isolates using the PCR method described above. All the samples typed as Icterohaemorrhagiae seragroup had a similar band pattern. The PCR molecular typing method used is a reproducible and easy to use technic, and can be used as an alternative methodology for the typing of leptospira strains.

# 1 INTRODUÇÃO

---

As *Leptospiras* são espiroquetas aeróbias obrigatórias, helicoidais, flexíveis e móveis, medindo usualmente de 6 a 20 $\mu$ m de comprimento e cerca de 0,1 $\mu$ m de diâmetro (VERONESI et al., 1996). Apresentam as extremidades dobradas ou em forma de gancho. São visíveis à microscopia óptica com campo claro quando coradas, porém são facilmente visualizadas em microscopia de campo escuro ou de contraste de fase. As leptospiras são cultivadas em meios contendo soro de coelhos ou albumina e ácidos graxos. Crescem bem a um pH entre 6,8-7,4 e em temperaturas entre 28-30°C, necessitando de um período de incubação de até seis semanas (FAINE, 1993; FARR, 1995).

Devido a grande diversidade antigênica das leptospiras, acima de 250 sorovares já foram identificados e divididos em mais de 23 sorogrupos baseados na similaridade antigênica apresentada por esses sorovares, reveladas por provas de aglutinação cruzada com anti-soros produzidos em coelhos contra cada sorovar (KMETY & DIKKEN, 1993). A classificação taxonômica atual divide o gênero *Leptospira* em espécies através do uso de técnicas moleculares de hibridização de DNA, sendo dessa forma identificadas oito espécies patogênicas: *L.interrogans*, *L.borgpetersenii*, *L.weillii*, *L.noguchii*, *L.santarosai*, *L.inadai*, *L.kirschneri* e a recém identificada *L.fainei* (PEROLAT et al., 1998) e três não patogênicas, *L.biflexa*, *L.wolbachii*, *L.meyeri* (RAMADAS et al., 1992; YASUDA et al., 1987).

Um largo espectro de animais servem como reservatórios, sendo portadores da bactéria nos rins e excretando-a na urina. Dentre os reservatórios mais conhecidos destacam-se caninos, bovinos, suínos, roedores silvestres, marsupiais em meio rural e

o rato doméstico (*Rattus rattus*, *R. norvegicus*) no meio urbano (FARR,1995). A infecção humana resulta do contato com urina ou tecidos de animais infectados ou através do contato com água ou ambiente contendo leptospiras, existindo uma forte associação da infecção com as condições ambientais, como o saneamento básico precário, coleta de lixo deficiente e uma elevada precipitação pluviométrica (CALDAS et al., 1979).

A leptospirose pode apresentar-se clinicamente de duas formas: anictérica ou icterícia (FAINE, 1993). A forma anictérica apresenta-se classicamente como doença bifásica. Na fase septicêmica os sintomas iniciam abruptamente com febre elevada, calafrios, cefaléia intensa e mialgia (VERONESI et al., 1996). Seguindo-se à defervescência da febre e dos sintomas, inicia-se a fase imune. Na fase septicêmica, os podem progredir para formas graves e potencialmente fatais da doença como a síndrome de Weil, apresentando disfunção hepática, insuficiência renal aguda e hemorragia. Na leptospirose icterícia o curso bifásico não é observado e a febre persiste sem defervescência entre os dois estágios. Essa forma severa da doença foi caracterizada clinicamente por Adolf Weil em 1886 que descreveu quatro casos de homens com febre, icterícia , hemorragia e insuficiência renal (WEIL, 1886), sendo o agente causador isolado em 1915 por Inada, que o denominou *Spirocheta icterohaemorrhagiae* (INADA et al., 1916).

## 1.1 IMPACTO DA LEPTOSPIROSE NA SAÚDE PÚBLICA

A leptospirose é uma doença presente em diversos países do mundo sendo considerada primariamente como doença tropical e rural (FAINE,1982; FARR,1995). Em países desenvolvidos a leptospirose é uma doença rara e tem sido associada à exposição ocupacionais (FAINE, 1993) ou a atividades recreativas. Apresenta uma taxa de mortalidade que varia entre 5,0 e 40% (FAINE, 1982) e embora exista uma grande diversidade geográfica das formas clínicas, de uma maneira geral, elas têm um forte impacto social.

Diferente do que ocorre nos países desenvolvidos, no Brasil a leptospirose é uma doença urbana, com epidemias anuais, constituindo-se em uma importante causa de morbidade. Foram descritas grandes epidemias urbanas, que ocorreram em períodos de chuvas fortes, como no Rio de Janeiro, onde nos meses de fevereiro a abril de 1988 foram registrados 1.117 casos de internações devido a leptospirose (RIOS GONÇALVES, 1990). Em Recife foi descrito um surto epidêmico de leptospirose em 1966 após fortes chuvas e enchentes ocorridas naquela cidade, com 508 casos suspeitos de leptospirose, sendo que 35,5% tiveram confirmação laboratorial para a doença (AZEVEDO & CORREIA, 1968).

Em Salvador- Bahia, durante os meses de maio e junho de 1978 foram investigados 141 pacientes com suspeita clínica para leptospirose, tendo sido confirmados 76,6% desses casos. Essa epidemia ocorreu após período de fortes chuvas com um índice de precipitação pluviométrica de 819,6 mm nos dois meses do estudo (CALDAS et al., 1979). A observação de que as elevadas precipitações

pluviométricas, associadas à deficiente rede pluvial, em diversos bairros da cidade de Salvador, concorriam para a difusão da leptospirose já havia sido feita pelo autor e colaboradores desde 1975 (CALDAS et al., 1977).

No ano de 1996, em Salvador- Bahia, foram identificados 326 casos de leptospirose. A taxa de letalidade entre os casos hospitalizados foi de 15% sendo que 56% das mortes ocorreram nas primeiras 48 horas da admissão hospitalar (KO et al., 1999). Nos últimos três anos de vigilância foram identificados 1123 casos durante as epidemias associadas a chuvas e 23% desses casos foram hospitalizados com complicações graves, necessitando de apoio terapêutico como diálises, o que representa um custo significativo para o setor público.

## **1.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL**

O diagnóstico clínico da leptospirose na fase inicial da doença é dificultado pelo largo espectro de sintomas inespecíficos apresentados como febre, cefaléia, mialgias (FAINE et al., 1996; FARR, 1995), sendo por este motivo freqüentemente confundida com outras doenças febris como dengue, malária, febre tifóide e hepatite viral. Em 1995 um surto de leptospirose ocorrido na Nicarágua, apresentando casos com hemorragia pulmonar grave, teve o seu diagnóstico dificultado por ter sido confundida inicialmente com dengue (ZAKI & SHIEH, 1995). Problema semelhante aconteceu em Salvador-Bahia, quando em um estudo sobre leptospirose epidêmica nesta cidade, foi demonstrado que mais de 50% dos pacientes procuraram atendimento nos primeiros

três dias de sintomas e 57% dos pacientes entrevistados tiveram um diagnóstico prévio de dengue (KO et al., 1999).

Há um consenso de que existe um maior benefício terapêutico reduzindo as complicações quando o tratamento é administrado nos primeiros dois a três dias da doença (FAINE et al., 1982; FARR, 1995). McCLAIN et al., 1984 estudaram a eficácia da terapia antimicrobiana em pacientes com leptospirose e demonstraram que a doxiciclina administrada nos três primeiros dias da doença diminuiu a duração dos sintomas e a gravidade das manifestações clínicas. Dessa forma, a identificação precoce da leptospirose com confirmação diagnóstica são importantes para que o tratamento com antibióticos seja iniciado a tempo para prevenir o desenvolvimento de complicações graves da doença.

Para a intervenção do tratamento são necessários testes diagnósticos que detectem a leptospirose precocemente. Os métodos padrões para o diagnóstico da leptospirose, que são a microaglutinação (MAT) e a cultura, são técnicas demoradas, laboriosas e de difícil execução. A microaglutinação baseia-se na demonstração de anticorpos específicos no soro que aglutina leptospiros de uma bateria de mais de 20 cepas de referência. Essas cepas são mantidas através de passagens em meios de cultura e o teste envolve diversas leituras de aglutinação em microscópio de campo escuro para cada soro testado. Em humanos, anticorpos anti-leptospiros tornam-se detectáveis na microaglutinação por volta do sétimo dia da doença (FAINE, 1982). Além disso, uma segunda amostra de soro, durante a fase convalescente, é necessária para demonstrar a soroconversão pelo aumento dos títulos de anticorpos, o que implica no retorno do paciente para nova coleta, sendo uma importante limitação para conclusão do diagnóstico.

O diagnóstico da leptospirose através do isolamento de leptospiras é um método que possui dificuldades técnicas para sua realização. O isolamento da bactéria do sangue é possível na fase inicial septicêmica da doença e o isolamento a partir da urina é tecnicamente limitado pela presença de contaminantes que inibem o crescimento de leptospiras. A técnica de cultivo de *Leptospira* é laboriosa e demorada, pois requer períodos de incubação de até seis semanas. Devido a baixa sensibilidade, em torno de 50%, os pacientes não são diagnosticados no período inicial da doença e não são tratados adequadamente. Embora o isolamento de leptospiras apresente dificuldades e não atenda a tempo as necessidades de diagnóstico, ela é fundamental para a identificação do agente etiológico.

Diversas técnicas sorológicas de triagem foram desenvolvidas para o diagnóstico da leptospirose como a Macroaglutinação (FAINE et al., 1982; Ministério da Saúde, 1995; BRANDÃO et al., 1998), DOT- ELISA (PAPAS, 1985; RIBEIRO, 1995); ELISA- IgM (TERPSTRA et al., 1985; WINSLOW et al., 1997) Imunofluorescência (APPASSAKIJ et al., 1995) e recentemente , o LEPTO *dipstick* (GUSSENHOVER et al., 1997; SEHGAL et al., 1999; YERSIN et al., 1999; SMITS et al., 1999). Apesar de alguns desses testes terem apresentado uma sensibilidade em torno de 60-85% e uma especificidade acima de 90%, os mesmos detectam anticorpos que reconhecem primariamente componentes carboidratos de leptospiras, que têm uma resposta e uma baixa sensibilidade na fase aguda da infecção, com menos de sete dias de sintomas. Esses testes de triagem foram avaliados em um número limitado de pacientes de diferentes situações epidemiológicas. O LEPTO *dipstick* foi validado testando-se 867 soros de pacientes confirmados para leptospirose e controles, apresentando uma sensibilidade de 78,7% e especificidade de 88,3% (SEHGAL et al., 1999). Outro estudo



de validação do LEPTO *dipstick* foi realizado por SMITS e colaboradores (1999), envolvendo 2057 pacientes com suspeita de leptospirose de 12 países diferentes. A sensibilidade do ensaio foi de 60,1% em soros agudos e 84,7% para amostras de fase convalescente. Desta forma, a MAT continua sendo o teste de escolha para identificação sorológica de sorogrupos de leptospiras nos estudos populacionais.

Dentre as técnicas recém desenvolvidas, o ensaio da polimerase em cadeia (PCR) tem particular interesse por não necessitar de resposta de anticorpo do hospedeiro, que é variável durante a fase inicial da infecção. O PCR têm sido aplicado para detecção de diversos microorganismos, como por exemplo infecções por *Mycobacterium leprae* (DE WIT et al., 1990), *Mycobacterium tuberculosis* (WOODS & COLE, 1989), *Treponema pallidum* (HAY et al., 1990), *Borrelia burgdorferi* (ROSA & SCHWANN, 1989) e para o diagnóstico da leptospirose em animais (MASRI et al., 1997; BOLIN, 1996) e humanos (MÉRIEN et al., 1995; GRAVEKAMP et al., 1993). Entretanto até o presente momento o teste de PCR para leptospirose não foi validado em estudos populacionais exceto no trabalho descrito por MÉRIEN e colaboradores (1995) que testou 115 amostras clínicas e mostrou que o PCR foi positivo em 48% (43/89) das amostras de soro, e em 25% (5/20) amostras de urina, o que representa uma baixa positividade em se tratando de um teste sensível como o PCR. Outro estudo foi realizado por BAL e colaboradores na Holanda, quando avaliaram 29 pacientes soropositivos para leptospirose e 30 amostras de controles negativos representados por voluntários sadios e pacientes com outras infecções. Nesse estudo foram encontradas 26 amostras positivas (90%) pelo PCR das 29 amostras testadas (BAL et al., 1994).

O PCR é um teste capaz de detectar pequeno número do microorganismo, até uma leptospira, através de uma etapa adicional de hibridização dos produtos

amplificados com sondas específicas como descrito por MÉRIEN e colaboradores, (1995), mas a sua aplicação na identificação precoce da leptospirose, em pacientes em nível ambulatorial precisa ser analisada. A necessidade do uso de reagentes importados para realização desses testes e conseqüente aumento do custo das reações, dificulta a implantação e manutenção do sistema de diagnóstico, como por exemplo no setor público.

No presente estudo, o PCR foi utilizado para análise de amostras de pacientes com diagnóstico clínico inicial de leptospirose para avaliar a detecção do DNA de leptospiras na fase inicial da doença, objetivando um diagnóstico rápido e efetivo da leptospirose pelo PCR. Para atingir esse objetivo foi desenvolvido um sistema simples para extração de DNA das amostras clínicas de plasma e urina, baseada em um método de centrifugação e fervura para liberação do DNA dessas amostras imediatamente após a coleta.

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *LEPTOSPIRA* NOS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

A caracterização das cepas de *Leptospira* é importante para a vigilância epidemiológica na detecção de fontes potenciais de infecção e reservatórios. Diferentes sorovares de leptospiros são mais prevalentes em determinadas regiões e são mantidos em hospedeiros animais os quais servem como reservatórios da infecção, a exemplo do sorovar *icterohaemorrhagiae* que está associado a infecções cuja fonte de contaminação é o rato doméstico (SONGER, 1983), assim como o sorovar *pomona* está relacionado com infecções em suínos (BOLIN, 1996) e o *canicola* com cães. Recentemente, os sorovares *grippityphosa* e *pomona* foram identificados como causadores de leptospirose canina nos Estados Unidos (BOLIN, 1996). A emergência desses sorovares têm importância para a transmissão da doença devido ao contato de cães com suínos, aumentando o risco da exposição desses animais para leptospiros. No Brasil, estudos têm demonstrado a presença de diferentes sorovares em animais domésticos e selvagens (CORDEIRO & SULZER, 1981; CORDEIRO et al., 1983) porém, a frequência com que estes sorovares causam infecção humana e os fatores envolvidos na transmissão foram pouco estudados. Como a infecção humana se dá pelo contato direto com a urina ou com ambiente contaminado pela urina desses reservatórios, o resultado da sorotipagem pode indicar qual o reservatório responsável pela transmissão, indicando as fontes potenciais de infecção, fornecendo informações importantes para definição de ações de controle para prevenção da transmissão da doença.

As manifestações clínicas da doença estão também associadas com os diferentes sorovares de *Leptospira*, estando o sorovar *icterohaemorrhagiae* associado às formas graves da leptospirose (FAINE,1982), assim como o sorovar *lai* foi isolado em uma epidemia na Coreia estando associado com a forma pulmonar hemorrágica, que é a manifestação clínica mais freqüente da leptospirose naquele país (PARK et al., 1989). BERMAN e cols. (1973) em estudo no sul do Vietnã, demonstraram que os sorovares *hebdomadis* e *autumnalis* estavam associados com as formas anictéricas da leptospirose assim como com as formas benignas da infecção.

As leptospiras são caracterizadas em sorotipos ou sorovares com base nas suas características antigênicas. Dois ou mais sorotipos antigenicamente relacionados formam um sorogrupo. O método para identificação dos sorogrupos de leptospiras que envolve a utilização de anti-soros específicos produzidos em coelhos, têm identificado mais de 200 sorovares patogênicos que estão divididos em 23 sorogrupos (KMETY & DIKKEN,1993). A sorotipagem das leptospiras é feita pelo método da microaglutinação baseada na absorção de aglutininas. Um sistema alternativo de sorotipagem com a utilização de anticorpos monoclonais têm sido desenvolvida para determinação e localização de determinantes antigênicos (LEITE et al., 1996). Esses métodos sorológicos para tipagem de *Leptospira* são demorados, de difícil realização e interpretação e têm um custo elevado além da limitação de serem realizados apenas em centros de referência nacionais ou internacionais.

Recentemente, tem sido desenvolvidos métodos de genotipagem para diferentes gêneros de bactérias, inclusive para leptospiras, baseados na seqüência de DNA. Devido a variedade genética das leptospiras, diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas como sistema adicional de tipagem para estudos taxonômicos

(PEROLAT et al., 1994; YASUDA et al, 1987). Os sorovares podem ser identificados através da metodologia de digestão do DNA cromossomal, utilizando enzimas de restrição e análise subsequente através de eletroforese em gel de agarose (THIERMANN et al., 1985) ou através de eletroforese de campo pulsado (PFGE) (HERRMANN et al., 1992; PEROLAT et al., 1992). Estes testes baseados na determinação de similaridade genética entre as cepas possuem elevado poder discriminatório, porém não foram validados em estudos populacionais, exigem equipamentos sofisticados para sua aplicação, além de serem demorados e caros, razão pela qual torna-se necessário o desenvolvimento e validação de um teste simples capaz de diferenciar cepas de leptospiros em estudos epidemiológicos.

A amplificação de seqüências de DNA polimórfico é um método alternativo para caracterização genética de microorganismos, existindo diversas variações desta técnica. A caracterização de leptospiros através de ensaios de PCR pode ser feita mais rapidamente e com menor custo do que o PFGE. Foram desenvolvidos e aplicados vários métodos de tipagem que tem como base a reação de PCR como a amplificação que utiliza *primers* únicos randômicos (RAPD) ou AP- PCR (WEISH & McCLELLAND, 1990; PEROLAT et al., 1994) e PCR de baixa estringência (LS- PCR). Esses métodos baseiam-se na ligação dos *primers* ao DNA em baixas temperaturas permitindo a ligação inespecíficas dos mesmos ao DNA alvo, resultando em uma grande variabilidade dos padrões *fingerprinting*. A utilização de baixas temperaturas aumenta o poder discriminatório entre as cepas, por outro lado também aumenta a variabilidade desses padrões entre os experimentos, determinando uma baixa reprodutibilidade do teste. Outro método é do PCR após digestão do DNA genômico com endonucleases de restrição e análise do polimorfismo através de eletroforese. Esse método tem sido

utilizado para diferentes microorganismos como *Staphylococcus aureus* (GOH et al., 1992), micobactérias (TELENTI et al., 1993) e para leptospiros (BROWN & LEVETT, 1997). Esses métodos apesar de simples e rápidos não são reprodutíveis e não são capazes de diferenciar os sorovares de leptospiros.

Recentemente foram desenvolvidos ensaios de PCR baseados na amplificação de fragmentos de DNA genômico, localizados entre seqüências repetidas e altamente conservadas de DNA denominadas seqüências de inserção. ZUERNER et al., 1995 identificaram e caracterizaram seqüências IS1533 em *L. borgpetersenii*, verificando que as mesmas estavam presentes em múltiplas cópias no genoma de *Leptospira*. Posteriormente, um ensaio de PCR baseado nessas seqüências foi adaptado para identificar cepas de *L. interrogans (sensu lato)*. Outro elemento repetitivo foi identificado por BOURSAUX-EUDE et al., 1995 e foi denominado de IS1500. Esses elementos também foram utilizados como base para o desenvolvimento de ensaios de PCR para analisar cepas de *Leptospira* (ZUERNER & BOLIN, 1997). Essas técnicas utilizam *primers* complementares e inversos para seqüências repetidas de DNA. A amplificação ocorre nas regiões do genoma entre essas seqüências, determinando diferentes padrões dos produtos amplificados. A vantagem deste método sobre os demais testes baseados no PCR refere-se a reprodutibilidade devido ao uso de temperaturas de hibridização mais elevadas que melhoram a especificidade dos *primers* para o DNA alvo. A principal limitação é que para realização do mesmo são utilizados DNA purificado de leptospiros, exigindo para tanto o uso de grande quantidade de amostras para o ensaio, assim como a necessidade de várias etapas para o processamento das mesmas, o que representa um aumento do tempo e do custo desse método.

Conforme relatado na literatura, a técnica de PCR tem sido utilizada para diagnóstico de leptospirose e para fins de tipagem molecular, funcionando assim, como um sistema alternativo para caracterização de cepas de *Leptospira*. Esta caracterização é importante para a identificação de fontes de infecção de leptospirosas e definição de ação de saúde necessária para o controle da leptospirose. Nesse estudo, o PCR foi utilizado para caracterização de cepas de leptospirosas isoladas de estudos epidemiológicos. Foi desenvolvido um sistema simples para extração de DNA objetivando a redução do tempo de realização do método assim como o seu custo.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 GERAL

O objetivo geral do estudo foi desenvolver e aplicar o método baseado na reação da polimerase em cadeia no diagnóstico de leptospirose em pacientes com suspeita de leptospirose em Salvador no Estado da Bahia e tipagem molecular de cepas de *Leptospira* visando a sua utilização nas investigações epidemiológicas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1. Confirmar o diagnóstico dos casos com suspeita clínica de leptospirose admitidos no Hospital Couto Maia pelos testes padrões como microaglutinação e cultura.
2. Avaliar o PCR como teste diagnóstico da leptospirose determinando a sensibilidade e especificidade desse teste em populações definidas de pacientes e controles.
3. Desenvolver e aplicar metodologia baseada no PCR para amplificação de regiões intergênicas entre elementos repetitivos presentes no DNA de leptospiros para tipagem molecular de cepas isoladas nesse estudo.



### 3 JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIA

A leptospirose é uma zoonose bacteriana transmitida ao homem através do contato com a urina de animais infectados. É uma doença de forte impacto social responsável por uma alta taxa de mortalidade que varia entre 5 a 40% (FAINE, 1982). No Brasil grandes epidemias urbanas têm sido descritas no Rio de Janeiro (RIOS GONÇALVES et al., 1990), Recife (AZEVEDO & CORREIA, 1968) e em Salvador (CALDAS et al., 1977; CALDAS, et al., 1979). Elas geralmente ocorrem em épocas de alta precipitação pluviométrica. Em Salvador, durante epidemia de leptospirose em 1996, foram identificados casos com a forma ictérica grave e uma taxa de letalidade acima de 15% em pacientes hospitalizados (KO et al., 1999).

O desenvolvimento de manifestações graves durante o curso da doença pode ser prevenida através da administração de antibióticos nos primeiros dois a três dias da doença (McCLAIN et al., 1984). A leptospirose tem um amplo espectro de manifestações clínicas e os sintomas iniciais da infecção não são específicos podendo ser confundida com outras doenças febris (FAINE, 1982; FARR, 1995). Em Salvador, durante a epidemia de 1996, acima de 40% dos pacientes receberam o diagnóstico de dengue vários dias antes de sua hospitalização por leptospirose (KO et al., 1999). Na fase tardia, com o aparecimento da icterícia, insuficiência renal e/ou envolvimento pulmonar, é clinicamente mais característica de leptospirose, embora a síndrome pulmonar tivesse sido interpretada como dengue hemorrágica em epidemia na Nicarágua (ZAKI, 1995).

O diagnóstico laboratorial é necessário para a confirmação da leptospirose embora a identificação da doença na primeira fase seja difícil. Os testes padrões para diagnóstico, que são cultura e microaglutinação não ajudam a detecção precoce da leptospirose. A sorologia pelo teste de microaglutinação é um método laborioso e necessita de soros pareados, da fase aguda e convalescente, para mostrar a evolução dos títulos de anticorpos. A cultura requer tempos de incubação de até seis semanas além de apresentar uma sensibilidade baixa, em torno de 50%. Estes testes são realizados apenas em laboratórios de referência, e no Brasil faltam serviços de vigilância epidemiológica e laboratórios com infra-estrutura para realização dos testes de confirmação da leptospirose.

Os dados anteriores apontam para necessidade de desenvolvimento de técnicas que detectem precocemente a infecção e que sejam de fácil realização e baixo custo. Recentemente, têm-se usado o ensaio da polimerase em cadeia (PCR) na detecção de DNA de leptospiros (MÉRIEN et al., 1992), porém estes testes precisam ser validados em estudos populacionais, em diferentes situações epidemiológicas. Comparado com outros métodos diagnósticos, o PCR oferece vantagens na rapidez e na detecção de pequeno número de organismos. O desafio é fazer do PCR um método que possa ser aplicado e acessível em postos de saúde, clínicas particulares para que o paciente seja tratado em tempo adequado.

A tipagem de cepas de leptospiros é importante para a vigilância epidemiológica e saúde pública. A tipagem pode ser utilizada na identificação de fontes de infecção porque sorovares de leptospiros são associados com reservatórios animais. Outra aplicação da tipagem é para identificar pacientes infectados com a mesma cepa e portanto locais comuns de transmissão. Os métodos de sorotipagem de isolados de

leptospiras necessitam de reagentes que não são disponíveis na maioria dos centros de referência. A sorotipagem é um processo laborioso que envolve o uso de reações de aglutinação cruzada e de absorção apenas são realizados em laboratórios de referência. O PCR tem sido desenvolvido como sistema alternativo para tipagem molecular de leptospiras em estudos populacionais com vantagens sobre as técnicas sorológicas convencionais. O método descrito neste trabalho utilizou-se da estratégia de amplificação das regiões do genoma entre seqüências de inserção repetidas (elementos IS) tornando possível identificar polimorfismos pelos produtos amplificados e correlaciona-los com sorovares de referência de leptospiras. Esta estratégia baseada em elementos IS foi utilizada para tipar vários agentes responsáveis por doenças infecciosas, como *Mycobacterium tuberculosis*, (PLIKATIS et al., 1993) através dos elementos IS 891 que também detectou uma grande variedade de isolados deste microorganismos.

Os objetivos neste estudo foram de validar o ensaio da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico da leptospirose na fase inicial e o uso de técnicas moleculares para caracterizar as cepas isoladas neste estudo. Para alcançar os objetivos propostos foi realizado um estudo de corte transversal de pacientes com suspeita clínica de leptospirose do Hospital Couto Maia que representa 95% dos casos notificados de Salvador -Ba.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO**

#### **4.1.1 Local do estudo**

A identificação, seleção e coleta dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram realizadas no Hospital Couto Maia que é o Hospital Estadual de referência para doenças infecciosas. É um hospital que possui 120 leitos e que recebe pacientes com suspeita clínica de leptospirose encaminhados de outros hospitais públicos e postos de saúde de Salvador além de regiões vizinhas. Mais de 90% dos casos notificados na Secretaria de Saúde do Estado da Bahia são provenientes do HCMaia (SESAB, 1996). A realização dos testes padrão para confirmação diagnóstica, assim como o desenvolvimento de novas metodologias para caracterização da leptospirose foram realizadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM- FIOCRUZ).

#### **4.1.2 População estudada**

- **4.1.2.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos no estudo pacientes admitidos no Hospital Couto Maia com diagnóstico clínico de leptospirose na admissão, caracterizados de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (BRASIL , 1995) por febre, mialgia, icterícia, alterações

do volume urinário, hemorragia e evidências laboratoriais de insuficiência renal e hepática. O período do estudo foi de 5 de maio a 25 de novembro de 1997, que compreenderam os meses de alta precipitação pluviométrica.

- 4.1.2.2 Seleção dos pacientes e coleta de dados clínicos e epidemiológicos

Os pacientes admitidos no Hospital Couto Mala foram identificados nos arquivos do Setor de Registros e do Pronto Atendimento por uma equipe de pesquisa. Após a identificação, os termos de consentimento foram obtidos dos pacientes que preencheram os critérios de inclusão. Informações sobre os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos pela entrevista do paciente ou familiares, com aplicação de um questionário que abordava dados demográficos, antecedentes médicos, apresentação clínica e duração de sintomas. Informações sobre dados laboratoriais, complicações durante a hospitalização, tratamento e alta foram obtidos pela revisão dos prontuários.

- 4.1.2.3 Coleta e processamento das amostras clínicas

Foram colhidas assepticamente amostras de 15 ml de urina e, por punção venosa, 12 ml de sangue dos quais de 1 a 2 gotas foram semeadas imediatamente em quatro tubos com 5 ml de meio Ellinghausen McCullough-Johnson- Harris ou E.M.J.H (ELLINGHAUSEN & McCULLOUGH, 1965). Desses, 5 ml foram transferidos para tubos com EDTA, para obtenção de plasma e o restante da amostra foi utilizada para

obtenção de soro. Esta coleta foi realizada nas primeiras 24-48 horas de admissão no pronto atendimento ou enfermaria.

As amostras clínicas assim como os meios de cultura inoculados foram transportados para o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, sendo o sangue centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e o soro estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as análises sorológicas. Amostras de plasma e urina foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e 1ml do sobrenadante foi retirado e processado imediatamente para extração de DNA, sendo o restante estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Foram obtidas amostras de soro da fase convalescente durante a visita ambulatorial ou durante a hospitalização, após um período de 15 dias da coleta do soro da fase aguda. Essas amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de serem testadas para confirmação sorológica da leptospirose.

## 4.2 TESTES DIAGNÓSTICOS PADRÃO PARA A LEPTOSPIROSE

### 4.2.1 Diagnóstico sorológico – Teste de microaglutinação

O teste de microaglutinação foi aplicado para a pesquisa de aglutininas anti-leptospiras nas amostras de soro, empregando uma bateria padrão de antígenos vivos (FAINE, 1982) composta por 26 sorovares representantes de 18 sorogrupos patogênicos e 2 não patogênicos (Tabela 1). As culturas foram mantidas em meio E.M.J.H líquido por repiques semanais e no momento do uso foram diluídas em salina tamponada (PBS pH 7,2) para uma concentração final de 1 a  $2 \times 10^8$  bactérias/mL. Os soros foram descongelados e após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos foram diluídos em salina tamponada (PBS) pH 7,2 a 1/50 para um volume final de 4 ml, em seguida foram filtrados em membrana de  $0,22\mu\text{m}$  de poro afim de eliminar detritos que pudessem interferir na leitura da aglutinação.

Uma etapa de triagem foi realizada, testando-se  $50\mu\text{l}$  da diluição de 1/50 do soro em PBS pH 7,2 com  $50\mu\text{l}$  de cada uma das 26 cepas de referência de *Leptospira* em placas plásticas de 96 poços. Após 2 horas de incubação a  $28^\circ\text{C}$  foi feita a leitura em microscópio de campo escuro, com condensador a seco. Os soros que na triagem mostraram uma redução no número de leptospiras não aglutinadas da ordem de 50 a 100% em relação ao controle, foram submetidos à prova de titulação.

Com os soros positivos na triagem foram realizadas nove diluições consecutivas (títulos de 1:100 a 1:25.600), sendo testados para a cepa aglutinada na triagem, em

microscópio de campo escuro, para identificar o maior título no qual 50% das leptospiplas encontraram-se aglutinadas.

Tabela 1- Lista de cepas de referência utilizadas neste estudo

<b>Espécie</b>	<b>Sorogupo</b>	<b>Sorovar</b>	<b>Cepa</b>
L. interrogans	Australis	<i>australis</i>	Ballico
	Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
	Bataviae	<i>bataviae</i>	Van Tienen
	Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht
	Djasiman	<i>djasiman</i>	Djasiman
	Djasiman	<i>sentot</i>	Sentot
	Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	<i>copenhageni</i>	M 20
	Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	3294
	Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
	Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
	Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
	Ranarum	<i>cuica</i>	RP 88
	Serjoe	<i>wolffi</i>	3705
Sejroe	<i>saxkoebing</i>	MUS 24	
L. borgpetersenii	Ballum	<i>castellonis</i>	Castellón 3
	Javanica	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46
	Sejroe	<i>sejroe</i>	M 84
	Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelitsin
L. weilii	Celledoni	<i>Celledoni</i>	Celledoni
L. noguchii	Panama	<i>Panama</i>	CZ 214 K
L. Santarosai	Shermani	<i>Shermani</i>	LT 821
L. kirschneri	Cynopteri	<i>Cynopteri</i>	3522 C
	Grippotyphosa	<i>Grippotyphosa</i>	Moskva V
L. biflexa	Andamana	<i>Andamana</i>	CH - 11
	Semarang	<i>Patoc</i>	Patoc 1



#### 4.2.2 Diagnóstico microbiológico – hemocultura de leptospiras

O diagnóstico microbiológico foi realizado no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), CPqGM- FIOCRUZ de acordo com metodologia padronizada (FAINE, 1982). Amostras representadas por 1 a 2 gotas de sangue foram semeadas, imediatamente após a coleta, em 4 tubos contendo 5 ml de meio de Cultura E.M.J.H (FAINE, 1982) e incubados entre 28 e 29,5°C ao abrigo da luz. As culturas foram examinadas semanalmente com exames de microscópio de campo escuro, com condensador de imersão, e o resultado foi dado como positivo quando detectada a presença de bactéria espiralada com morfologia característica de leptospira. Um resultado negativo foi definido quando uma cultura não apresentava crescimento característico após seis semanas de incubação. As cepas isoladas foram mantidas em meio E.M.J.H semi-sólido (0,5% de ágar) entre 28 e 29,5°C através de repiques trimestrais. As amostras também foram estocadas a -70°C em meio EMJH contendo 50% de glicerol.

Nesse estudo, não foram realizadas culturas de urina devido a baixa sensibilidade dessa amostra em relação a de sangue e por causa da facilidade de contaminação da mesma, dados que foram verificados em estudo anterior no ano de 1996.

### 4.2.3 Definição de caso

Para a definição de caso de leptospirose foram utilizados os testes padrões de diagnóstico que são cultura e microaglutinação. Foi considerado como caso confirmado para leptospirose quando o paciente apresentou hemocultura positiva e/ou teste de microaglutinação positivo, definido pela soroconversão entre soros pareados, com aumento de quatro vezes entre os títulos de soros da fase aguda e da fase convalescente ou título único superior a 1:800. Os pacientes dos quais foram analisados apenas o soro de uma das fases, aguda ou convalescente e que tiveram título único maior ou igual a 1:200 pela microaglutinação foram considerados como caso provável. Um caso foi considerado como não confirmado para leptospirose quando foi analisado soro pareado do paciente e o mesmo não preencheu os critérios de caso confirmado ou provável.

## **4.3 ENSAIO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)**

### 4.3.1 Definição do limite de detecção de leptospiros em urina e plasma

O método de centrifugação para extração de DNA seguiu o protocolo de MÉRIEN et al., (1992), que é baseado na centrifugação de leptospiros e liberação de DNA pela fervura. Para a padronização do método foram realizados experimentos para avaliar a capacidade do PCR para detectar DNA de leptospiros em amostras clínicas.

Foram adicionadas leptospiras ao plasma e urina de voluntários sadios, em concentrações que variaram de  $10^2$  a  $10^5$  leptospiras/ml para determinar o limite de detecção do método. Para este teste foram utilizadas culturas de leptospiras do sorovar *copenhageni* da cepa M20 com cinco dias de crescimento que foram examinadas, antes do uso, em microscópio de campo escuro para verificação de viabilidade e nível de contaminação. As culturas foram contadas em câmara de Petroff Hausser e em seguida foram diluídas serialmente, na razão de 1:10, em salina tamponada (PBS) pH 7,2 para obtenção de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^6$  leptospiras/ml em um volume final de 1 ml. Foram retirados 100  $\mu$ l das diluições de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^5$  leptospiras/ml e foram adicionados a 900  $\mu$ l de plasma e urina previamente centrifugadas a 900 rpm por 10 minutos. Essas amostras foram centrifugadas a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sedimento foi lavado uma vez com 1 ml de PBS pH 7,2 e resuspendido em 50  $\mu$ l de água 18 M $\Omega$  autoclavada e em seguida foi aquecido a 100°C por 10 minutos para liberação do DNA. Os extratos foram centrifugados a 13,000 rpm por 10 minutos e 10  $\mu$ l do sobrenadante foi utilizado imediatamente para a reação de PCR. A avaliação da positividade foi feita através da eletroforese em gel de agarose a 1,5% pela detecção visual de bandas com mobilidade predita de 331 pares de bases.

#### 4.3.2 Primers

Foram utilizados neste estudo *primers* genéricos que amplificam região correspondente aos nucleotídeos das posições 38 à 57 e posições 348 à 368 do gene rRNA 16S de *L. interrogans*. Estes *primers* amplificam o rRNA 16S de todas sete

espécies patogênicas, cujo produto amplificado apresenta 331 pares de bases (MÉRIEN et al., 1995 ). As seqüências de DNA são descritas a seguir:

<i>Primers</i>	Seqüência	Posição
A	5'- GGCGGCGCGTCTTAAACATG- 3'	nucleotídeos 38 ao 57
B	5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT- 3'	nucleotídeos 348 ao 368

#### 4.3.3 Amostras clínicas e controles testados

Para determinação da sensibilidade do PCR para leptospirose foram utilizadas amostras de um grupo composto por pacientes com suspeita clínica de leptospirose durante o período do estudo. Nesse grupo foram identificados casos confirmados ou prováveis pelos métodos padrão de diagnóstico como cultura e microaglutinação, e os resultados foram comparados com os do PCR. Para a determinação da especificidade do método, foi utilizado um grupo de controles negativos composto por pacientes hospitalizados com suspeita clínica para leptospirose, porém tiveram evidências laboratoriais para outras doenças durante a hospitalização, e um grupo de voluntários sadios, ambos no mesmo período do estudo os quais tiveram suas amostras testadas pelos testes padrão de diagnóstico, a microaglutinação e cultura.

Foram utilizados como controles positivos internos nas reações amostras de leptospiros do sorovar *copenhageni* cepa M20. Essas culturas, após contagem em câmara de Petroff Hausser, foram diluídas serialmente na razão de 1:10 em salina

tamponada (PBS) pH 7,2 para obtenção de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^7$  leptospiras/ml em um volume final de 1 ml. Dessas amostras foram extraídos DNA pelo método de centrifugação e fervura. Amostras com apenas água e sem DNA genômico foram utilizadas como controles negativos das reações.

#### 4.3.4 Extração de DNA

Amostras de plasma e urina recém coletadas dos pacientes selecionados para o estudo, foram centrifugadas a 900 rpm por cinco minutos e 1 ml do sobrenadante foi utilizado para a extração do DNA. Essas amostras foram centrifugadas a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado uma vez com 1 ml de PBS pH 7,2 e resuspenso em 50 µl de água 18 MΩ autoclavada e em seguida aquecido a 100°C por 10 minutos. Após centrifugação por 5 minutos a 13,000 rpm, o sobrenadante foi conservado a -70°C. As amostras foram descongeladas no momento do uso e um volume de 10 µl de cada extrato foi utilizado para cada reação de PCR.

#### 4.3.5 Protocolo de amplificação

A mistura de reação foi preparada em tubos Eppendorfs de 1,5 ml, contendo para cada reação: 5 µl de tampão 10 X (50 mM de KCl pH 8,8, 10 mM de Tris- HCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>) (Perkin Elmer, U.S.A), 1 µM de cada *primer* (Operon, U.S.A) , 200 µM de cada deoxiribonucleosídeo trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP ) (Boehringer

Mannheim, U.S.A), 2U de Taq DNA polimerase (Perkin Elmer, U.S.A) e água 18 MΩ autoclavada para completar o volume para 40 μL.

Foram utilizados 40 μL da mistura de reação para amplificação de 10 μL dos extratos de DNA de amostras clínicas. As temperaturas nas quais as amostras foram processadas segue o seguinte programa: 94°C por 5 minutos de desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto de desnaturação, 63 °C por 1,5 minutos para hibridização dos *primers*, 72°C por 2 minutos de extensão. Para finalizar foi acrescentado um ciclo de 72°C por 10 minutos para extensão final (MÉRIEN et al., 1995).

#### 4.3.6 Eletroforese

Foram utilizados 10 μL do produto amplificado imediatamente após o PCR, para a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (10 μg/ml), utilizando como tampão de corrida o TAE 1X (0,01M de EDTA pH 8,0, 0,04M de Tris-acetat0,0) e uma corrente constante de 100 volts por 40 minutos. Para cada gel foram utilizados marcadores de pares de bases (Boehringer Mannheim, U.S.A). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultra violeta. Resultados positivos foram determinados pela identificação visual dos produtos com mobilidade predita de 331 pares de bases.

## 4.4 TIPAGEM BACTERIANA

### 4.4.1 Sorogrupagem e sorotipagem

As amostras de leptospiros isoladas no estudo foram identificadas a nível de sorogrupos no Centro de Referência Nacional para Leptospirose IOC- FIOCRUZ, no Laboratório de Zoonoses Bacterianas. O teste consistiu de reações de microaglutinação da amostra frente a uma bateria de anti-soros heterólogos, produzidos em coelhos, contra representantes de 18 sorogrupos de leptospiros patogênicos e o anti-soro contra a cepa a ser identificada (FAINE, 1992). O sorogrupo a qual a amostra pertence é aquele cujo soro mostra o maior título, conhecendo-se o título homólogo do respectivo soro.

As amostras foram caracterizadas a nível de sorovar, através de reações de microaglutinação da amostra contra um painel de anticorpos monoclonais específicos para sorovares pertencentes ao sorogrupo encontrados na etapa de sorogrupagem (KORVER et al., 1988). As amostras pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae foram testados com os anticorpos monoclonais F70C14, F70C24 e F89C12 (WHO/FAO collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Amsterdam, Netherlands). Uma parte desta análise foi realizada no Centro de Referência Nacional para Leptospirose, IOC- FIOCRUZ.

## 4.5 TIPAGEM MOLECULAR- REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA

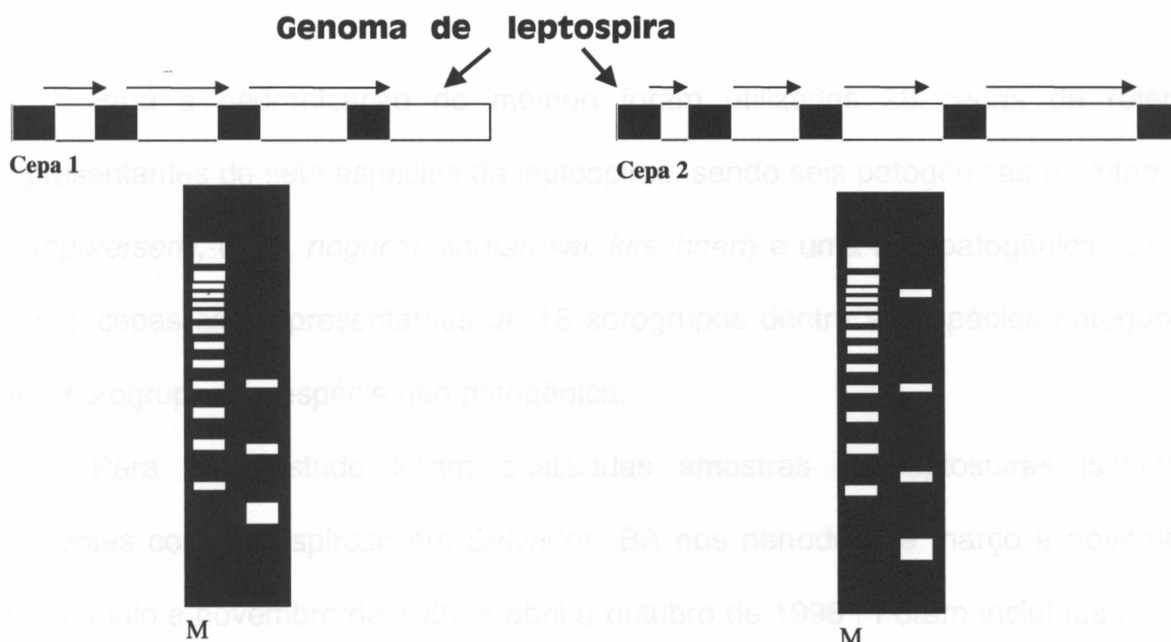
### 4.5.1 Primers

As seqüências de inserção são elementos genéticos móveis encontrados em diversos microrganismos e nas leptospiras o número de cópias destas seqüências repetidas de DNA é variável entre os sorovares de *Leptospira* (ZUERNER & BOLIN, 1990) e entre isolados de um mesmo sorovar (ZUERNER et al., 1993). Os *primers* que foram utilizados amplificam entre regiões intergênicas distintas, entre as seqüências de inserção IS1533 e IS1500 (ZUERNER et al., 1995). Conforme esquematizado abaixo, a amplificação ocorre nas regiões do genoma entre estas seqüências, determinando diferentes padrões de produtos amplificados comparados com marcadores de pares de bases, visualizados em gel de eletroforese.



## Estratégia de amplificação entre regiões Intergênicas de *Leptospiras*

### 4.5.2 Cepas



Os primers utilizados possuem as seguintes características:

Primers	Seqüência	IS
EPR-2	5' - CTCGCATCTAACCCACGTTT-3'	IS 1500
EPL-2	5'- AGATTACTGCTCCGGATGG - 3'	IS 1500
iPI	5'- CGTTAGCCATGCTTTGAATCGAA - 3	IS 1533
iMI6	5'- CGCAGTCGCTGAGTCCTCCTTCTTT - 3'	IS 1533

Foram analisadas amostras de *Leptospira* do sorotipo *hardjo* (*L. interrogans sensu lato*) e *Leptospira* *hardjo* (*L. interrogans sensu lato*) isoladas de cães e gatos de várias cidades brasileiras (Rio de Janeiro

#### 4.5.2 Cepas

Para a padronização do método foram utilizadas 26 cepas de referência, representantes de sete espécies de leptospiras, sendo seis patogênicas (*L. interrogans*, *borgpetersenii*, *weillii*, *noguchi*, *santarosai*, *kirschneri*) e uma não patogênica (*L. biflexa*). Essas cepas são representantes de 18 sorogrupos dentre as espécies patogênicas e dois sorogrupos da espécie não patogênica.

Para este estudo foram analisadas amostras de leptospiras isoladas de pacientes com leptospirose em Salvador- BA nos períodos de março a novembro de 1996, maio a novembro de 1997 e abril a outubro de 1998 . Foram incluídos no estudo amostras de leptospiras isoladas de *R. norvegicus*, para comparação dos genótipos de fontes animais, referentes ao estudo de reservatórios em Salvador- Bahia realizado no período de maio de 1998 e março de 1999, que faz parte da dissertação de mestrado desenvolvida no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, do curso de Patologia experimental, pelo veterinário Marcos Farias Tucunduva. A captura de animais foi realizada em 10 bairros diferentes de Salvador, oito deles onde ocorreram casos de leptospirose naquele ano e dois bairros onde não ocorreram casos nos últimos três anos. Foram capturados 142 *Rattus norvegicus* dos quais foram isolados leptospiras de 114 deles. As amostras isoladas foram mantidas em meio de cultura EMJH entre 28-29,5°C no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do CPqGM.

Foram analisadas amostras de *Leptospira* do sorovar *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* isoladas de casos humanos de outras cidades brasileiras (Rio de Janeiro

e São Paulo) para comparação dos genótipos com outras fontes epidemiológicas. Foram incluídas, em todas as reações, amostras de referência do sorovar *copenhageni* como controle das reações.

#### 4.5.3 Extração de DNA

O método de extração do DNA genômico foi padronizado através da fervura de leptospiras em culturas, não necessitando de purificação de DNA por métodos laboriosos descritos na literatura (BOOM et al.,1990). Após três dias de crescimento, as culturas foram contadas em câmara de contagem bacteriana, Petroff Hausser. Em seguida, 3 ml da cultura foi centrifugada a 14,000 rpm por 15 minutos, o sedimento foi lavado uma vez com um ml de PBS pH 7,2 através de uma centrifugação de 14,000 rpm por 15 minutos, e em seguida foi resuspenso em água 18 MΩ autoclavada, em quantidade suficiente para obtenção de  $1 \times 10^9$  leptospiras/ml. Após esta etapa, a suspensão de bactérias foi submetida a um banho fervente por 15 minutos e uma centrifugação por 10 minutos a 14,000 rpm. Foi retirado 15 µl do sobrenadante para ser utilizado como amostra para a tipagem e o restante foi estocado a -70°C em alíquotas de 200 µl para evitar ciclos repetidos de descongelamentos que afetam a qualidade das amostras.

#### 4.5.4 Protocolo de amplificação

A mistura da reação foi preparada em tubos Eppendorfs de 1,5 ml contendo para cada reação 5  $\mu$ l de tampão 10X (de 50 mM de KCl pH 8,8, 10 mM de Tris- HCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>) (Gibco, U.S.A), 1  $\mu$ M de cada *primer* (Operon, U.S.A) , 200  $\mu$ M de cada deoxiribonucleosídeo trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP ) (Gibco, U.S.A), 2U de Taq DNA polimerase (Gibco, U.S.A) e água 18 M $\Omega$  para completar o volume para 35  $\mu$ l. Foram utilizados 35  $\mu$ l da mistura de reação para amplificação de 15  $\mu$ l da amostra de DNA. As temperaturas nas quais as amostras foram processadas seguiram o seguinte programa: pré desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* a 50 °C por 1 minuto e 30 segundos, extensão a 72°C por 7 minutos e finalização da reação com uma extensão a 72°C durante 10 minutos.

#### 4.5.5 Eletroforese e análise dos produtos amplificados

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (10 $\mu$ g/ml). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultra violeta. Os produtos amplificados foram analisados visualmente para comparação dos padrões de bandas para definição dos genótipos. As bandas foram definidas como presentes ou ausentes visualmente e a distância de migração das mesmas foram comparadas ao marcador de pares de bases (Gibco, U.S.A), sendo consideradas como padrões idênticos, amostras que possuíram o mesmo número e posição de bandas. Para

definição dos padrões das amostras dos isolados de casos humanos e de ratos, os mesmos foram comparados com os padrões de cepas de referência.

A determinação do poder de discriminação do método, ou seja, a capacidade de distinguir padrões de leptospiros pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, foi calculada dividindo-se o número de padrões de bandas encontrado por grupo de amostras pelo número total de amostras testadas no grupo, o resultado foi revelado em percentual multiplicando o total obtido por 100.

## 5 RESULTADOS

---

### 5.1 CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS CASOS DE LEPTOSPIROSE

#### 5.1.1 Identificação dos pacientes e coleta de amostras

No período de 5 de maio a 28 de novembro de 1997 foram identificados 210 pacientes com diagnóstico clínico de leptospirose na admissão, e que estavam de acordo com os critérios de inclusão no estudo. Desses foram obtidas amostras clínicas de 163 pacientes (77,6%) sendo que de 90 (55,2%) foram obtidas amostras de soro pareados da fase aguda e convalescente, de 66 (40,5%) foram colhidas amostras de soros não pareados de fase aguda e seis (3,7%) somente amostras da fase convalescente. De um paciente (0,6%) foi feito apenas hemocultura, sem coleta de outras amostras clínicas.

#### 5.1.2 Confirmação laboratorial pela Microaglutinação

Foram testadas pela MAT amostras de soro de 162 pacientes incluídos no estudo (Tabela 1). Foram confirmados por este teste 51,2% (83/162) dos casos identificados. Foram definidos como casos prováveis 12,3% (20/162) e como casos não confirmados 36,4% (59/162) dos pacientes. O baixo percentual de confirmação pela MAT deve-se ao fato de que foram colhidas amostras de soro pareados de apenas

55,2% (90/163) dos pacientes, o que prejudicou a avaliação de definição de caso pela microaglutinação, que necessita de amostras pareadas de fase aguda e convalescente para demonstrar a soroconversão dos títulos entre essas amostras.

Dos pacientes que tiveram soros pareados, 85,6% (77/90) foram casos confirmados ou prováveis para leptospirose pela microaglutinação indicando um elevado valor preditivo positivo para suspeita clínica. A percentagem de pacientes confirmados com apenas uma amostra de soro colhido na fase aguda da doença foi de 9,1% (6/66). A percentagem foi mais elevada nos pacientes cuja coleta única de soro foi realizada na fase convalescente, que foi de 33,3% (2/6) .

**Tabela 1: Confirmação diagnóstica de casos com suspeita clínica de Leptospirose pela Microaglutinação durante a epidemia de 1997**

<b>RESULTADO MAT</b>	<b>SORO PAREADO N=90 %</b>	<b>SORO AGUDO N=66 %</b>	<b>SORO CONVALESCENTE N=6 %</b>	<b>TOTAL N=162 %</b>
Confirmado	75 (83,4)	6 (9,1)	2 (33,3)	83 (51,3)
Provável	2 (2,2)	14 (21,2)	4 (66,7)	20 (12,3)
Não confirmado	13 (14,4)	46 (69,7)	-	59 (36,4)

A maior percentagem de soros apresentou títulos máximos na MAT com as cepas do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, representando 89,3% (92/103) dos casos confirmados e prováveis (Tabela 2). Foram classificados como sorogrupo "misto" aqueles cujos soros tiveram títulos idênticos para mais de um sorogrupo testado, fato este que ocorre devido às reações cruzadas entre os anticorpos dos pacientes e sorogrupos que podem possuir determinantes antigênicos semelhantes.

Dos soros testados, 9,7% (10/103) foram classificados como "mistos", ou seja, apresentaram títulos idênticos para mais de um sorogrupo. Desses 99% dos tiveram reações com máximo título, exclusivos ou divididos, nas aglutinações com as cepas do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*.

**Tabela 2: Sorogrupos Predominantes Identificados pelo Teste de Microaglutinação de casos confirmados e prováveis, durante a Epidemia de 1997**

Sorogrupos	MAT Confirmado		MAT Provável		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Icterohaem.	75	90,4	17	85,0	92	89,3
Misto	7	8,4	3	15,0	10	9,7
Patoc	1	1,2	-	-	1	1,0
Total	83	100,0	20	100,0	103	100,0

### 5.1.3 Confirmação laboratorial por cultura

Durante o período de estudo foram realizadas culturas em 31,4% (66/210) dos pacientes identificados (Tabela 3). O isolamento de leptospira foi feito em 45,5% (30/66) dos pacientes testados. Foram identificadas através da hemocultura 56,7% (17/35) dos casos confirmados para leptospirose pelo teste de microaglutinação. Entre os pacientes que foram definidos como casos não confirmados pela sorologia, a positividade da hemocultura foi de 43,0% (13/26),



**Tabela 3: Resultado da Hemocultura e da Microaglutinação nos Pacientes com Suspeita Clínica de Leptospirose, durante a epidemia de 1997**

Resultado da MAT	Cultura Positiva		Cultura Negativa		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Confirmado	17	(56,7)	18	(39,1)	35	(46,1)
Provável	-		5	(10,9)	5	( 6,6)
Não confirmado	13	(43,3)	23	(50,0)	26	(47,4)
Total	30	(100)	36	(100)	66	(100)

## 5.2 AVALIAÇÃO DO PCR PARA DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE

### 5.2.1 Estabelecimento do limite de detecção do PCR

Para a padronização do PCR para diagnóstico foram feitos testes para estabelecimento do poder de detecção do mesmo, utilizando *primers* (A/B) (MÉRIEN et al., 1995), que reconhecem o gene de 16s RNA, acrescentando-se leptospiras em quantidades de 1, 10, 100, 1000, 10.000 leptospiras/ml em amostras de plasma e urina de voluntários sadios. O experimento foi repetido por mais de três vezes, sendo possível visualizar em todos eles, bandas específicas com mobilidade relativa esperada de 331 pb referente a 1 leptospiras/ml (Figura 1). Nos controles negativos, sem leptospiras, não foi detectado amplificação do fragmento de 331 pares de bases em gel de eletroforese.

## Estabelecimento do Limite de Detecção do PCR em amostras de plasma e urina de voluntários saudáveis

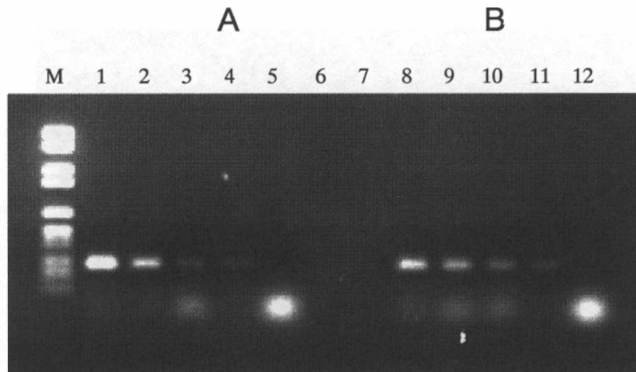


Fig 1. Amplificação de DNA de leptospiras de culturas puras diluídas serialmente em plasma (A) e urina (B) de voluntários saudáveis. Canaletas 1 a 4 e 8 a 11 representam produtos de 331 pb referentes a  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , leptospiras/ml respectivamente. As canaletas 5 e 12 representam controles negativos, sem leptospiras e M representa o marcador de pares de bases DNA VI (156-2176 pb).

### 5.2.2 Padronização do método

Para determinar a sensibilidade dos *primers* para *Leptospira* ssp, foram testadas amostras de 26 sorovares pertencentes a sete diferentes espécies do gênero *Leptospira*. Para este teste foram utilizadas culturas de leptospiras referentes a  $10^4$  leptospira/ml por reação. Em todas as amostras de cepas de referência foram visualizadas, em gel de eletroforese, uma banda de 331 pb, específica para os primers utilizados (dados não demonstrados). Foram analisadas, ainda, amostras de leptospira isoladas de casos humanos durante o ano de 1996 em Salvador. Nessas amostras

foram observadas a amplificação de fragmentos de 331 pares de bases (Figura 2). Não foram detectados produtos amplificados em amostras sem DNA.

### **Amplificação de DNA de leptospiras de cepas isoladas de casos humanos em Salvador-Ba no ano de 1996.**

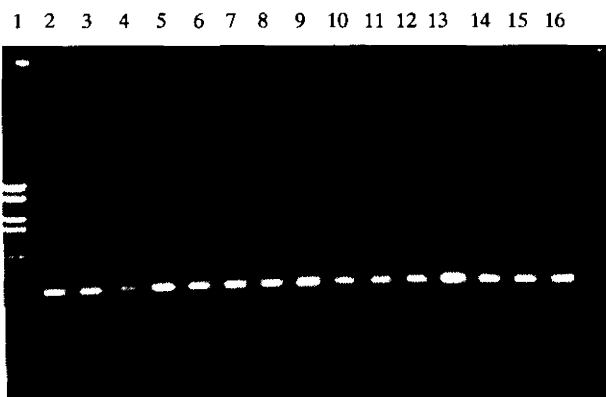


Fig 2. Amplificação de DNA de cepas de leptospiras isoladas de casos humanos em Salvador-Ba no ano de 1996. Canaleta 2, L1-125; 3, L1-130; 4, L1-133; 5, L1-164; 6, L1-192; 7, L1-195; 8, L1-199; 9, L1-204; 10, L1-212; 11, L1-224; 12, L1-237; 13, L1-239; 14, L1-251; 15, L1-256; 16, L1-265. A canaleta 1 refere-se ao marcador de pares de bases, DNA VI (156-2176 pb).

#### 5.2.3 Amplificação de amostras clínicas

Durante a epidemia de 1997 foram obtidas amostras de plasma e/ou urina de 129 (66,8%) dos 193 pacientes identificados no estudo, para realização do PCR, sendo 80 (62%) amostras pareadas de plasma e urina, 33 (25,3%) apenas amostras de urina e 16 (12,4%) apenas de plasma. Os resultados do PCR foram comparados com os ensaios padrão para confirmação diagnóstica, que são microaglutinação e cultura, o que tornou possível calcular a sensibilidade do método (Tabela 4). A positividade do

PCR entre os casos confirmados pela cultura e/ou microaglutinação para leptospirose foi de 44% (36/83), quando avaliadas apenas amostras de urina e 21% (16/78) em se tratando de plasma. Para os casos confirmados pela microaglutinação, dos pacientes que possuíam amostras pareadas de plasma e urina 57% (37/65) tiveram uma reação positiva no PCR, dados que representaram a sensibilidade do método.

O resultado do PCR foi comparado com o da hemocultura (Tabela 5). No grupo de pacientes com cultura negativa, o PCR apresentou uma positividade de 50% (10/20) em amostras de urina, e apenas 5% (1/21) em amostras de plasma. Em relação ao grupo de pacientes que tiveram resultado de hemocultura positiva, a positividade do PCR em amostras de urina foi de 63% (10/16) e de 57% (12/21) para amostras de plasma.

Para os pacientes que foram definidos como casos não confirmados para leptospirose pelos métodos padrão, por falta de soro convalescente ou que não foram realizados hemocultura, o PCR apresentou positividade de 39,2% (11/28) em urina e nenhum caso foi positivo para o PCR quando o paciente tinha apenas amostra de plasma.

Para o cálculo da especificidade do método foram testadas amostras de plasma e urina de 30 voluntários sadios e de 30 pacientes com diagnóstico de outras doenças na admissão hospitalar como hepatite viral, calazar, anemia falciforme. O resultado desta avaliação encontra-se na Tabela 5, não tendo sido observado nenhum caso de falso positivo perfazendo uma especificidade de 100%.

Em todas as reações foram utilizados controles positivos internos e para tanto utilizou-se culturas de leptospiras do sorovar *copenhageni* cepa M20. Foram excluídos extratos no qual o limite de detecção foi superior a 100 leptospiras/ml. Como controle

interno negativo das reações foram utilizadas amostras com água e sem leptospiras. As Figuras 3 e 4 mostram amplificação de DNA de leptospiras de amostras de plasma e urina de pacientes identificados no estudo no ano de 1997 e do grupo de voluntários sadios respectivamente. Nos casos positivos pelo PCR é visível a amplificação do fragmento de 331 pares de bases. No grupo de controles negativos não houve amplificação do fragmento com mobilidade predita.

**Tabela 4: Avaliação do PCR para leptospirose entre os controles positivos com os testes padrões de microaglutinação e cultura**

Grupos	Urina	Plasma	Urina ou plasma
	% positivo no PCR ( positivos/testados)		
<b>Controles positivos</b>			
Com suspeita clínica	43 (48/112)	17 (16/96)	56 (45/80)
<b>Casos confirmados</b>			
MAT/ cultura	44 (36/83)	21 (16/78)	57 (37/65)
Cultura positiva			
Sim	63 (10/16)	57 (12/21)	71(10/14)
Não	50 (10/20)	5 (1/21)	50(10/20)
Casos não confirmados	39 (11/28)	0 (17)	40 (4/10)
<b>Controles negativos</b>			
Voluntários sadios	0 (30)	0 (30)	0 (30)
Outras doenças	0 (18)	0 (17)	0 (15)

### Amplificação de DNA de leptospiras utilizando *primers* A e B de amostras de plasma e urina de pacientes com suspeita clínica de leptospirose em Salvador-Ba

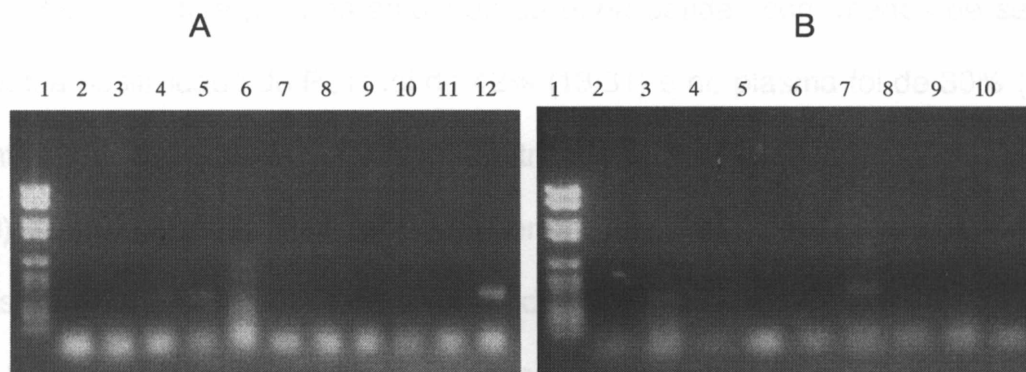


Fig 3- Detecção de DNA de leptospiras em amostras de plasma (A) e urina (B) de casos humanos em gel de agarose a 1,5%. Canaletas 1 representam o marcador de pares de bases DNA VI (156-2176 pb). Canaletas 2 a 12 representam amostras de pacientes identificados no estudo.

### Amplificação de DNA de leptospiras utilizando *primers* A e B de amostras de plasma e urina de pacientes controles negativos

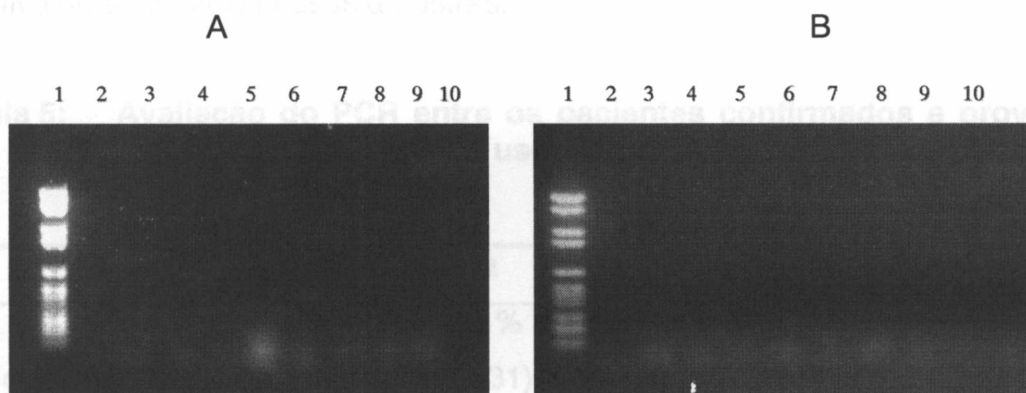


Fig. 4- Detecção de DNA de leptospiras em amostras de plasma (A) e urina (B) de controles negativos em gel de agarose a 1,5%. Canaletas 1 representam o marcador de pares de bases DNA VI (156-2176 pb). Canaletas 2 a 10 representam amostras de pacientes identificados no estudo.

Os resultados do PCR foram estratificados em relação ao número de dias com sintomas apresentados pelos pacientes antes da coleta das amostras (Tabela 5). Foi possível observar que para as amostras de urina obtidas com menos de sete dias de sintomas a positividade do PCR foi de 42% (13/31) e no plasma foi de 30% (7/23). Dos pacientes dos quais foram obtidas amostras com 7 dias ou mais de sintomas, 44% (35/79) das amostras de urina testadas foram positivas pelo PCR e para as amostras de plasma o percentual de positividade foi de 10% (7/70).

Para avaliar se o uso de antibióticos teve impacto na positividade do PCR, os pacientes foram estratificados pela coleta das amostras antes ou depois do tratamento. Os pacientes que não fizeram uso de antibióticos até o momento da coleta da amostra a positividade do PCR foi de 47% para urina e 24% para plasma. Quando as amostras foram coletadas após o uso de antibióticos o resultado do PCR para amostras de urina apresentou positividade de 45% e para amostras de plasma 8%, demonstrando o efeito negativo do antibiótico nessas amostras.

**Tabela 5: Avaliação do PCR entre os pacientes confirmados e prováveis para leptospirose, quanto ao uso de antibióticos e dias de sintomas antes da coleta das amostras.**

		Urina	Plasma	Urina ou plasma
		% positivo no PCR ( N <sup>o</sup> testado)		
Dias com sintomas	< 7 d	42 (13/31)	30 (7/23)	59 (10/17)
	> = 7d	44 (35/79)	10 (7/70)	53 (23/43)
Antibióticos	Não	47 (12/26)	24 (12/50)	52 (11/21)
	Sim	45 (25/57)	8 (2/27)	48 (12/25)

### 5.3 SOROTIPAGEM

Durante o estudo de leptospirose, nos períodos de março a novembro de 1996, maio a novembro de 1997 e abril a outubro de 1998 foram isoladas 79 amostras de leptospiras de casos humanos. Essas amostras foram sorotipadas contra uma bateria de soros heterólogos através de reações de aglutinação no Centro de Referência Nacional para Leptospirose- FIOCRUZ / R.J e desta forma 74 (94%) dessas amostras foram classificadas em sorogrupos.

Das amostras isoladas de casos humanos que foram sorotipadas 97,3% (72/74) pertenciam ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, 1,3% (1/74) foi do sorogrupo Canicola e 1,3% (1/74) não foi identificada contra a bateria de 18 soros heterólogos (Tabela 6). Essa amostra foi reagente com o anti-soro específico para o sorogrupo Hurstbridge (WHO Collaborating Center for Research and Diagnosis on Leptospirosis). Foram isolados 114 amostras de ratos do estudo de reservatórios. Dessas amostras 75 (65,8%) foram sorogrupadas e 100% das mesmas foram determinadas como sendo do sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

Das amostras isoladas de casos humanos, 69 (87%) foram sorotipadas através de anticorpos monoclonais para a determinação do sorovar as quais elas pertencem. A sorotipagem com anticorpos monoclonais identificou que 97% (67/69) amostras pertenciam ao sorovar *copenhageni*, 1,5% (1/69) foi do sorovar *canicola*. A amostra não identificada com anti-soros heterólogos foi analisada por testes de absorção cruzada e o resultado desta análise demonstrou que a mesma pertence ao sorovar *hurstbridge*.



Das amostras isoladas de ratos, 34 (29,8%) foram testadas e 100% perteceram ao sorovar *copenhageni*.

**Tabela 6: Sorotipagem das amostras de leptospira isoladas de casos humanos em Salvador-Ba durante os anos de 1996, 1997 e 1998.**

<u>Sorogrupo</u>	<u>Sorovares</u>	<u>Ano</u>				Total
		<u>1996</u>	<u>1997</u>	<u>1998</u>		
		N %	N %	N %	N %	
Icterohaemorrhagiae	<i>copenhageni</i>	13 (87)	29 (100)	30 (100)	72 (97,3)	
Canicola	<i>canicola</i>	1 (6,5)	-	-	1 (6,5)	
Hurstbridge	<i>hurstbridge</i>	1 (6,5)	-	-	1 (6,5)	
Total		15 (100)	29 (100)	30 (100)	74 (100)	

## 5.4 TIPAGEM MOLECULAR

### 5.4.1 Padronização do método de PCR

O método de PCR baseado na amplificação entre elementos repetitivos (IS) foi desenvolvido para ser aplicado a amostras isoladas de estudos epidemiológicos. Para avaliação da reprodutibilidade do método, foi realizada análise da amostra de leptospira do sorovar *copenhageni* cepa M20, que foi submetida ao teste em mais de 10 experimentos consecutivos, tendo demonstrado o mesmo número e posição de bandas

em gel de eletroforese. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos utilizando amostras de água sem adição de DNA, não sendo observados produtos de amplificação dessas amostras.

Para padronização do método foram utilizadas 26 cepas de referências representantes de 6 espécies patogênicas como *L. interrogans* (*australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *canicola*, *hebdomadis*, *pomona*, *pyrogenes*, *cuica*), *L. borgpetersenii* (*castellonis*, *javanica*, *tarassovi*), *L. weilii* (*celledoni*), *L. noguchi* (*panama*), *L. kirschneri* (*cynopteri*, *grippotyphosa*) e uma espécie não patogênica que foi a *L. biflexa* (*andamana*, *patoc*) (Tabela 8). Para a tipagem molecular dessas amostras dois diferentes sets de primers foram utilizados, para seqüências IS1500 (EPR2, EPL2) e IS1533 (iP1, iM16). A análise dos padrões de bandas foi realizada levando em consideração a mobilidade relativa e o número das mesmas, através da detecção visual de bandas em gel de eletroforese. Foram consideradas como amostras idênticas as que apresentaram o mesmo número e posição de bandas.

O poder de discriminação do método foi determinado através da análise comparativa com cepas de referência de leptospiros. Os resultados demonstraram que as 26 cepas testadas apresentaram 21 padrões distintos, representando um poder de discriminação de 80,7%. (Figura 5 e 6).

Para diferenciar os sorogrupos, foram testados 21 sorogupos diferentes e foi obtido 21 padrões distintos, essas cepas não compartilharam padrões com a de outros sorogrupos o que, para essa situação taxonômica, o método apresentou um poder de discriminação de 100% (Fig. 5 e 6).

Para distinguir sorovares dentro de sorogrupos, foram utilizadas amostras de *icterohaemorrhagiae* cepa RGA, *icterohaemorrhagiae* cepa 3294 e *copenhageni* do

sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* , essas amostras apresentaram o mesmo padrão. Para os sorovares *djasiman* e *sentot* pertencentes ao sorogupo Djasiman, demonstrando que o método não apresentou poder de diferenciar essas amostras, já que as mesmas possuíram padrões idênticos. As cepas *wolffi* e *saxkoebing* do sorogrupo Sejroe apresentaram padrões distintos, apresentando um poder discriminação de 100% para este sorogrupo. A Tabela 7 apresenta um sumário desses achados.

Foi incluído nesta análise a cepa isolada de um caso humano da epidemia de 1996, denominada L1 125, que representa um membro de um novo sorogrupo identificado como Hursbridge (CHAPPEL et al,1998). Amostras sem DNA, com apenas água foram utilizadas como controles negativo não sendo observado amplificação nas mesmas.

**Tipagem molecular pelo PCR de cepas padrão de leptospiros com os primers de IS 1533 e IS 1500**

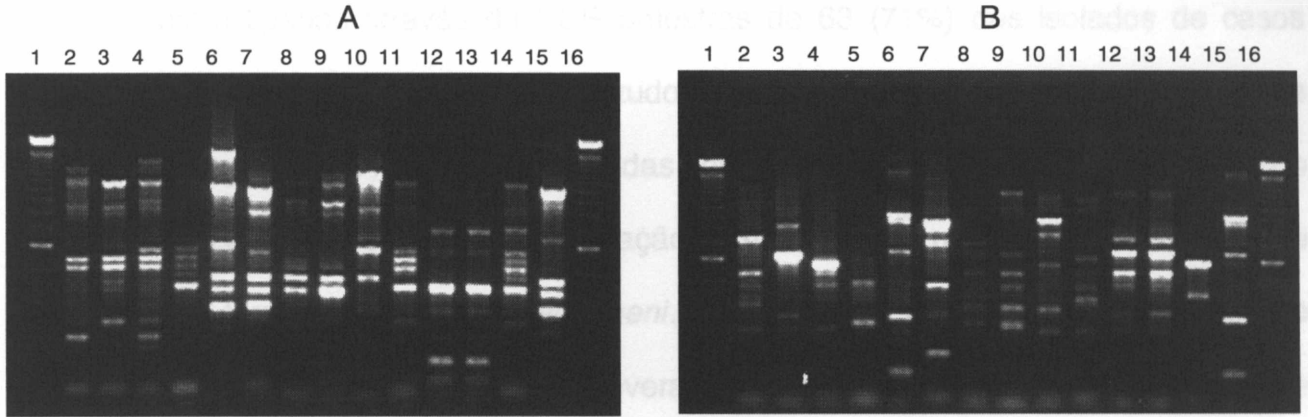


Fig. 5: Padrões do PCR de cepas de leptospiros pertencentes a diferentes espécies. Em A amplificação com primers de IS1533 e em B refere-se a amplificação com os primers para IS1500. Canaletas 1 e 16, marcador de pares de bases 250 pb ladder (250-5.000pb). Canaletas 2-15 representam os sorovares *australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *canicola*, *castellonis*, *celledoni*, *cynopteri*, *gripothyphosa*, *cuica*, *saxkoebing*, *djasiman*, *sentot*, *hebdomadis*, *javanica*.

**Tipagem molecular pelo PCR de cepas padrão de leptospiros com os primers de IS 1533 e IS1500**

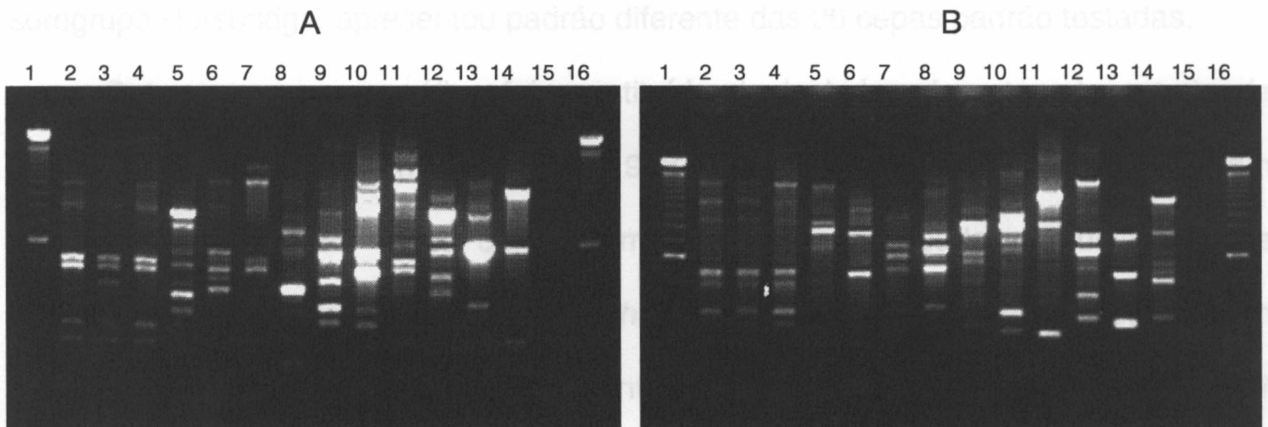


Fig. 6: Padrões do PCR de cepas de leptospiros pertencentes a diferentes espécies. Em A amplificação com primers de IS1533 e em B refere-se a amplificação com os primers para IS1500. Linha 1 e 16, marcador de pares de bases 250 pb ladder (250-5.000pb). Canaletas 2-14 representam os sorovares *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae* cepa 3294, *icterohaemorrhagiae* cepa RGA, *panama*, *pomona*, *pyrogenes*, *sejroe*, *shermani*, *tarassovi*, *wolffi*, *andamana*, *patoc*, L1-125. Canaleta 15 controle negativo.

#### 5.4.2 Aplicação do método para isolados dos estudos epidemiológicos

Foram tipadas através do PCR amostras de 63 (71%) dos isolados de casos humanos do Hospital Couto Maia do estudo de leptospirose nos anos de 1996, 1997 e 1998. Essas amostras foram caracterizadas com anti-soros heterólogos como sendo do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. A avaliação com anticorpos monoclonais mostrou que as mesmas foram do sorovar *copenhageni*. Os resultados do PCR demonstraram que 96,8% (61/63) das amostras testadas tiveram padrão idêntico, com mesmo número e posição de bandas, ao de cepas pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, quando comparado com cepas de referência pertencentes a este sorogrupo. A amostra isolada em 1996 que foi caracterizada sorologicamente como sendo do sorogrupo Canicola, apresentou, na tipagem molecular pelo PCR, padrão de bandas idêntico ao da cepa de referência *canicola* (Hond Utrecht). A cepa caracterizada como do sorogrupo Hursbridge, apresentou padrão diferente das 26 cepas padrão testadas.

Outro grupo para análise foi constituído de isolados de ratos do estudo de reservatórios as quais foram isoladas em 1998. Das amostras isoladas, 35 (31%) foram tipadas pelo PCR. Em todos os experimentos foram analisadas simultaneamente amostra da cepa padrão do sorovar *copenhageni* cepa M 20. Todas as amostras foram testadas com os *primers* que amplificam entre seqüências IS1500 e IS1533. A Figura 7 mostra padrões de amostras isoladas de ratos e de casos humanos comparadas com a cepa de *copenhageni*. Os padrões apresentados no PCR foram idênticos ao de cepas do sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

Foram avaliadas também amostras pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, como as cepas do sorovar *copenhageni* de outras cidades brasileiras tais como São Paulo e Rio de Janeiro e duas cepas do sorovar *icterohaemorrhagiae*, cepas 3294 e RGA e o sorovar *budapeste* (ATCC 23581). O padrão destas amostras foram comparadas com amostras isoladas do estudo de Salvador e com o padrão de diferentes sorovares (Figura 8). As amostras isoladas do estudo possuíram padrões similares ao das amostras de referência, confirmando a sua identidade. As amostras pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* demonstraram padrões similares no PCR mostrando que o método não possuiu poder discriminatório entre amostras pertencentes ao mesmo sorogrupo dessa espécie.

**Tipagem molecular pelo PCR de amostras de leptospiros isolados de casos humanos e de ratos em Salvador- Ba com os *primers* de IS 1500 e IS 1533**

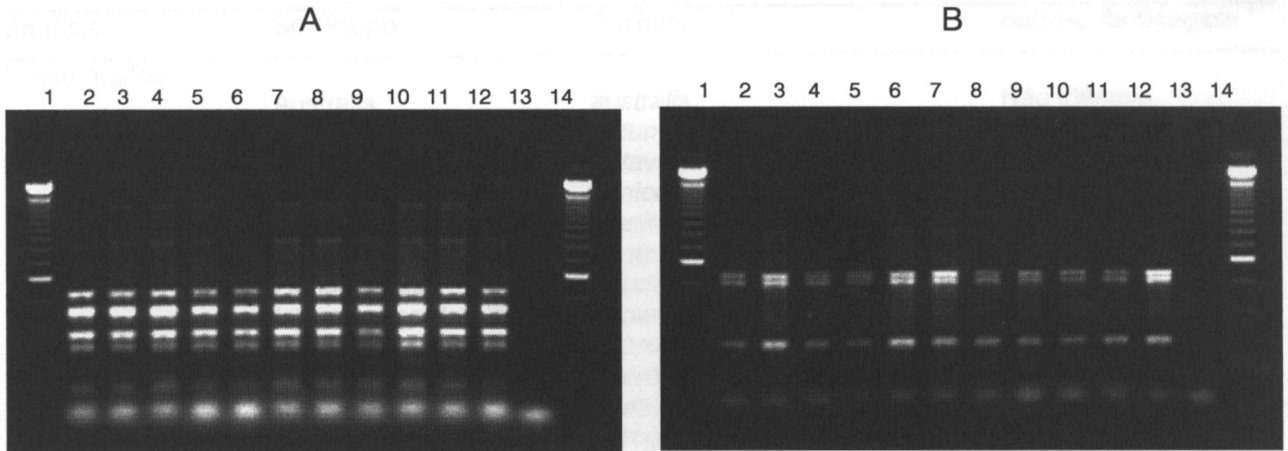


Figura 7: Comparação de amostras de leptospiros isoladas de humanos e de ratos com o sorovar de referência *copenhageni* amplificados com *primers* para IS 1500 (A) e IS 1533 (B). canaletas 1 e 14 representam o marcador de pares de bases 250 pb ladder (250-5000pb). As canaletas 2-6 representam produtos amplificados de isolados de humanos L8 27, L8 28, L8 46, L8 48, L8 99. Linhas 7-11 representam produtos das amostras isoladas de rato, R 1, R 2, R 3, R33, R34. Canaleta 12 representa amostras de sorovar *copenhageni* cepa M20. Linha 12 representa o controle negativo.

**Tipagem molecular pelo PCR de cepas padrão de leptospiros e isolados de casos humanos com os *primers* de IS 1500 e IS 1533**

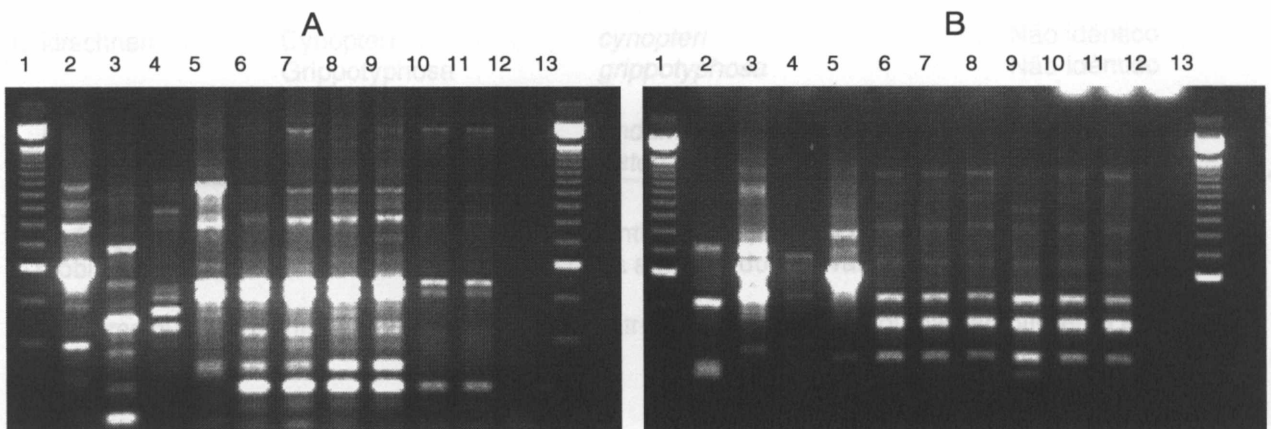


Figura 8: Comparação de amostras de leptospiros do sorogruppo *Icterohaemorrhagiae* com *primers* para IS1533 (A) e IS1500 (B). Canaletas 1 e 13 representam o marcador de pares de bases 250 pb ladder (250-5000pb). As canaletas 2-11 representam produtos amplificados dos sorovares *patoc*, *pomona*, *djasiman*, *icterohaemorrhagiae* cepa RGA, *icterohaemorrhagiae* cepa 3294, *budapeste* (ATCC), *copenhageni* cepa M20, *copenhageni* (SP), *copenhageni* (RJ) . Linha 12 representa o controle negativo.

**Tabela 7 : Sumário do resultado de padronização do método de tipagem molecular com os *primers* IS1500 e IS1533 com cepas de referência de leptospiras**

<b>Espécie</b>	<b>Sorogupo</b>	<b>Sorovar</b>	<b>padrão da tipagem <sup>1</sup></b>
L. interrogans	Australis	<i>australis</i>	Não idêntico
	Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Não idêntico
	Bataviae	<i>bataviae</i>	Não idêntico
	Canicola	<i>canicola</i>	Não idêntico
	Djasiman	<i>djasiman</i>	<b>Idêntico *</b>
	Djasiman	<i>sentot</i>	<b>Idêntico *</b>
	Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Não idêntico
	Icterohaemorrhagiae	<i>copenhageni</i>	<b>Idêntico</b>
	Icterohaemorrhagiae	<i>Icterohaemorrhagiae</i> cepa 3294	<b>Idêntico</b>
	Icterohaemorrhagiae	<i>Icterohaemorrhagia</i> cepa RGAE	<b>Idêntico</b>
	Pomona	<i>pomona</i>	Não idêntico
	Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Não idêntico
	Ranarum	<i>cuica</i>	Não idêntico
	Serjoe	<i>wolffi</i>	Não idêntico
Sejroe	<i>saxkoebing</i>	Não idêntico	
L. borgpetersenii	Baliium	<i>castellonis</i>	Não idêntico
	Javanica	<i>javanica</i>	Não idêntico
	Sejroe	<i>sejroe</i>	Não idêntico
	Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Não idêntico
L. weilli	Celledoni	<i>celledoni</i>	Não idêntico
L. noguchii	Panama	<i>panama</i>	Não Idêntico
L. Santarosai	Shermani	<i>shermani</i>	Não idêntico
L. kirschneri	Cynopteri	<i>cynopteri</i>	Não idêntico
	Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Não idêntico
L. biflexa	Andamana	<i>andamana</i>	Não idêntico
	Semaranga	<i>patoc</i>	Não idêntico

1. Definição de padrões. Foi considerado como idêntico quando a amostra apresentou o mesmo número e mobilidade relativa de bandas comparados com a amostra do sorovar *copenhageni*.

\* Amostras que apresentaram padrões idênticos entre si porém apresentou padrão diferente ao padrão do sorovar *copenhageni*.



## 6 DISCUSSÃO

---

No período de maio a novembro de 1997 foram identificados 210 casos com suspeita clínica de leptospirose em Salvador, Bahia. Surtos de leptospirose tem sido freqüentes no país, com registro do primeiro caso em 1923. Na Bahia, estes surtos estão, na maioria das vezes, associados a enchentes decorrentes de elevadas precipitações pluviométricas (CALDAS et al., 1979). A leptospirose ocorre em todo o país, entretanto é mais freqüente no nordeste, região que registrou em 1986, 66,6% de todos os casos notificados no país (BRASIL, 1988). Entre os anos de 1981 a 1988 foram notificados 1.968 casos de leptospirose na cidade de Salvador com 228 óbitos, correspondendo a 11,6% do total. Surtos de leptospirose ocorrem todos os anos, necessitando de ações multidisciplinares para reverter este quadro.

A confirmação diagnóstica da leptospirose é feita pêlos métodos convencionais de microaglutinação e cultura que é realizada em poucos laboratórios de referência no Brasil, pois são laboriosos e requerem especialidade técnica. Durante o período do estudo, de maio a novembro de 1997 foram colhidas amostras de soro de 162 pacientes com diagnóstico clínico de leptospirose na admissão. Foram confirmados 51,3% dos casos identificados e 12,3% foram definidos como prováveis. Estes dados são compatíveis com o encontrado por CALDAS et al, 1978, que em um estudo com pacientes hospitalares em Salvador- Bahia constatou uma positividade de 36% entre os pacientes que tiveram o diagnóstico clínico de leptospirose na admissão (CALDAS et al., 1979). O mesmo autor, em um estudo durante um surto de leptospirose durante os meses de maio e junho de 1978, investigou 141 pacientes no Hospital Couto Maia e

obteve confirmação diagnóstica de 76,6% dos pacientes pela microaglutinação (CALDAS et al., 1978). Esse alto percentual de positividade pode ser atribuída ao fato de que os pacientes chegaram ao hospital em média com sete dias após o aparecimento dos sintomas quando o quadro clínico já é característico. Os critérios adotados para confirmação do diagnóstico nesse estudo foi da microaglutinação possuir título único igual ou superior a 1:200, não necessitando de mais de uma amostra de soro do paciente para proceder a confirmação.

Neste estudo foram adotados os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde que requer a demonstração de soroconversão para a confirmação diagnóstica na microaglutinação, sendo necessárias duas ou mais amostras, com intervalos de 15 dias, para evidenciar o aumento de títulos de quatro vezes ou mais. Foram obtidas amostras de soro pareados, de fase aguda e convalescente de 55,2% dos casos identificados. Não foi possível realizar a confirmação diagnóstica em 36,4% dos casos por não ter sido obtidas amostras pareadas dos pacientes. As limitações para a confirmação diagnóstica pela microaglutinação são devidas à dificuldade quanto ao retorno do paciente após 15 dias para coleta da segunda amostra e à percentagem de óbitos que nesse estudo foi de 7,3% nas primeiras 48 horas de internação, antes que a confirmação diagnóstica fosse realizada.

Entre os pacientes dos quais foram obtidas amostra de soro pareados, 85,6% foram definidos como caso confirmados ou provável pela microaglutinação, demonstrando um elevado valor preditivo positivo para suspeita clínica. Dentre os pacientes os quais foram testados pela microaglutinação e cultura, 50% tiveram sorologia positiva e cultura negativas. Estes dados apontam para necessidade de soros

pareados para a confirmação do diagnóstico assim como a necessidade de utilização de mais de um teste padrão para o diagnóstico.

Outro método padrão para a confirmação diagnóstica é a cultura. Esse teste foi realizado em apenas 39,4% (76/193) dos pacientes identificados devido as dificuldades técnicas em realizá-lo em todos os casos identificados. A cultura apresentou uma positividade de 45,5% , compatível com os dados da literatura que relatam percentagens em torno de 50% (FAINE, 1882). Dos pacientes que foram testados pela cultura e MAT, 43% tiveram o diagnóstico confirmado apenas pela cultura sendo sorologia negativa, tendo em vista que na fase inicial da doença os níveis de anticorpos não são detectáveis pela microaglutinação. Este dado reforça a necessidade da utilização dos dois métodos padrão para confirmação do diagnóstico de leptospirose. A cultura de leptospiras é um método laborioso, demorado e caro entretanto o isolamento do organismo permite a identificação do sorovar infectante que é importante para o estudo epidemiológico da leptospirose. Os dados da literatura, até o presente momento, apontam para a necessidade do desenvolvimento de novos testes diagnósticos que detectem precocemente os casos de leptospirose e sobretudo que estes testes sejam de fácil realização e baixo custo.

Esse estudo teve como um dos objetivos, desenvolver um teste baseado na reação da polimerase em cadeia para o diagnóstico da leptospirose na fase inicial. Para tanto foram colhidas amostras de 129 pacientes, 66,8% dos pacientes envolvidos neste estudo, sendo que destes foram colhidas 80 (62,0%) amostras pareadas de plasma e urina, 33 (25,6%) amostras de urina e 16 (12,4%) de apenas plasma. A urina é a amostra ideal dado à facilidade de obtenção das mesmas, mas por outro tem limitações

tendo em vista que pacientes com leptospirose grave apresentam anúria, como observado em 8 (6,2%) dos 129 pacientes selecionados para o estudo do PCR.

Para cálculo da sensibilidade do método os resultados do PCR foram comparados com os de microaglutinação e cultura. A sensibilidade do PCR foi de 44% (36/83) em amostras de urina, 21% (16/78) amostras de plasma. A baixa sensibilidade é similar a encontrada por MÉRIEN et al.,1995 e difere em relação ao espécime examinado. Neste trabalho foram testadas 115 amostras e o PCR foi positivo em 38% (43/89) das amostras de soro e 25% (5/20) das amostras de urina. Essa diferença pode estar relacionada ao pequeno número de amostras de urina testadas pelo autor. Nossos resultados estão de acordo com o encontrado por BAL e colaboradores (1994), quando demonstrou que amostras de urina foram mais eficientes para a detecção de DNA de leptospiros. Neste estudo, uma grande quantidade de urina (acima de 300 ml) foi analisada com o intuito de aumentar a sensibilidade do método. O problema com esta estratégia é que os pacientes com leptospirose grave têm comprometimento renal e são usualmente oligúricos, o que torna difícil a obtenção de urina para análise.

Quando analisadas amostras pareadas de plasma e urina a sensibilidade do PCR aumentou para 56%(37/65). Resultado semelhante foi obtido por BROWN et al.,1995 que testaram amostras de sangue e urina de 71 pacientes com leptospirose e o PCR foi positivo em 44 (62%) deles. A baixa sensibilidade do PCR pode ser atribuída, em parte, a presença de fatores inibidores presentes nas amostras que impedem o processo de amplificação (BOOM et al., 1990). A presença desses inibidores em amostras de soro foi descrita por GRAVEKAMP et al., (1991) como fator que pode ter interferido no resultado do PCR. Outro fator pode ser devido a pequena quantidade de leptospiros presentes na amostra, abaixo do nível de detecção de 10 leptospiros/ml. Em

relação a fatores como degradação de DNA, GRAVEKAMP et al., 1991 descreveram que soros que foram estocados por um longo período a 4 C e o descongelamento das amostras de DNA pode ter interferido na positividade do PCR. No presente estudo, foram identificados fatores como o longo período entre a coleta da amostra e o seu processamento, superior, algumas vezes, a 10 horas, que pode ter contribuído para a degradação de DNA. Outra possibilidade é em relação ao uso de antibióticos pelos pacientes antes da coleta das amostras.

Para avaliar se o uso prévio de antibióticos interferiu no resultado de PCR, foi verificado que entre os pacientes que usaram antibióticos a positividade do PCR em plasma foi 24% (12/50) e da urina 47% (12/26). Entre os pacientes que não usaram antibióticos a positividade do plasma foi 8% (2/27) e da urina 45% (25/57). Esses dados demonstraram que o uso prévio de antibióticos teve influência na positividade do PCR em amostras de plasma, indicando a ação do medicamento na circulação sanguínea.

Alternativas para aumentar a sensibilidade do PCR podem ser o uso de sondas para hibridização dos produtos amplificados e metodologias para extração de DNA, como por exemplo o uso de Isotiocianato de Guanidina que foi demonstrado ter vantagens sobre as demais técnicas por aumentar a sensibilidade para detecção de 1-10 leptospiros/ml de amostra, como demonstrado por BOOM et al, 1990 e GRAVEKAMP et al., 1991. A principal desvantagem dessas alternativas é o aumento do custo que as mesmas representam.

Foi realizada análise para avaliação do PCR quanto a sua eficiência na detecção precoce da leptospirose através da estratificação dos pacientes por dias de sintomas apresentados até o momento da coleta da amostra, tendo sido observado que para as amostras de plasma a positividade do PCR passou de 30% nos pacientes com menos

de sete dias de sintomas para 10% naqueles com mais de sete dias, como esperado uma vez que no período inicial da doença, as leptospiras encontram-se no sangue circulante. Para as amostras de urina a positividade mostrou pequena variação de 42% para 44% respectivamente. Esses resultados diferem dos achados de BAL et al., 1994 que demonstraram que após 8 dias de sintomas, 19 (86%) das 22 amostras de urina foram positivas pelo PCR. No trabalho descrito por MÉRIEN et al., 1995, a distribuição dos sinais entre as amostras positivas mostrou que 64% (27/43) foram obtidos antes de 10 dias de evolução clínica.

Nesse estudo foi desenvolvida ainda uma metodologia simplificada para extração de DNA baseada na centrifugação das amostras clínicas e liberação do DNA das bactérias pela fervura para atender ao objetivo de desenvolver um método para ser utilizado no hospital imediatamente após a coleta das amostras. Após padronização do mesmo, foi possível detectar entre 10-100 leptospiras/ml por esse método. Não foi possível detectar bandas visualmente em gel de eletroforese quando foram testadas amostras com menos de 10 leptospiras/ml. Os trabalhos da literatura fizeram hibridização do DNA amplificado com sondas e por isso foi possível a detecção de até uma bactéria/ml. A hibridização é uma alternativa para o aumento da sensibilidade do teste, porém encarece o processo tornando difícil a sua implantação.

Outro objetivo desse estudo foi o isolamento e caracterização de cepas de leptospiras durante as epidemias afim de estabelecer relações com fontes de infecção. Os métodos convencionais para caracterização dos isolados são sorológicos, baseados em reações de microaglutinação cruzadas com anti-soros heterólogos. Estes métodos são demorados, laboriosos e são realizados em laboratórios de referência. Os resultados das análises dos soros dos pacientes pela MAT mostrou que 90,4% dos

casos confirmados foram do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. O teste de microaglutinação fornece resultados indiretos dos sorogrupos que são reconhecidos. A identificação das cepas é necessária para fazer identificação de novos sorovares e estabelecer relação com os reservatórios.

Dado às dificuldades de realização da caracterização dos isolados, um método alternativo para a tipagem de cepas é através da utilização de anticorpos monoclonais (KOVER et al., 1988). Com essa metodologia foram analisadas 69 amostras de leptospiros isoladas de casos humanos em três anos de estudo em Salvador- Bahia e 34 amostras isoladas de ratos dessa cidade. Os resultados demonstraram que 97% das amostras de humanos e 100% das amostras de ratos testadas por esta metodologia pertenceram ao sorovar *copenhageni* e apenas 1,5% foi pertencente ao sorovar *canicola*. Esses dados mostraram uma forte associação dos casos humanos com os reservatórios roedores, reconhecido como portador universal dessa doença e o principal reservatório desse sorovar. Para realização desses testes houve a necessidade de adquirir os anticorpos monoclonais, que possuem custo elevado e o tempo requerido para realização desse teste foi muito longo, portanto, apontando para necessidade de desenvolvimento de testes simples para caracterização dos isolados que possam ser aplicados em laboratórios que não sejam de referência.

Os ensaios de tipagem molecular baseados na amplificação do DNA oferecem vantagens sobre os demais testes como o de eletroforese de campo pulsado após digestão com enzimas de restrição (PFGE), devido a facilidade de execução desses testes e o curto tempo requerido para a sua realização e sobre a técnica de hibridização de DNA, que além de complexa requer grande quantidade de DNA purificado. BROWN et al., 1997, testaram três diferentes métodos de PCR, como AP-PCR e LS-PCR

baseados na utilização de primers únicos e randômicos. Estes testes apesar da facilidade para serem realizados não possuíram a capacidade de diferenciar cepas de leptospiros pertencentes a diferentes espécies. Naquele estudo o autor verificou que sorovares da espécie *L. interrogans* como *canicola* e *portlandvere* e *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* não foram distinguíveis.

A estratégia do método de PCR baseado na amplificação entre seqüências repetidas de DNA genômico, tem sido descrito como um sistema alternativo para caracterização de diferentes microorganismos para estudos epidemiológicos. Nesse estudo a padronização do método foi realizada com 26 cepas de referência pertencentes a seis espécies patogênicas e uma não patogênica para determinar o poder de discriminação do mesmo. Os resultados indicaram que através desse método que as cepas de diferentes espécies não tiveram o mesmo padrão (poder discriminatório de 100%) e dentro de cada espécie as cepas não apresentaram padrões iguais a de outros sorogrupos. O método utilizado pode diferenciar as cepas em espécies e comparado com outros ensaios como RAPD-PCR, PFGE, tem a vantagem de ser de fácil execução e de requerer um curto tempo para sua realização.

Os resultados das cepas isoladas de casos humanos e ratos demonstraram que 98,8% das amostras de humanos e 100% das de ratos testadas tiveram padrão semelhante ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Finalmente, apesar do PCR não poder diferenciar as cepas em sorovares, é um método simples e eficiente para caracterização das cepas se comparado com a microaglutinação com soros heterólogos.



## 7 CONCLUSÕES

---

1. A sensibilidade do PCR para diagnóstico foi de 44% (36/83) em amostras de urina e 21% (16/78) em amostras de plasma, dificultando a utilização deste teste como rotina laboratorial.
2. Apesar da baixa sensibilidade o PCR foi capaz de identificar 39% (11/28) de pacientes que não foram confirmados pela MAT e cultura, demonstrando a eficiência do PCR na detecção da leptospirose.
3. A baixa sensibilidade do PCR, principalmente em amostras de plasma pode estar relacionadas: com a fase em que as amostras dos pacientes foram obtidas, com o uso de antibióticos e com o tempo prolongado para processamento das amostras.
4. As alternativas para o aumento da sensibilidade podem ser a hibridização dos produtos amplificados ou utilização de técnicas mais elaboradas para a extração de DNA.
5. A tipagem molecular baseada na amplificação entre elementos repetitivos (IS 1500 e IS 1533) mostrou ser um método que pode diferenciar as cepas em espécies e sorogrupos e comparado com outros ensaios, tem a vantagem de ser de fácil execução e de requerer um curto tempo para sua realização.
6. O método de tipagem molecular pelo PCR demonstrou ser reprodutível e eficiente para caracterização de cepas de leptospiras isoladas de investigações epidemiológicas.
7. O método não foi sensível para discriminação de sorovares e por isso não pode ser utilizado para estudos de epidemiologia molecular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. APASSAKIJ, H.; SILPAPOJAKUL, K.; WANSIT, R.; WOODTAYAKORN, J. Evaluation of immunofluorescent antibody test for diagnosis of human leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**: 340-43, 1995.
2. AZEVEDO, E. & CORRÊA, M. Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife, em 1966. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **28**: 85-111, 1968.
3. BAL, A E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A; DE MEZA-BREWSTER, J.; KOVER, H. TERPSTRA, W. J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, **32**:1894-1898, 1994.
4. BERMAN, S. J.; TSAI, C.-C.; HOLMES, K.; FRESH, J. W.; WATTEN, R. H. Sporadic anicteric leptospirosis in South Vietnam: A study in 150 patients. **Ann. Intern. Med.**, **79**: 167-73, 1973.
5. BOLIN C. A; Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Semin. Vet. Med. Surv.**, **11**: 166-71, 1996.
6. BOOM, R; SOL, C.J.A; SALIMANS, M.M.M; JASSEN, C.L; WERTTHEIM-VAN DILLER, P.M.E; NOORDA, VAN DER J. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. **J. Clin. Microbiol.**, **28**:495-503, 1990.
7. BOURSAUX- EUDE; C.; SAINT GIRONS, I.; ZUERNER, R.L. Characterization of IS1500, and IS3-like element isolated from *Leptospira interrogans*. **J. Microbiol.**, **141**: 2165-73, 1995.
8. BRANDÃO, A P.; CAMARGO E. D.; SILVA, E. D.; SILVA, M. V.; ABRÃO, R. V. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, **36**:3138-3142, 1998.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Ações de controle da leptospirose a nível nacional. **Bol. Nac. Epidemiol.**, **1**: 1-2, 1988.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. In: **Manual de leptospirose**. Brasília, 1995.
11. BROWN, P.D. & LEVETT, P.N. Differentiation of leptospira species and serovar by PCR- restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low- stringency PCR. **J. Med. Microbiol.**, **46**: 173-81, 1997.

12. BROWN, P.D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G. Evolution of the polimerase chain reaction for early diagnosis of Leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, **43**: 110-14, 1995.
13. CALDAS, E. M. & SAMPAIO, M. B. Alguns aspectos epidemiológicos da leptospirose em Salvador, Bahia, em Maio e Junho de 1978. **Rev. Med. Bahia**, **23**: 90- 106, 1977.
14. CALDAS, E. M. & SAMPAIO, M. B. Leptospirose na cidade de Salvador (Brasil)- Alguns aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev. Inst. Med. Tropical São Paulo**, **20** (3): 164- 176, 1978.
15. CALDAS, E. M.; SAMPAIO, M. B.; E. 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**, **20**: 85-94, 1979.
16. CHAPPEL, R. J., KHALIK, D. A., ADLER, B. BULACH, D. M., FAINE, S. PEROLAT, P., VALLANCE, V. Serological titres to *Leptospira fainei* serovar *hurstbridge* in human sera in Australia. **Epidemiol. Infect.**, **121**: 473-475, 1998.
17. CORDEIRO, F. & SULZER, C, R. Two new leptospiral serovars in the Javanica group isolated in Brazil. **Rev. Microbiol.**, **12**: 55-60, 1981.
18. CORDEIRO, F.; SULZER, C, R.; RAMOS, A. A. *Leptospira interrogans*, sorovar *copenhageni*, isolated from a dog in Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Microbiol.**, **14**: 38-41, 1983.
19. DE WIT, D.; STEYN, L.; SHOEMAKER, S.; SONGIN, M. Direct detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 2437-441, 1990.
20. ELLINGHAUSEN, H. C. & McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. **Am. J. Vet. Res.** **26**: 39-44, 1965.
21. FAINE, S. Guidelines for the Control of Leptospirosis. **WHO**, (67):1982.
22. FAINE, S. *Leptospira* and leptospirosis. Baton Raton: CRC Press, 1993.
23. FAINE, S. *Leptospira* and leptospirosis serovar *icterohaemorrhagiae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**: 483-89, 1996.
24. FARR, R.W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, **21**: 1-8, 1995.
25. GUISSENNHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO

dipstick, a dipstick assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **J. Clin. Microbiol.** 3: 92-97, 1997.

26. GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G.J.; VAN EYS, G.J.J.M.; EVERARD, C.O.R.; HARTSKEERL, R. A.; W.J.TERSTRA, W.J. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. **J. Gen. Microbiol.**, 139: 1671-700, 1993.
27. GOH, S. H.; BYRNE, S. K.; ZHANG, J. L.; CHOW, A. W. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.** 30: 1642-1645, 1992.
28. HAY, P. E. CLARKE, J. R.; STRUGNELL, A. R.; TAYLON- ROBINSON, D.; GOLDMEIER. Use of polimerase chain reaction to detect DNA sequence specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid. **FEMS Microbiol. Lett.** 68: 233-238, 1990.
29. HERRMANN, J. L.; BELLENGER, E.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Pulsed- field gel eletrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of sorovaridentification. **J. Clin. Microbiol.** 30: 1696-1702, 1992.
30. INADA , R.; IDO,Y; HOKI, R.; KNERO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **J. Exp. Med.**, 2: 377-402, 1916
31. KMETY, E. & DIKKEN, H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen: University Press, 1993. v.1 p.89-96.
32. KO, A.; REIS, M.G, DOURADO C. M. R; JOHNSON, W.; RILEY, L. Urban epidemic of severe Leptospirosis in Salvador, Brazil. **Lancet**, 354: 820-25, 1999.
33. KORVER, H.; KOLK, A.H.J.; VINGERHOED J.; VAN LEEUWEN J.; TERPSTRA W. J. Classification of the icterohaemorrhagiae serogroup by monoclonal antibody. **Isr. Vet. Med.**, 44: 15-18, 1988.
34. LEITE, L.T.Q.; RESENDE, M.; WANDERLEY DE SOUZA, E.; R. S. CAMARGO, R.S.; KOURY, M.C. Production and characterization of Monoclonal Antibodies to the EDTA extract of leptospira interrogans, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29: 483-89, 1996.
35. MASRI, S. A.; NGUYEN, P. T.; GALE, S. P., HOWARD, C. J.; JUNG, S. C. A polimerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* ssp. in bovine semen. **Can. J. Vet. Res.**, 61: 15-20, 1997.
36. McCLAIN, J. B. L.; BALLOU, W.R.; HARRISON, S. M.; STEINWEG, D. L. Doxycycline therapy for leptospirosis. **Ann. Intern. Med.**, 100: 696- 98, 1984.

37. MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polimerase chain reaction for detection of *Leptospira* ssp in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 2219-24, 1992.
38. MÉRIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polimerase chain reaction with Microagglutination Test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J. Infect. Dis.**, **172**: 281- 85, 1995.
39. PAPAS, M.G. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using IGM- specific DOT-ELISA: comparasion with the microscopic agglutination test. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **34**: 346-54, 1985.
40. PARK, S.-K.; LEE, S.-H.; RHEE, Y.-K.; KANG, S.-K.; KIM, K.-J.; KIM, K.-W.; CHANG, W.H. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: A study of 93 patients. **J. Trop. Med. Hyg.**, **4**: 345-51, 1989.
41. PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Pulsed-field gel eletrophoresis of not digest of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 1696-702, 1992.
42. PEROLAT, P.; MERIEN, F.; ELLIS, W. A.; BARANTON, G. Characterization of *Leptospira* isolates from serova *Hardjo* by ribotyping, arbritarily primed PCR, and mapped restriction site polimorphisms. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 1949-97, 1994.
43. PEROLAT, P.; CHAPPEL, R. J.; ADLER, B.; BARANTON, G.; BULACH, D. M.; BI' LINGHURST, M. L.; LETOCART, M.; MÉRIEN, F., SERRANO, M. S. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australis. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **48**: 851-858, 1998.
44. PLIKAYTIS, B. B.; CRAWFORD, J. T.; WOODLEY C. L.; BUTLER, W. R.; EISENACH K. D.; CAVE M. C.; SHINNICK. Rapid amplification- based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.**, **139**: 1537-42, 1993.
45. ROSA, P. & SCHWANN, T. G. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochet *Borrelia borgdorferi* using the polimerase chain reaction. **J. infect. Dis.** **160**: 1018-1029, 1989.
46. RAMADAS, P.; JARVIS, B. D. W.; CORNER, J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic caracterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hibridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **42**: 215-19, 1992.
47. RIBEIRO, M. DOT-ELISA for human leptospirosis employing imunodominant antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **98**: 452-56, 1995.
48. RIOS GONÇALVES, A. J.; CAPONE, G.; PAZ, N. A; PAULO, R. V. V.; DIAS, T. B.

- C. M.; LAGO, V. C. C.; CARVALHO, L. M. A. Leptospirose. Observações sobre as mudanças dos padrões clínicos no Rio de Janeiro após a grande epidemia de 1988. **Arq. Bras. Med.** **64**: 389-397, 1990.
49. SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SUGUNAN, A. P. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **93**: 161-64, 1999.
50. SMITS, H. L.; ANANYINA, Y. V.; CHERESHES, A.; DANCEL, L.; LAI, A.; FAT, R. F.; CHEE, H. D.; LEVETT, P. N.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; MUTHUSETHUPATHI, M. A.; SANDERS, E. J.; SASAKI, D. M.; DOMEN, H.; YERSIN, C.; AYE, T.; BRAGG, S. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection in human serum specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **37**: 2904-09, 1999.
51. SONGER, J.G.; CHILELLI, C. J.; REED, R.E.; TRAUTMAN, R.J. Leptospirosis in rodents of arid environment. **Am. J. Vet. Res.**, **44**: 1973-76, 1983.
52. TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, F.; BALLY, F.; BOTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**; **31**: 175-178, 1993.
53. TERPSTRA, W. J.; LIGTHART, J. G. S.; SCHOONE, G. J. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. **J. Gen. Microbiol.** **131**: 377-385, 1985.
54. THIERMANN, A. E., HANDSAKER, A. L., MOSELEY, S. L., KINGSCOTE, B. New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup Pomona by restriction endonuclease analysis: serovar *kennewicki*. **J. Clin. Microbiol.**; **21(4)**: 585-587, 1985.
55. VERONESI, R.; LOMAR, A.V.; De BRITO, T.; DIAMENT, D. Leptospirose. In: VERONESI, R. & FOCCACIA, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap. 79. p.987-1003.
56. WEIL, A.; Ueber eine eigenthumliche, mit Milztumor, Icterus and Nephritis einhergehende, acute infectionskrankheit; **Dtsch. Arch. Klin. Med.**; **39**: 209, 1886
57. WEISH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, **18**: 7213-218, 1990.
58. YASUDA, P. H.; STEIGERWAL, T.; SULZER, A.G.; KAUFMANN, K.R.; ROGER, A. F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family leptospiraceae with proposals for seven new leptospira species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **37**: 407-15, 1987.

59. YERSIN C.; BOVET P.; SMITS H. L.; PEROLAT P. Field evaluation of a one- step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. **Trop. Med.**, 4: 38-45, 1999.
60. ZAKI, S. R. & SHIEH, W. J. Leptospirosis associate with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicarágua, 1995. **Lancet**, 347: 535-36, 1995.
61. ZUERNER, R. L. & BOLIN, C. A. Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphisms. **Vet. Microbiol.**, 24: 355-66, 1990.
62. ZUERNER, R. L.; ELLIS, W. A.; BOLIN, C. A.; MONTGOMERY. Restriction fragment length polimorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type *hardjo*- *bovis* isolates from different geographical locations. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 578-83, 1993.
63. ZUERNER, R. L.; DAVID ALT; BOLIN, C.A. IS1533- based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* Sensu Lato Serovars. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 3284-89, 1995.
64. ZUERNER, R. L. & BOLIN, C. A. Differentiation of *Leptospira interrogans* Isolates by IS1500 Hibridization and PCR assays. **J. Clín. Microbiol.**, 35: 2612-17, 1997.
65. WINSLON, W.E.; MERRY, D.J.; PIRC M.L.; DEVINE, P.L. Evaluation of comercial enzyme- linked Imunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 1938-42, 1997.
66. WOODS, S.A. & COLE, S.T. A rapid method for the detection of potentially, viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **Fems Microbiol. Lett.**, 65: 305-10, 1989.