

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Tatiane Mendes Varela Ramos

**Isolamento, identificação e avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos  
de *Leptospira* spp. isoladas de águas do Rio Carioca na cidade do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2023

Tatiane Mendes Varela Ramos

**Isolamento, identificação e avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Leptospira* spp. isoladas de águas do Rio Carioca na cidade do Rio de Janeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira.

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ilana T. Balassiano e Prof. Dr. Kayo Cesar B. Fernandes.

Rio de Janeiro

2023

Título do trabalho em inglês: Isolation, identification and evaluation of the antimicrobial susceptibility profile of *Leptospira* spp. isolated from Carioca River at Rio de Janeiro City.

R175i Ramos, Tatiane Mendes Varela.  
Isolamento, identificação e avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Leptospira* spp. isoladas de águas do Rio Carioca na cidade do Rio de Janeiro / Tatiane Mendes Varela Ramos. -- 2023.  
87 f. : il.color, fotos, mapas.

Orientadora: Joseli Maria da Rocha Nogueira.  
Coorientadores: Ilana Teruszkin Balassiano e Kayo Cesar Bianco Fernandes.  
Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2023.  
Bibliografia: f. 72-79.

1. Leptospirose. 2. Classificação. 3. Meio Ambiente. 4. Anti-Infeciosos. 5. Suscetibilidade aos Antimicrobianos. I. Título.

CDD 616.95

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348  
Biblioteca de Saúde Pública

Tatiane Mendes Varela Ramos

**Isolamento, identificação e avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Leptospira* spp. isoladas de águas do Rio Carioca na cidade do Rio de Janeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Denise Borges dos Santos Dias  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia

Prof.<sup>a</sup> Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados  
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Alves de Oliveira  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Shênia Patrícia Correa Novo  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Kayo Cesar B. Fernandes (coorientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ilana T. Balassiano (coorientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof.<sup>a</sup>Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira (Orientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2023

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me conduzido até aqui. Mesmo diante de tantas dificuldades me fortaleceu e abriu as portas necessárias para a conclusão deste trabalho. A Ele toda honra, toda glória e todo louvor!

Aos meus pais Carlos Alberto Varela (*in memoriam*) e Hilda Mendes Varela (*in memoriam*) por todos os esforços para que eu pudesse ter acesso ao melhor ensino, por tudo que abriram mão para que eu avançasse nos estudos e por todos os valores que me ensinaram, para que eu fosse uma pessoa melhor.

Aos meus amados filhos Deborah, Daniel e Esther, que precisaram compreender os meus compromissos acadêmicos, que muitas vezes exigiram minha ausência e sempre me retribuíram com todo amor e carinho. Vocês são meus presentes do céu!!!

Ao meu amado esposo Marcelo Lino, que sempre me incentivou a continuar estudando, mesmo quando passamos por situações desfavoráveis à continuação do curso, não permitindo que eu desistisse. Obrigada, querido!

A minha querida orientadora Dra. Joseli Nogueira, que foi a responsável pela minha decisão de ingressar nesta jornada do doutorado, sempre me apoiando como professora e amiga em todos os momentos difíceis e participando da construção deste trabalho.

Aos meus coorientadores Dr. Kayo Bianco e Dra. Ilana Balassiano, por participarem da construção deste trabalho e por disponibilizarem tempo e conhecimento. Ao Dr. Kayo por toda assistência em biologia molecular, pois sem ele, não alcançaríamos nossos resultados.

A minha amiga e colega de doutorado Taíssa Silva, que conseguiu a autorização do ICMBio e realizou o contato com os monitores do parque da floresta da Tijuca. Também conseguiu um carro oficial da Fiocruz para auxiliar na coleta das amostras de água nos diferentes pontos do Rio Carioca.

A minha amiga e colega do doutorado Kaylanne, pois foi através dela que conheci o Dr. Kayo e assim iniciamos a parceria com o Laboratório de Microrganismos de Referência – INCQS/FIOCRUZ.

À Dra. Maysa Mandetta, chefe do Laboratório de Microrganismos de Referência por me receber em seu laboratório, pelas orientações acadêmicas e por permitir utilizar reagentes e equipamentos para o sequenciamento genômico. Aos colegas do laboratório que me receberam com carinho e me ajudaram bastante nos experimentos. Gratidão a todos!!!!

À Plataforma de Sequenciamento de DNA - RPT01A – PDTIS por contribuir com os resultados deste trabalho.

Aos coordenadores e professores do PSPMA que por meio da disciplina de seminários, contribuíram para a construção desta tese, com sugestões e orientações a fim de aprimorar o conteúdo. Foi uma experiência maravilhosa participar deste programa de pós-graduação. Muito grata a todos!

À banca que aceitou avaliar minha tese e que tem me acompanhado desde a qualificação, contribuindo com críticas e sugestões que enriqueceram este trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – (Código de Financiamento 001) pela verba disponibilizada para a compra de material de consumo utilizado em nosso projeto.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram nessa minha jornada, muito obrigada!

“Nada temos a temer quanto ao futuro, a menos que nos esqueçamos  
como Deus tem nos conduzido no passado.”

(WHITE EG, 1949, p. 196)

## RESUMO

A leptospirose é uma zoonose global causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A infecção em humanos geralmente ocorre pelo contato com água e solo, contaminados com a urina de animais infectados. O ambiente é a principal fonte de infecção que precisa ser investigado, levando em consideração os problemas relacionados ao processo de urbanização desordenada, que incluem condições inadequadas de saneamento básico e infraestrutura inadequada das cidades. Neste estudo, nós investigamos a presença de cepas de *Leptospira* spp. em cinco pontos do Rio Carioca, localizado na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, o qual tem sofrido o impacto do processo de urbanização. Um total de 5 amostras foram coletadas de diferentes pontos do rio, usando tubos estéreis e foram filtradas em membranas de porosidade 0.45  $\mu\text{m}$  e 0.22  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Um volume de 0,5 mL de cada amostra foi inoculado nos meios EMJH e Fletcher semi-sólidos, contendo 5-fluorouracil (100 $\mu\text{g/mL}$ ). As culturas foram examinadas por microscopia de campo escuro, para evidenciar a morfologia do gênero *Leptospira*. O teste de aglutinação microscópica (MAT), utilizando um painel de 18 anti-soros de referência foi usado para sorotipagem das cepas isoladas. A detecção dos genes de patogenicidade (*flaB* e *lipL41*) e do marcador de gênero (*rrs*), foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O sequenciamento do gene *ppk* foi realizado para identificação das espécies. A suscetibilidade à penicilina, cefotaxima, ampicilina, doxiciclina e azitromicina foi testada pela técnica de microdiluição e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada. Cinco cepas de *Leptospira* sp. foram obtidas a partir das amostras testadas, correspondendo ao isolamento em 100% dos pontos de coleta. O gênero foi confirmado para as cepas CLEP 00366 a 370, através da morfologia observada ao microscópio e pelo sequenciamento do gene *rrs*, o qual codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal. A análise filogenética baseada no gene *ppk*, recentemente descrito como importante candidato para classificação filogenética, revelou uma correlação das cepas CLEP 00368, 00366 e 00370 com as espécies *L. idonii* (85,0%), *L. noumeaensis* (88,0%) e *L. bandrabouensis* (98,0%) respectivamente. Devido ao percentual de similaridade com espécies já conhecidas ter sido inferior a 98,7%, esse resultado pode indicar que estas cepas pertencem a espécies do gênero *Leptospira* ainda não descritas. Investigações futuras serão conduzidas para confirmar este resultado. A cepa CLEP 00367 mostrou uma correlação de 99% com a espécie *L. bromii*, anteriormente relacionada a doença em humanos. A cepa CLEP 00366 apresentou os maiores valores de CIM para todos os antibióticos testados, o que sugere a influência do impacto antropogênico sobre local de coleta, o qual possui considerável número de edificações no seu entorno, o que pode contribuir para o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos. A cepa CLEP 00370 foi isolada do ponto mais degradado do Rio Carioca e apresentou os segundos maiores valores de CIM para penicilina, doxiciclina, cefotaxima e ampicilina, colaborando com a hipótese de que a contaminação pela ação humana pode influenciar no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Considerando o impacto da leptospirose no conceito da Saúde Única, nossos resultados confirmam a importância da investigação da presença de *Leptospira* spp. no ambiente, que representa a maior fonte de contaminação para o homem e os animais.

Palavras-chave: *Leptospira* spp.; taxonomia; ambiente; suscetibilidade aos antimicrobianos.

## ABSTRACT

Leptospirosis is a global zoonotic disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. Human infection usually occurs by contact with water and soil contaminated with the urine of chronically infected animals. The environment becomes a infection source that needs to be investigated, considering the issues related to the disordered urbanization process, which includes the inappropriate conditions of the infrastructure of the cities and basic sanitation. These factors may influence the emergence of antimicrobial resistant strains. In this study, we evaluated the presence of *Leptospira* spp. in five points of the Carioca River, located in the metropolitan region of Rio de Janeiro city, which had an impact of the urbanization process. Five samples were collected at different points of the river, using sterile tubes, and went through 0.45 µm and 0.22 µm pore size membrane filters, respectively. A volume of 0.5mL of each sample was inoculated into both semisolid EMJH and Fletcher mediums containing 5-fluorouracil (100µg/mL). The cultures were examined by dark-field microscopy to evidence *Leptospira* morphology. Microscopic agglutination test (MAT), using a panel of 18 reference antisera, was applied for serotyping isolated strains. The detection of the pathogenicity (*flaB* and *lipL41*) and the genus (*rrs*) markers was carried out using the polymerase chain reaction (PCR) technique. The *ppk* gene sequencing was performed to identify the species. Antimicrobial susceptibility for penicillin, cefotaxime, ampicillin, doxycycline, and azithromycin was tested by the microdilution technique and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined. Five *Leptospira* sp. strains could be recovered from the water samples tested, corresponding to isolations in 100% of the collection points. The presence of the genus was confirmed by cell morphology under microscopy and sequencing of the *rrs* gene, which encodes the ribosomal RNA16S (CLEP 00366 to 370). The phylogenetic analysis based on *ppk* gene, recently described as an important candidate for phylogenetic classification, showed a genetic correlation of strains CLEP 00368, 00366 and 00370 close to *L. idonii* (85,0%), *L. noumeaensis* (88,0%) e *L. bandrabouensis* (98,0%) species, respectively. Due to the low percentage (less than 98,7%) of similarity among species previously described, this result may indicate that these strains belong to species of the genus *Leptospira* not yet described. Further investigations will be necessary to confirm this result. Strain CLEP 00367 strain showed a closer correlation with *L. bromii* (99%) specie, previously related with disease in humans. CLEP 00366 strain presented higher MIC values to all tested antibiotics, which suggests the influence of anthropogenic impact at the collection point, which has a considerable number of buildings around, that can contribute to the emergence of antibiotic-resistant strains. CLEP 00370 was isolated at the most damaged point at Carioca River and presented the second higher CIM values to penicillin, doxycycline, cefotaxime, and ampicillin antibiotics, corroborating with the hypothesis that the contamination by human action can influence the profile of antimicrobials susceptibility. Considering the impact of leptospirosis on the One Health approach, our results confirm the importance of investigating the presence of *Leptospira* spp. in the environment, which represents the main source of contamination for man and animals.

Keywords: *Leptospira* spp.; taxonomy; environment; antimicrobial susceptibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore filogenética baseada na sequência do gene <i>ppk</i> para avaliar a diversidade dentro do gênero <i>Leptospira</i> .....	17
Figura 2	Iconografia da praia do Carioca, representação do ano de 1565. Atual bairro do Flamengo.....	31
Figura 3	Antigo Chafariz do Rio Carioca (Largo da Carioca) .....	32
Figura 4	Aqueduto do Carioca e convento de Sta. Teresa.....	33
Figura 5	Reservatório do Carioca.....	34
Figura 6	Percurso atual do Rio Carioca-RJ. Destaque para os hospitais próximos ao rio e a Unidade de Tratamento de Rio instalada próxima a foz.....	35
Figura 7	Percurso atual do Rio Carioca. Início Floresta da Tijuca (nascente), seguindo a Rua Cosme Velho, Rua das Laranjeiras, Rua Ipiranga, Rua Conde de Baependi, Praça José de Alencar, Rua Barão do Flamengo, avança pela Unidade de Tratamento de Rio-Flamengo (UTR-Flamengo) e deságua na praia do Flamengo.....	36
Figura 8	Mapa dos locais de amostragem na Sub Bacia do Rio Carioca – RJ, nos locais onde o rio corre a céu aberto.....	40
Figura 9	Pontos onde as amostras de água do Rio Carioca foram coletadas...	41
Figura 10	Esquema da placa de microaglutinação indicando a diluição seriada dos antissoros de referência - etapa da titulação.....	44
Figura 11	Imagem representativa da visualização de aglutinação ao microscópio de campo escuro.....	45
Figura 12	Esquema de montagem das placas para a técnica de microdiluição incluindo controles negativos, a cepa controle (RGA) e a cepa teste, com diluições seriadas dos antibióticos.....	52
Figura 13	Árvore filogenética do gênero <i>Leptospira</i> baseado no sequenciamento do gene <i>ppk</i> contendo 68 espécies descritas.....	62
Figura 14	Placa de microdiluição testando a cepa CLEP00366 contra o antibiótico doxiciclina, após incubação com AlamarBlue® .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização sorológica e molecular dos isolados ambientais obtidos no Rio Carioca e pesquisa dos genes de patogenicidade <i>flaB</i> e <i>lipL41</i> .....	59
Tabela 2	Resultado do sequenciamento genômico baseado nos genes <i>rrs</i> e <i>ppk</i> , revelando maior capacidade discriminatória deste último gene.....	61
Tabela 3	Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cepas em estudo com os principais antimicrobianos utilizados no tratamento da leptospirose, na faixa de concentração de 25µg/mL a 0,01 µg/mL.....	65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1	ETIOLOGIA.....	15
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEPTOSPIROSE .....	18
2.3	PATOGÊNESE.....	19
2.4	LEPTOSPIRAS E O AMBIENTE.....	20
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	21
<b>2.5.1</b>	<b>Metodologias utilizadas na fase de leptospiremia</b> .....	21
2.5.1.1	Cultivo.....	21
2.5.1.2	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase chain reaction</i> - PCR).....	22
<b>2.5.2</b>	<b>Metodologias utilizadas na fase imune</b> .....	24
2.5.2.1	Testes sorológicos.....	24
2.5.2.1.1	<i>Teste de Aglutinação Microscópica (MAT, do inglês, Microscopic Agglutination Test)</i> .....	24
2.5.2.1.2	<i>Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</i> .....	25
2.5.2.1.3	<i>Teste rápido</i> .....	26
2.6	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO.....	26
2.7	TRATAMENTO E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANA.....	27
2.8	LEPTOSPIROSE E A URBANIZAÇÃO.....	28
<b>2.8.1</b>	<b>Leptospirese no âmbito da Saúde Única</b> .....	29
2.9	RIO CARIOCA.....	30
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
4.1	GERAL.....	38
4.2	ESPECÍFICOS.....	38
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
5.1	ARTIGO DE REVISÃO.....	39
5.2	COLETA DAS AMOSTRAS NA SUB BACIA DO RIO CARIOCA – RJ.....	39
5.3	ISOLAMENTO DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. A PARTIR DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	42

5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	43
5.4.1	<b>Identificação sorológica.....</b>	43
5.4.2	<b>Identificação molecular.....</b>	45
5.5	DETECÇÃO DE MARCADORES DE PATOGENICIDADE.....	47
5.6	AVALIAÇÃO DO GENE <i>PPK</i> COMO MARCADOR MOLECULAR DE IDENTIDADE.....	48
5.7	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	50
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	54
6.1	ARTIGO DE REVISÃO.....	54
6.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DO GÊNERO <i>LEPTOSPIRA</i> .....	56
6.2.1	<b>Identificação sorológica.....</b>	57
6.2.2	<b>Identificação molecular e marcadores de patogenicidade.....</b>	58
6.3	AVALIAÇÃO DO GENE <i>PPK</i> NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>LEPTOSPIRA</i> SP. ....	60
6.4	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO	63
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	69
8	<b>DESAFIOS E PERSPECTIVAS.....</b>	71
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	72
	<b>ANEXO .....</b>	80

## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das zoonoses de maior distribuição geográfica presente em praticamente todo o planeta. Estima-se que a cada ano ocorram 1 milhão de casos e cerca de 60 mil mortes, o que torna esta doença uma das zoonoses mais prevalentes no mundo (COSTA et al., 2015). Além disso, dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, no período de 2007 a 2021, foram registrados 52.399 casos confirmados de leptospirose humana e 4.721 óbitos, sendo notificada a maior incidência da doença, nas regiões Sul e Sudeste (BRASIL, 2022).

A doença é causada por espiroquetas patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*, do qual já foram descritas 68 espécies através do sequenciamento genômico (FERNANDES et al., 2022) e mais de 300 sorovares baseado na reatividade dos antígenos de superfície com soros específicos, sendo o Lipopolissacarídeo (LPS) o antígeno mais abundante na membrana externa desse microrganismo e responsável por essa diversidade (MARQUEZ et al., 2017; GUERNIER, et al., 2018).

A leptospirose em humanos pode se manifestar de forma leve ou moderada (anicterica), grave (ictérica) e pode levar ao óbito no caso das formas mais graves, como a síndrome de Weil e a forma pulmonar hemorrágica (FAINE et al., 1999). A manifestação pulmonar pode ocorrer tanto nas formas ictéricas como nas anictéricas, mesmo na ausência de comprometimento renal, uma vez que esta forma grave evolui rapidamente para o óbito (PEREIRA et al., 2007). O período de incubação é bem variado (2 a 30 dias) e os sintomas iniciais são semelhantes à síndromes gripais, mas também se confundem com doenças como febre amarela, dengue, malária, hantavirose e hepatites, dificultando o diagnóstico clínico (FAINE et al., 1999; RAMOS et al., 2021).

No Brasil, a doença humana é endêmica e torna-se epidêmica nas estações chuvosas, quando podem ocorrer enchentes, sobretudo em cidades com condições inadequadas de saneamento básico, como esgoto a céu aberto e lixões, que propiciam a contaminação da água com urina de roedores, principalmente o *Rattus norvegicus* (ratazanas), de modo que o ambiente contaminado é a principal fonte de infecção indireta para o homem e outros mamíferos (GRACIE et al, 2014; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018).

O diagnóstico da leptospirose é baseado principalmente no teste sorológico pela reação de microaglutinação denominado teste de aglutinação microscópica ou MAT (do inglês *Microscopic Agglutination Test*), que é a técnica reconhecida como padrão ouro pela

Organização Mundial da Saúde (OMS), por ter alta sensibilidade e especificidade, preconizada pelo Ministério da Saúde, porém é limitada a Centros de Referência (WHO/ILS, 2003). Outra técnica importante para o diagnóstico da doença é a reação da polimerase em cadeia ou PCR (do inglês - *Polymerase Chain Reaction*), que tem sido utilizada para a detecção precoce de *Leptospira* spp. a partir de amostras clínicas. Esse método pode ser realizado na fase aguda da doença, o que é crucial para que a terapia antimicrobiana seja administrada de forma precoce e eficaz (WHO/ILS, 2003). A detecção de leptospirosas patogênicas é baseada em genes alvo como *lfb1*, *lipL32*, *lipL41* e *flaB*, os quais são encontrados apenas em cepas patogênicas de *Leptospira*, de modo que o DNA de outros espiroquetas não são amplificados, garantindo especificidade na reação (KAWABATA et al., 2001; AHMED et al, 2006; GALLOWAY, HOFFMASTER, 2015; WAGGONER, PINSKY, 2016).

Quanto ao tratamento da leptospirose, recomenda-se que a antibioticoterapia seja iniciada preferencialmente antes do quinto dia após o início dos sintomas, a fim de prevenir a evolução para as formas mais graves da doença, reduzindo a chance de letalidade (WHO/ILS, 2003). Penicilina e doxiciclina são os fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento da doença, mas outras classes de antimicrobianos como as cefalosporinas de 3ª geração têm sido empregadas (HAAKE, LEVETT, 2015; TROTT, 2018). Os dados relacionados à susceptibilidade das leptospirosas aos antibióticos são escassos, devido principalmente às dificuldades envolvidas no isolamento de amostras biológicas e seu crescimento em meios sólidos, além de haver poucos dados sobre a evidência de resistência antimicrobiana significativa para o gênero *Leptospira* (PICARDEAU, 2018; TROTT, 2018).

No âmbito das vigilâncias epidemiológica e ambiental, o estudo do perfil de cepas de *Leptospira* circulantes no ambiente urbano contribui com informações importantes a respeito das características do agente etiológico e dos riscos de exposição, o que pode auxiliar na avaliação não apenas da doença, mas também dos fatores de risco ambientais, visando medidas de prevenção (BARCELLOS, QUITÉRIO, 2006). Em adição, destaca-se a importância da investigação a respeito de possíveis cepas resistentes aos tratamentos convencionais utilizados na leptospirose humana (HAAKE, LEVETT, 2015; MIRAGLIA et al., 2013). Diversos estudos têm focado no ambiente como importante fonte de contaminação, tanto nas áreas urbanas quanto nas rurais (SAITO et al., 2013; RIEDIGER et al., 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018) o que foi evidenciado mais recentemente por Casanovas- Massana e colaboradores (2020) que isolaram e identificaram, a partir de fontes ambientais, duas novas espécies de

*Leptospira*, as quais foram classificadas como patogênicas, fortalecendo a necessidade de maior investigação acerca deste tema.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ETIOLOGIA

O agente etiológico da leptospirose pertence ao gênero *Leptospira*, que compreende um grupo heterogêneo de espécies patogênicas e saprófitas de bactérias espiraladas.

Morfologicamente são espiroquetas que exibem uma forma em espiral longa, fina (0.1 a 0.2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 6-20  $\mu\text{m}$  de comprimento) e flexível, sendo altamente móveis e apresentando geralmente, uma ou ambas as extremidades em forma de gancho (ADLER, 2010).

São bactérias aeróbias obrigatórias, com crescimento fastidioso *in vitro* e podem ser cultivadas em meios líquidos, semi-sólidos e sólidos, sendo o meio Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris (EMJH) o mais frequentemente utilizado. A temperatura ideal para o cultivo situa-se na faixa de 28-30°C e o tempo de geração em cultura ou em modelos animais é de 6 a 8 horas (FAINE et al., 1999).

As leptospiras apresentam dois flagelos situados no periplasma que são responsáveis pela motilidade e compostos pelas proteínas FlaA e FlaB (ADLER, 2010). Esta bactéria apresenta uma estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede de peptidoglicano estão intimamente associadas e envolvidas pela membrana externa. Nesta estrutura o LPS constitui o principal antígeno de *Leptospira*, o qual apresenta uma baixa toxicidade para células animais, quando comparado ao LPS das bactérias Gram-negativas (ADLER, 2010). Isto ocorre porque o LPS das leptospiras difere da macromolécula tipicamente encontrada nas Gram-negativas no que diz respeito às atividades biológicas, propriedade que possivelmente está relacionada com a estrutura única do Lipídio A do gênero *Leptospira* (HAAKE, LEVETT, 2015). Outras estruturas presentes na membrana externa são as lipoproteínas (LipL32, LipL21, LipL41, por exemplo), proteínas integrais de membrana e sistemas protéicos de secreção (T2SS, por exemplo) (MARQUEZ et al., 2017).

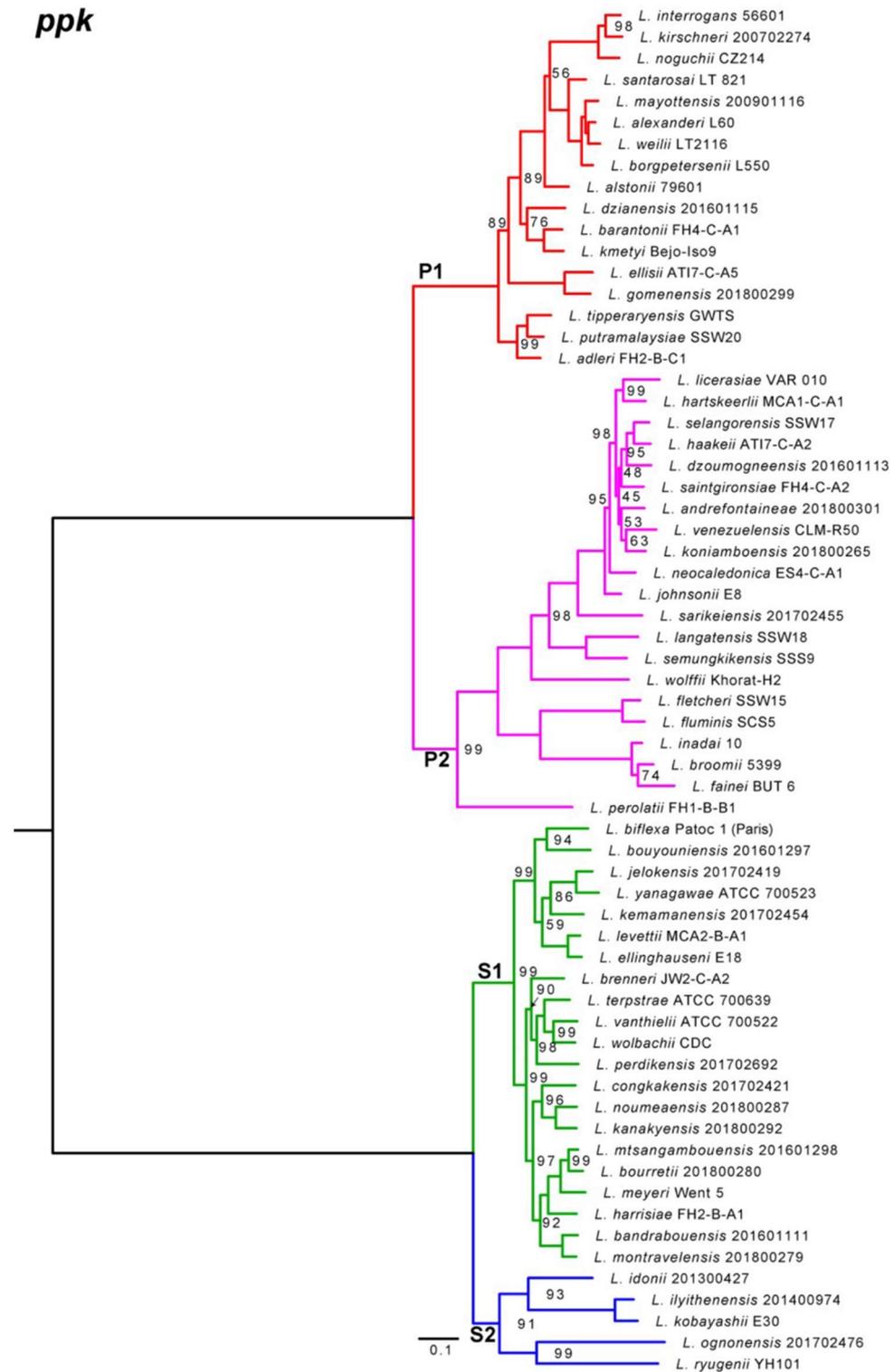
Desde 1907, após sua descrição original por Stimson, o gênero *Leptospira* foi dividido tradicionalmente em dois grupos: saprófitas (*Leptospira biflexa*) e patogênicas (*Leptospira interrogans*). O conceito evoluiu e essas duas espécies foram submetidas a dois esquemas de classificação, um baseado na sorologia, onde o sorovar representa a unidade taxonômica básica e outro baseado na análise do DNA, o qual utiliza a taxonomia molecular para identificar espécies (MARQUEZ et al., 2017).

A classificação sorológica baseia-se na reatividade de antígenos de superfície contra anticorpos específicos, sendo o LPS, o antígeno responsável pela diversidade entre os sorovares (MARQUEZ et al., 2017). Por essa classificação já foram identificados mais de 300 sorovares, sendo a maioria patogênicos, agrupados em quase 30 sorogrupos, utilizando o Teste de Aglutinação Microscópica e o Teste de Aglutinação-Absorção Cruzada (GUERNIER, et al., 2018).

Esquemas de classificação molecular identificaram e nomearam 35 espécies de *Leptospira* spp., envolvendo estudos em análise filogenética e considerando o nível de patogenicidade de cada espécie: saprófitas - presentes no ambiente e não causam infecção; intermediárias - possuem baixa virulência e estão relacionadas à doença branda; patogênicas - virulentas e causam infecção (GOARANT, 2016).

Estudos baseados em genômica comparativa revelaram a existência de 68 espécies (FERNANDES et al., 2022), a partir de um novo esquema de classificação proposto por Vincent e colaboradores (2019), que divide o gênero *Leptospira* em dois clados principais: saprófitas e patogênicas (inclui espécies responsáveis por doença em homens e animais e espécies ambientais que ainda não tiveram sua virulência elucidada). Estes clados são subdivididos em quatro sub-clados: P1: espécies patogênicas; P2: anteriormente descritas no grupo intermediário, capazes de desenvolver a doença de forma branda; S1: espécies anteriormente classificadas no grupo saprófita; S2: espécies incapazes de estabelecer o processo infeccioso em modelos animais, porém exibem características de crescimento *in vitro* similares a espécies patogênicas (Figura 1).

Figura 1. Árvore filogenética baseada na sequência do gene *ppk* para avaliar a diversidade dentro do gênero *Leptospira*.



Fonte: Vincent et al, 2019

A grande questão concernente à taxonomia em *Leptospira* é que não há correlação entre as classificações sorológica e genética, uma vez que muitos sorovares são compartilhados por diferentes espécies, podendo um mesmo sorovar ser agrupado em duas ou mais espécies diferentes, sejam eles patogênicos ou não, caracterizando a complexidade deste gênero bacteriano (CAIMI, RUYBAL, 2020). Contudo, independente das dificuldades inerentes à taxonomia do gênero *Leptospira*, a identificação de novos isolados contribui para o conhecimento de um determinado sorovar ou espécie circulante, o que é de suma importância para a vigilância epidemiológica daquela região (GOARANT, 2016).

## 2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEPTOSPIROSE

A infecção por bactérias do gênero *Leptospira* pode ser assintomática ou produzir uma ampla variedade de sinais e sintomas que se confundem com outras doenças febris (FAINE et al., 1999). Evidências sorológicas de infecção são encontradas em 15 a 40% dos indivíduos que foram expostos, mas não desenvolveram a doença (FAINE et al., 1999). Nos casos sintomáticos de leptospirose, as manifestações clínicas variam de leve a moderada ou grave, podendo ser fatais. Mais de 90% dos indivíduos sintomáticos apresentam a forma mais branda e, geralmente, anictérica, enquanto a forma grave com icterícia ocorre em 5 a 10% dos pacientes infectados (WHO, 2003).

A forma grave da doença, com danos sistêmicos que incluem injúria vascular, hepática, renal, pulmonar e músculo-esquelética, é conhecida como a Síndrome de Weil (DE BRITO et al., 2018). O período de incubação é de uma a duas semanas, podendo variar de 2 a 30 dias. Nesses casos, a leptospirose em humanos apresenta um caráter bifásico, mas a distinção entre a primeira e a segunda fase nem sempre é tão evidente. A primeira fase, ou fase de bacteremia, corresponde à disseminação das bactérias no sangue e em outros líquidos corporais, com duração de 4 a 7 dias. A segunda fase, ou fase imune inicia-se com o aparecimento de anticorpos e posterior eliminação das bactérias na urina de forma intermitente, tendo duração de 10 a 30 dias (BHARTI et al., 2003; RAMOS et al., 2021).

Além da Síndrome de Weil, foi caracterizada uma manifestação ainda mais grave, a síndrome de hemorragia pulmonar, que é caracterizada por lesão pulmonar aguda e sangramento pulmonar maciço, sendo cada vez mais reconhecida no Brasil como uma manifestação distinta e importante da leptospirose (BRASIL, 2014). Uma outra manifestação não tão comum, mas relevante, é a meningite, que envolve o comprometimento neurológico,

geralmente negligenciado na clínica médica em sua relação com a leptospirose (ROMERO,BLANCO, YASUDA, 2010). Enquanto a letalidade geral para os casos de leptospirose notificados no Brasil é de 10%, a letalidade para os pacientes que desenvolvem hemorragia pulmonar é maior que 50% (BRASIL, 2014).

### 2.3 PATOGÊNESE

A primeira etapa na patogênese da leptospirose é a penetração bacteriana através da barreira tecidual, que é facilitada por abrasões na pele e pelo contato direto com as mucosas da conjuntiva ou cavidade oral (HAAKE, LEVETT, 2015). Nos períodos chuvosos onde ocorre a imersão prolongada em águas de enchentes ou até mesmo nas atividades recreativas aquáticas, o contato com águas contaminadas torna-se um fator de risco para infecção, principalmente pela exposição das mucosas (LEVETT, 2001).

A segunda etapa na patogênese é a disseminação do microrganismo através da corrente sanguínea. Após atravessar a pele, leptospiros patogênicas seguem pela circulação sanguínea e persistem nesta via durante a fase de leptospiremia (bacteremia), diferente de outras espiroquetas patogênicas como *Borrelia burgdorferi* e *Treponema pallidum*, as quais estabelecem a infecção na pele (HAAKE, LEVETT, 2015).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da leptospirose podem ser relacionados tanto aos efeitos diretos das leptospiros no hospedeiro, quanto à resposta imune à infecção. A severidade da doença é influenciada por ambos, hospedeiro e patógeno, mas este último, em particular, pode expressar diferentes fatores de virulência que modulam tanto a severidade, quanto a progressão da doença (PICARDEAU, 2017).

Um mecanismo importante de virulência é a motilidade, que permite a migração dessas bactérias através de meios viscosos, sendo importante no início da infecção e na sua disseminação desde o sítio de entrada até os alvos dentro do hospedeiro (RAMOS et al., 2021). A adesão, outro mecanismo de virulência importante, permite que as leptospiros, ao saírem da circulação para os tecidos, possam se ligar e penetrar nas células por meio de componentes expostos da matriz extracelular. Embora as leptospiros sejam consideradas patógenos extracelulares, podem sobreviver e até se multiplicar nas células hospedeiras, demonstrando sua característica transitoriamente intracelular (LI et al., 2010).

## 2.4 LEPTOSPIRAS E O AMBIENTE

As leptospiiras patogênicas podem colonizar os rins de várias espécies de mamíferos e são eliminadas através da urina diretamente no ambiente, onde sobrevivem por poucas horas a até vários meses, dependendo da espécie, do sorovar e das características físico-químicas do ambiente como pH, temperatura e salinidade (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018). Outro fator relevante é a carga microbiana, ou seja, a quantidade de patógeno liberada no ambiente, pois o risco de infecção humana está relacionado à quantidade de leptospiiras excretadas no ambiente e à probabilidade do contato humano com o local contaminado (BARRAGAN et al., 2017).

Os mecanismos que permitem a persistência de leptospiiras patogênicas em ambientes aquosos, fora do hospedeiro, ainda são pouco conhecidos, assim como os fatores e determinantes ambientais que condicionam essa sobrevivência (BARRAGAN et al., 2017). Alguns estudos demonstraram que o ambiente viscoso favorece a permanência das leptospiiras no solo, tornando-o potencialmente infectante, e como outras espiroquetas, as leptospiiras podem alterar sua morfologia de acordo com as condições ambientais, incluindo agregação celular (BARRAGAN et al., 2011). Ao mesmo tempo, a regulação gênica permite a adaptação do patógeno ao ambiente fora do hospedeiro, facilitando a transição hospedeiro-ambiente (BARRAGAN et al., 2017). Além disso, a formação de biofilme também pode conferir a capacidade de sobrevivência em diversos ambientes, mesmo sob escassez de nutrientes, tanto para as leptospiiras saprófitas quanto para as patogênicas (BIERQUE et al., 2020).

A persistência de cepas virulentas no ambiente exerce um papel importante, pois constitui uma fonte de patógenos potencialmente infectantes naquele local, de modo que, após as fortes chuvas, as leptospiiras virulentas presentes no solo entram em suspensão, juntamente com outras partículas, tornando aquele ambiente aquoso uma fonte de contaminação para o homem e os animais (RAMOS et al., 2021).

Diferentes grupos de pesquisa têm detectado a presença de cepas patogênicas em amostras ambientais (solo e água), tanto de forma direta, através do isolamento de leptospiiras em cultivo (SAITO et al., 2013; CASANOVAS-MASSANA et al., 2020), quanto indiretamente, por meio da detecção do seu DNA (RIEDIGER et al., 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018), confirmando a capacidade de sobrevivência e manutenção deste patógenos sob condições adversas fora do hospedeiro

## 2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A leptospirose não pode ser diagnosticada com base apenas no exame clínico, devido à variabilidade nas manifestações sintomáticas, as quais assemelham-se a outras enfermidades, o que torna necessária a confirmação por meio do diagnóstico laboratorial (WHO/ILS, 2003).

Segundo Adler (2010), o critério para considerar um resultado indicativo de infecção recente por *Leptospira* spp. é aceito como um título  $\geq 400$  na técnica de aglutinação microscópica (MAT, do inglês *Microscopic Agglutination Test*), na presença de sinais clínicos e história epidemiológica, ou pelo aumento de 4 vezes no título entre amostras pareadas.

Nos primeiros dias da doença, o diagnóstico envolve a detecção direta de *Leptospira* spp. em fluidos como sangue e líquido, pelo cultivo em meio específico ou a detecção indireta pela técnica da PCR (do inglês - *Polymerase Chain Reaction*), pois nesta fase inicial, as leptospirosas circulam na corrente sanguínea. A partir da segunda semana, elevam-se os níveis de anticorpos das classes IgM e IgG, aumentando a sensibilidade dos testes sorológicos, sendo a MAT o método padrão-ouro para investigação da leptospirose em humanos e animais, de acordo com a OMS (WHO/ILS,2003).

### 2.5.1 Metodologias utilizadas na fase de leptospiremia

#### 2.5.1.1 Cultivo

Os principais meios de cultura desenvolvidos para o gênero *Leptospira* são o Korthof, Fletcher e Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH), sendo este último o mais utilizado na rotina de isolamento. Com o intuito de minimizar a contaminação do cultivo a partir de amostras clínicas, principalmente nos casos de urina, o quimioterápico 5-Fluorouracil pode ser empregado na preparação dos meios (JOHSON, ROGERS, 1964). Uma alternativa para potencializar a inibição de contaminantes, principalmente bactérias Gram-negativas e fungos em culturas, é utilizar uma combinação de agentes antimicrobianos (Sulfametoxazol / Trimetoprim / Anfotericina B/ Fosfomicina / 5-Fluorouracil), chamado de STAFF (CHAKRABORTY et al., 2011). Os cultivos em meio semi-sólido são incubados na faixa de 28-30° C, por várias semanas (6 a 8), ao abrigo da luz, sendo regularmente examinados ao microscópio de campo escuro para detecção da espiroqueta. Este exame identifica

características como morfologia e motilidade, de modo que são necessárias outras técnicas para confirmação do gênero bacteriano e para a identificação da cepa isolada (FAINE et al., 1999).

As leptospiros podem ser recuperadas de amostras de sangue, líquido (na fase aguda da doença) e urina (a partir da segunda semana após o início dos sintomas) (WHO/ILS, 2003). A duração da excreção de leptospiros na urina pode ocorrer por semanas, porém é necessário aumentar o pH alcalinizando a amostra, a fim de garantir a viabilidade das bactérias (HAAKE, LEVETT, 2015).

O isolamento de leptospiros a partir de espécimes clínicos é a mais forte evidência para a confirmação do diagnóstico e permite a posterior identificação dos sorovares circulantes em uma determinada região (RAMOS et al., 2021). No entanto, a técnica apresenta algumas desvantagens, dentre elas o crescimento fastidioso (6 a 8 semanas) e a complexidade na identificação, que pode demorar até meses e atrasar consideravelmente o diagnóstico. Um detalhe importante a ser considerado é que a técnica de isolamento deve ser empregada antes de iniciar a terapia antimicrobiana (WHO/ILS, 2003).

A despeito das dificuldades inerentes à técnica de isolamento em meio de cultivo, este é o método que melhor contribuiu para os estudos epidemiológicos da leptospirose (HAAKE, LEVETT, 2015). Com base nessa premissa, diversos estudos têm procurado isolar *Leptospira* spp. em amostras ambientais como água e solo, com o intuito de identificar cepas patogênicas e evidenciar os riscos de contaminação do ecossistema por este patógeno (SAITO et al., 2013; MENY et al., 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2020). Contudo, é preciso considerar a dificuldade no isolamento de cepas patogênicas a partir de amostras ambientais, pois o crescimento excessivo e rápido de outras bactérias, incluindo as leptospiros saprófitas, acaba inibindo o crescimento das cepas patogênicas ou até mesmo mascarando sua presença (BIERQUE et al., 2020, CASANOVAS-MASSANA et al., 2020).

#### 2.5.1.2 Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR)

A PCR tem sido utilizada para a detecção de *Leptospira* spp. a partir de amostras clínicas, objetivando o diagnóstico precoce da leptospirose, o que é crucial para que a terapia antimicrobiana seja administrada de forma eficaz (WHO/ILS, 2003). Atualmente, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, sejam por protocolos convencionais quanto em tempo real (qPCR), são usadas a partir de amostras de sangue total, soro, urina e líquido, e têm como alvo genes específicos tanto para detecção do gênero *Leptospira* (ex: *rrs* e *secY*), quanto para

espécies patogênicas (ex: *lfb1*, *lipL32*, *ligA* e *ligB*) de modo que DNA de outros espiroquetas, como *Borrelia* spp. por exemplo, não são amplificados (WAGGONER, PINSKY, 2016; GALLOWAY, HOFFMASTER, 2015).

Além da pesquisa em amostras clínicas, o gene *lipL32* tem sido utilizado como alvo para detecção das leptospirosas patogênicas em amostras ambientais. A detecção indireta pela técnica molecular aumenta a sensibilidade do método, uma vez que este gene está presente em todas as espécies patogênicas, porém ausente nas espécies intermediárias e saprófitas (RAWLINS et al., 2014). Outros genes alvos podem ser empregados para a detecção de cepas patogênicas de *Leptospira* spp. como o *flaB*, que codifica a proteína flagelar FlaB e o gene *lipL41*, que codifica a lipoproteína de membrana externa LipL41, ambos encontrados apenas em cepas patogênicas (KAWABATA et al, 2001; AHMED et al, 2006).

A técnica de Multiplex PCR é uma derivação do método de PCR e consiste na detecção simultânea de múltiplos alvos (dois ou mais) em uma única reação, com um par diferente de iniciadores e sondas, no caso de qPCR, para cada alvo. Esta técnica oferece maior sensibilidade na detecção dos genes de interesse, permitindo a rápida identificação de cepas patogênicas, para fins de diagnóstico e estudo epidemiológico (SUGATHAN, VARGHESE, 2005; AHMED et al, 2012).

Os métodos moleculares, embora promissores, deparam-se com a dificuldade de acesso às plataformas, principalmente quando se trata de ambientes remotos ou rurais, além da exigência de alto nível técnico para tal metodologia (GOARANT, 2016). Outra limitação do diagnóstico da leptospirose baseado em PCR é a incapacidade de identificar tanto a espécie quanto o sorovar infectante (HAAKE, LEVETT, 2015). Esta informação pode não ser significativa para o tratamento individual do paciente, mas é de grande importância para a vigilância epidemiológica (HAAKE, LEVETT, 2015). Apesar das limitações relacionadas às técnicas moleculares, a demonstração da presença de leptospirosas patogênicas ou de seu DNA, em qualquer um dos fluidos biológicos mencionados anteriormente, permite o diagnóstico precoce, definitivo e correto da leptospirose (GOARANT, 2016).

## 2.5.2 Metodologias utilizadas na fase imune

### 2.5.2.2 Testes sorológicos

Devido à baixa sensibilidade do isolamento de leptospiras em cultura e das dificuldades técnicas encontradas em alguns laboratórios para a realização da PCR, a maioria dos casos de leptospirose são diagnosticados pela sorologia. Na primeira fase da doença, de 5 a 7 dias após o início dos sintomas, os anticorpos da classe IgM já são detectáveis. A partir da segunda semana, ambas as classes IgM e IgG podem ser detectadas pelas técnicas sorológicas (WHO/ILS, 2003).

#### 2.5.2.2.1 *Teste de Aglutinação Microscópica (MAT, do inglês, Microscopic Agglutination Test)*

O MAT é uma técnica baseada na aglutinação antígeno-anticorpo, sendo o teste de referência para o diagnóstico da leptospirose, reconhecido como “Padrão – Ouro” pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta técnica detecta anticorpos de ambas as classes IgM e IgG e determina o título de anticorpos, diferenciando infecção recente de contato prévio (WHO/ILS,2003).

O princípio da técnica é simples e consiste na reação do soro teste com culturas vivas de leptospiras, observando então a formação de aglutinação ao microscópio de campo escuro em duas etapas. Na primeira observa-se apenas a formação de aglutinação e na segunda etapa, os soros são diluídos serialmente para determinação do título (recíproca da diluição). O ponto final de leitura é aquele em que se observa 50% de aglutinação ou de leptospiras livres, quando comparado ao controle do antígeno (sem soro). Utiliza-se uma bateria de antígenos vivos, representantes de 19 diferentes sorovares, recomendados pela OMS (WHO/ILS,2003). Este número é limitado diante da diversidade de sorovares já reconhecidos e pode não contemplar um sorovar desconhecido em uma determinada região. Por este motivo, a cepa saprófita Patoc I (*L. biflexa*) está incluída na bateria de antígenos, pois apresenta reação cruzada com vários sorovares patogênicos (MURRAY et al., 2011).

O MAT não tem a capacidade de identificar o sorovar infectante, uma vez que dentro de um mesmo sorogrupo, todos os sorovares pertencentes a ele podem apresentar títulos similares, caracterizando uma reação inespecífica em nível de sorovar (HAAKE, LEVETT,

2015). Por esta razão, a interpretação do MAT é complexa, em especial na fase aguda da doença, onde ocorre alto grau de reação cruzada entre diferentes sorogrupos, o que difere da fase convalescente, onde observa-se relativa especificidade de sorogrupo (HAAKE, LEVETT, 2015).

Outro ponto a ser considerado é a dificuldade de concluir o diagnóstico da leptospirose pelo MAT na fase inicial da doença, principalmente porque em muitos casos é necessário a análise de uma segunda amostra, coletada num intervalo de pelo menos 7-10 dias, o que se torna um desafio, uma vez que a maioria dos pacientes ambulatoriais não retorna para segunda coleta em caso de melhora clínica (PHILIP et al., 2020). Além disso, os demais testes sorológicos descritos adiante, empregados no diagnóstico laboratorial da leptospirose devem ser comparados a MAT, avaliando os critérios de especificidade e sensibilidade (WHO/ILS, 2003).

#### 2.5.2.2.2 *Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*

A complexidade do teste de MAT leva ao emprego de testes sorológicos mais simples, que podem ser utilizados na fase aguda da doença, permitindo o diagnóstico precoce da leptospirose. ELISA é uma técnica que tem sido amplamente utilizada no diagnóstico da leptospirose, pela detecção dos anticorpos da classe IgM, que tem maior importância quando se trata de amostras coletadas na fase aguda da doença, pois este anticorpo está presente na primeira fase da resposta imune (SOO et al., 2020).

Existem muitos ELISA-IgM comerciais e a maioria deles utiliza a espécie *Leptospira biflexa* (saprófita) para preparação de antígeno, pois apresenta reação cruzada com espécies patogênicas através de antígenos de superfície como o LPS, o que torna possível a detecção de anticorpos gerados contra uma cepa patogênica na amostra clínica (KHAKI et al., 2016). As lipoproteínas recombinantes, como a rLipL32 ou rLigA também foram desenvolvidas como preparação de antígenos para este teste (MARQUEZ et al., 2017).

Além da praticidade e reprodutibilidade, outra vantagem do ELISA é que não requer a manutenção de culturas de antígenos vivos, como na MAT, o que é trabalhoso e de alto custo, restrito a Centros de Referência. Por outro lado, uma grande desvantagem desta técnica é que sozinha, não pode assegurar o diagnóstico final, sendo necessária a confirmação pela MAT (WHO/ILS,2003).

### 2.5.2.2.3 *Teste rápido*

Qualquer esforço no desenvolvimento de um novo kit de diagnóstico rápido para leptospirose é valioso e significativo, pois permite o início do tratamento de forma adequada, oferecendo um bom suporte laboratorial. Os kits de teste rápido para leptospirose disponíveis no mercado também se baseiam na detecção do anticorpo IgM, justificando seu emprego na fase inicial da doença (RAO et al, 2019). Conforme demonstrado por diferentes estudos, esses kits comerciais diferem nos parâmetros de sensibilidade e especificidade, comparados ao ELISA e o MAT, mas ainda são muito úteis como técnicas de diagnóstico rápido, principalmente em áreas com menor infraestrutura e na triagem de muitas amostras (NABITY et al., 2012 e 2018; ALIA et al., 2019).

## 2.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

A técnica de sequenciamento do DNA, consiste basicamente em um conjunto de complexos processos químicos, que têm por finalidade determinar a ordem em que as bases nitrogenadas, Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) e Guanina (G), se dispõem no material genético dos organismos (WATSON, CRICK, 1953).

Um dos métodos de sequenciamento mais utilizados é o chamado “método dideoxy”, ou “Sanger”, idealizado por Frederick Sanger. Este processo é realizado a partir de uma cadeia simples do DNA a ser sequenciado, obtida por desnaturação da molécula nativa, que servirá de molde para gerar a outra metade complementar da dupla hélice (SANGER, et al., 1977).

A estratégia deste método consiste em identificar de forma contínua e sequencial o último nucleotídeo incorporado na extremidade de alongamento da cadeia, que deverá também portar uma “marca” (fluorescência) que permite detectá-lo na etapa de análise (SANTOS et al., 2013). São utilizados os desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) e os dideoxirribonucleotídeos trifosfato (ddNTPs) que diferem pela ausência do grupo 3'-hidroxil na terminação destes últimos. Enquanto a incorporação de um dNTP permite a continuação da cadeia, a incorporação de um ddNTP leva à interrupção do alongamento. Para a identificação da sequência em estudo, os fragmentos de diferentes tamanhos, originados após incorporação dos ddNTPs, são analisados em plataformas de sequenciamento, como a 454 FLX da Roche® e a Solexa da Illumina®, que possuem ampla utilização em todo o mundo (CARVALHO, SILVA, 2010; CASTRIGNANO, 2017).

Apesar de não ser uma técnica corriqueira do diagnóstico laboratorial da leptospirose, o sequenciamento genômico é uma ferramenta que mudou a taxonomia bacteriana, particularmente no caso de bactérias de crescimento fastidioso, como as pertencentes ao gênero *Leptospira* (VINCENT et al, 2019).

Levando em consideração a complexidade taxonômica deste gênero bacteriano, o sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido empregado como principal alvo para identificação molecular em nível de espécie. Embora seja um gene altamente conservado, este permite uma análise comparativa entre as sequências, possibilitando a descrição de novas espécies, principalmente as pertencentes ao subclado P1, incluindo as cepas ambientais, o que amplia a diversidade do gênero *Leptospira* (VINCENT et al, 2019; CASANOVAS-MASSANA et al, 2020; FERNANDES et al, 2022). Contudo, a sua especificidade é muito baixa para definição de espécies pertencentes aos subclados P2, S1 e S2, de modo que pesquisadores avaliaram um outro gene, também conservado dentro do gênero *Leptospira*, o gene *ppk*. Este gene que codifica uma polifosfatase alcalina apresentou maior capacidade discriminatória entre esses subclados, permitindo melhor diferenciação entre as espécies oriundas de amostras ambientais (VINCENT et al., 2019).

## 2.7 TRATAMENTO E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

*Leptospira* spp. são intrinsecamente resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos, incluindo sulfonamidas, neomicina, polimixinas, vancomicina e rifampicina (TROTT, 2018). Por outro lado, podem ser sensíveis a  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e estreptomicinas (HAAKE, LEVETT, 2015).

As recomendações para o tratamento da leptospirose humana permanecem na utilização de penicilina, ampicilina, ceftriaxona ou cefotaxima. Drogas alternativas para os casos de alergia ou em ambientes não hospitalares incluem doxiciclina ou azitromicina, ambos por via oral (TROTT, 2018).

Como já descrito, os sintomas iniciais da doença são comuns a outras patologias e os testes laboratoriais são limitados, incluindo a identificação do agente infectante, cujo resultado varia de 6 a 8 semanas, período no qual o uso de antibióticos pode não ser eficaz (FAINE et al., 1999; WHO/ILS, 2003). Por isso, o tratamento da leptospirose com antibióticos padrão deve ser iniciado quando há suspeita clínica da doença, preferencialmente antes do quinto dia após

início dos sintomas, embora muitos clínicos decidam adotar esta medida, independente do relato do início dos sintomas (WHO/ILS, 2003).

Com relação aos testes de susceptibilidade das leptospiras aos antimicrobianos, não há padronização pelo CLSI (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*) e EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), além das dificuldades que incluem longo período de incubação (7-14 dias), uso de meios suplementados com soro e dificuldades na quantificação do crescimento em meios sólidos, o que limita o desenvolvimento e padronização destes testes (HAAKE, LEVETT, 2015). Apesar de não haver padronização por órgãos oficiais, Murray e Hospenthal (2004) padronizaram a técnica de microdiluição a fim de selecionar antibióticos para o tratamento da leptospirose. Neste teste, foi determinado que a CIM (concentração mínima inibitória) para os antibióticos de escolha no tratamento da leptospirose como Penicilina G e Doxiciclina deveriam ser mais altos do que para eritromicina, cefalosporinas e fluoroquinolonas (MURRAY, HOSPENTHAL, 2004; RESSNER et al., 2008).

Estes estudos revelaram a eficácia do método da microdiluição, o qual facilita a avaliação de um grande número de isolados, frente a uma variedade de agentes antimicrobianos, contribuindo para a identificação de possíveis cepas resistentes, uma vez que este tema é pouco explorado (BENACER et al, 2017; LIEGEON, DELORY, PICARDEAU, 2018; TROTT, 2018).

## 2.8 LEPTOSPIROSE E A URBANIZAÇÃO

Embora a leptospirose em alguns países seja associada às atividades ocupacionais, principalmente nas áreas rurais (atividades pastoris), no Brasil o cenário apresenta-se de forma diferente. O êxodo rural resultou na ocupação desordenada das cidades, propiciando o surgimento dos problemas relacionados à organização desta ocupação, como alta aglomeração populacional de baixa renda próximo a córregos e riachos, saneamento básico inadequado ou ausente, além da infestação de roedores (VASCONCELOS et al., 2012).

Associado ao processo de urbanização desenfreada, está o crescimento populacional sem planejamento, o qual, desde o período da Revolução Industrial, promoveu o inchaço das cidades que não estavam preparadas para este evento. Isto levou ao surgimento das favelas nas áreas sem estrutura habitacional, sujeitas a condições de risco, além das epidemias associadas à falta de higiene e serviços sanitários (REIS et al., 2012; GRACIE et al, 2014). A intensa transformação demográfica sofrida pelo Brasil, devido à migração das áreas rurais, ocorreu

entre 1960 e 1996, indicando um aumento de 350% na população urbana, contribuindo para o surgimento das favelas (KO et al., 1999).

A cidade do Rio de Janeiro, com mais de 6 milhões de habitantes, apresenta características de ocupação urbana desordenada e condições inadequadas de moradia, o que amplia a proximidade entre o agente transmissor da leptospirose, os reservatórios e a população susceptível (OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, segundo Carrijo (2008), a transmissão desta zoonose no município estaria relacionada com a estrutura social e espacial da cidade, onde se observa maior vulnerabilidade da população que reside nas áreas desordenadas, sob uma infraestrutura urbana precária e áreas sujeitas a inundações. Nestes locais, a grande quantidade de água após fortes chuvas sobrecarrega o sistema de esgoto, aumentando o risco de contato humano com a água contaminada, além de facilitar a dispersão e persistência das leptospiras no ambiente (BARRAGAN et al., 2017).

### **2.8.1 Leptospirose no âmbito da Saúde Única**

Um conceito pertinente na atualidade é o da Saúde Única (One Health), que tem atraído a atenção de diversos segmentos, como os profissionais da saúde, economistas, pesquisadores e ambientalistas, mostrando a necessidade de integração de ambos os setores público e privado, para promover a conscientização a respeito das mudanças a serem adotadas, para melhoria na qualidade de vida (SILVESTRINI, HEINEMANN, DE CASTRO, 2019). Este conceito traduz as conexões entre a tríade “humanos, animais e ambiente”, o que pode ser compreendido ao observarmos o espaço em que vivemos, uma vez que as alterações ambientais, derivadas da atividade humana (ex: desmatamento, mudanças climáticas, poluição, urbanização desordenada) modificam a distribuição, diversidade e abundância de mosquitos e outros vetores de diferentes patógenos, conseqüentemente aumentando o risco de doenças (ELLWANGER, CHIES, 2022).

Entre as doenças que surgiram das relações contemporâneas entre o ser humano, os animais e o ambiente que os circundam estão as zoonoses, que correspondem às enfermidades transmissíveis entre os animais vertebrados e o homem (SILVESTRINI, HEINEMANN, DE CASTRO, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal, cerca de 70% das doenças humanas emergentes do último século são zoonoses, dentre elas, a leptospirose, uma doença característica de países tropicais e subtropicais, favorecida pela onda de calor e pela incidência

de chuvas, especialmente no verão, levando ao aumento do número de casos (ELLWANGER, CHIES, 2022).

Portanto, o conceito de Saúde Única baseia-se na consciência das principais oportunidades que existem para proteger a saúde pública, através de políticas destinadas a prevenir e controlar patógenos ao nível das populações animais, considerando a interface entre humanos, animais e o meio ambiente. Além disso, é preciso haver a conscientização de melhoria da infraestrutura das cidades, promovendo as condições necessárias para sustentar o pleno relacionamento entre os seres humanos e os animais à luz da Saúde Única. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de políticas públicas preventivas, através de ferramentas para promoção da saúde nas grandes cidades, com atenção às populações mais vulneráveis (PEGORARO et al., 2018; DE SOUZA SUGUIURA, 2019).

## 2.9 RIO CARIOCA

Os rios sempre estiveram intimamente relacionados com a evolução da humanidade, participando de sua história. Para melhor compreensão deste conceito, podemos observar o surgimento das vilas, cidades e regiões que foram se organizando ao longo do curso de inúmeros rios. Todavia, a expansão territorial muitas vezes desordenada, associada às diferentes tecnologias que moldaram as sociedades ao longo dos anos, possibilitaram alterações tanto no curso dos rios como também na qualidade de suas águas (GASTEZZI-ARIAS, ALVARADO-GARCIA, PÉREZ-GOMES, 2017). O Rio Carioca, importantíssimo no passado do Rio de Janeiro, pode ser um claro exemplo dos impactos das ações antrópicas no ambiente.

O Rio Carioca, pertencente à Bacia da Baía de Guanabara (trecho Oeste), no município do Rio de Janeiro, participante constante da história de urbanização da cidade, foi explorado pelos primeiros habitantes da bacia do Carioca (Figura 2), os índios Tamoios. Estes nativos mantinham uma relação mística com as águas do Rio Carioca, acreditando que suas águas eram sagradas. Para eles, quem bebesse da água teria boa voz para cantar, beleza realçada para as mulheres que se banhavam e recuperação do vigor perdido para os homens (DA SILVA, DE ARAUJO, DE SEIXAS FILHO, 2016).

Figura 2. Iconografia da praia do Carioca, representação do ano de 1565. Atual bairro do Flamengo.

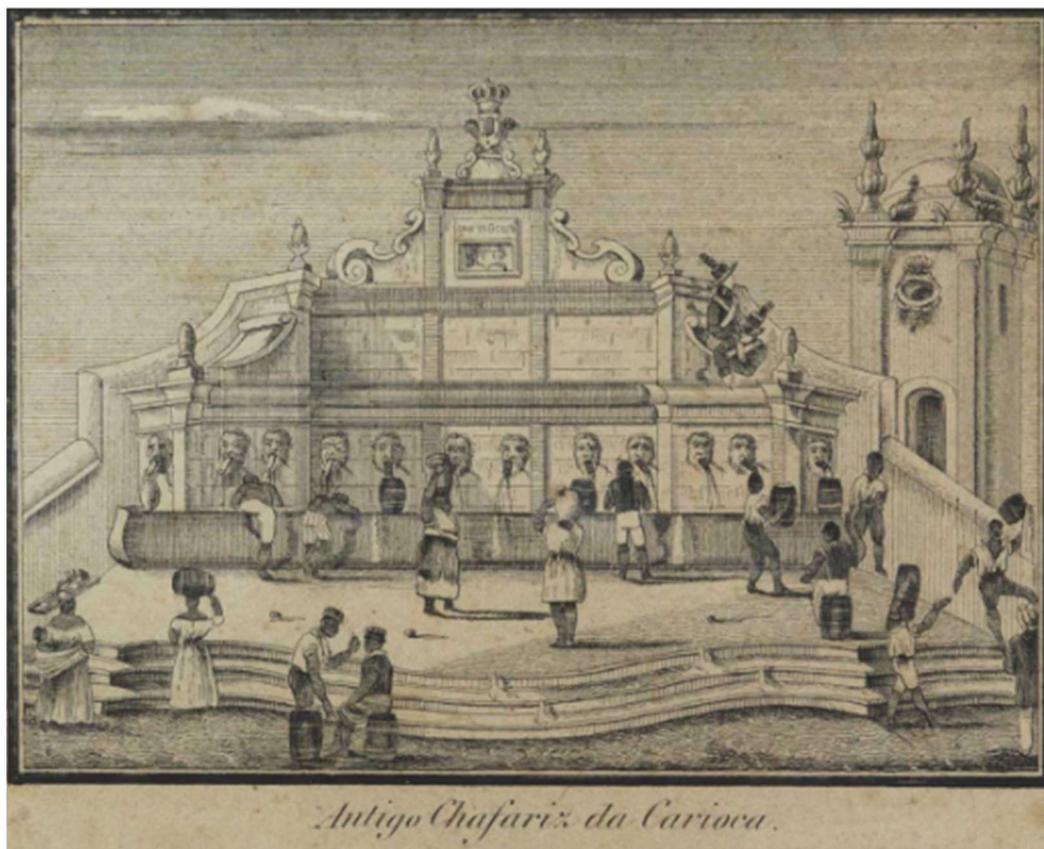


Fonte: CÉZAR, 2016.

Após a chegada dos portugueses, no ano de 1502, o Rio Carioca passou por diversas transformações, tanto em seu percurso quanto na qualidade de suas águas. Segundo Da Silva, De Araujo e De Seixas Filho (2016), ele era um dos principais cursos d'água utilizado para o abastecimento da cidade durante o século XVIII, porém havia dificuldade na obtenção de suas águas, sendo necessário percorrer longos caminhos até sua foz ou solicitar um escravo aguadeiro, que tinha como função coletar a água e levar até o centro da cidade, o que demonstra a participação do Rio Carioca no estabelecimento da cidade do Rio de Janeiro. Além disso, este rio era também denominado de “Aguada dos Marinheiros”, pois era um dos locais em que os marinheiros se proviam de água (DELGADO, 1990).

Com a expansão da cidade, em 1703, o Rio foi desviado para a construção de um chafariz no centro da cidade (Figura 3), passando a denominar-se de Largo da Carioca.

Figura 3. Antigo Chafariz do Rio Carioca (Largo da Carioca).



Fonte: <https://riomemorias.com.br/memoria/arcos-da-lapa/>

Desde então, inúmeras alterações foram sendo implementadas em seu curso. No decorrer dos séculos XVII ao XVIII, a região da bacia do Carioca era composta por inúmeras chácaras, no qual os escravos pertencentes a estas utilizavam as águas do Rio Carioca para o descarte de resíduos e dejetos animais e humanos. Essas ações têm lugar no processo histórico de degradação da qualidade das águas deste manancial (SCHLEE, CAVALCANTI, TAMMINGA 2007; DA SILVA, DE ARAUJO, DE SEIXAS FILHO, 2016).

Em 1719, obras de saneamento viabilizaram a construção de um importante aqueduto que conduzia as águas do Rio Carioca até alguns chafarizes que estavam espalhados pela cidade do Rio de Janeiro. O aqueduto do Carioca foi inaugurado em 1723, sendo atualmente conhecido como Arcos da Lapa (FRANCA, 2007; DA SILVA, DE ARAUJO, DE SEIXAS FILHO, 2016) e findava na Lagoa do Boqueirão à sua frente (Figura 4).

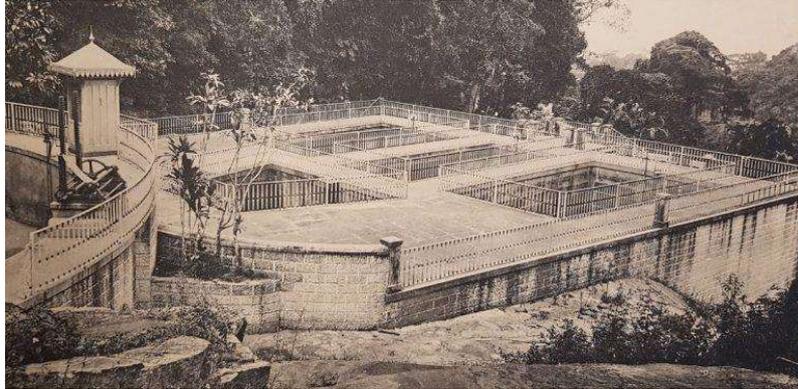
Figura 4. Aqueduto do Carioca e convento de Sta. Teresa.



Fonte: Pintura de Leandro Joaquim - Museu Histórico Nacional

Posteriormente, após sucessivos aterros, a Lagoa deu lugar ao Jardim do Passeio Público (1779-1783) (DIAS, ROSSO, GIORDANO, 2012). Dentro do percurso do Rio Carioca, mais especificamente no bairro de Santa Tereza, foi instalado em 1865, o reservatório do Carioca (Figura 5), considerado a mais importante fonte coletiva para coleta de água, com 675 mil litros, sendo composto de uma caixa de passagem denominada Caixa da Mãe D'Água, jardins na parte frontal, três reservatórios a céu aberto denominados Caixas do Carioca, o tanque de decantação e a barragem (FRANCA, 2007; PARQUE NACIONAL DA TIJUCA, 2020). Devido seu valor histórico, o sítio do Reservatório do Carioca foi tombado em 1998 pelo Instituto Estadual do Patrimônio Cultural-INEPAC, ao passo que o Rio Carioca foi tombado em janeiro de 2019, fato até então inédito para um curso urbano (INEPAC, 2019).

Figura 5. Reservatório do Carioca.

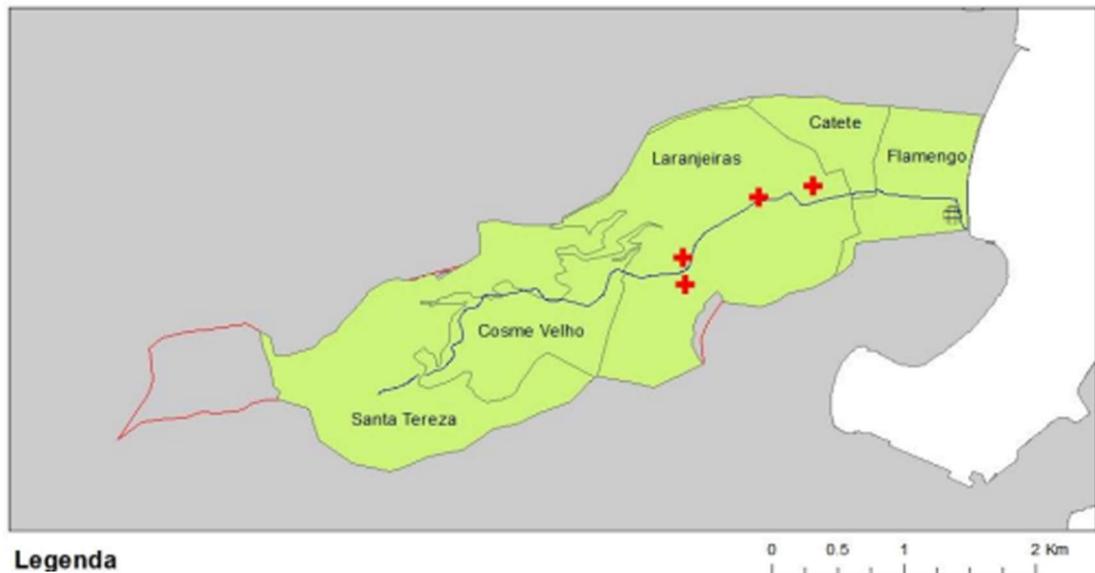


Fonte: Parque Nacional da Tijuca, 2020

De acordo com Reboisson (2016), objetivando o desenvolvimento imobiliário da região, com a chegada do século XX, novos moradores foram se instalando no bairro das Laranjeiras e pleitearam junto à Câmara dos vereadores a canalização do Rio Carioca.

Atualmente, grande parte de seu percurso corre por via subterrânea através de diversos bairros (DA SILVA, DE ARAUJO, DE SEIXAS FILHO, 2016). Sua trajetória passa próximo a hospitais, comércios e residências, que contribuem para a redução da qualidade de suas águas (SILVA, 2021) (Figura 6).

Figura 6. Percurso atual do Rio Carioca-RJ. Destaque para os hospitais próximos ao rio e a Unidade de Tratamento de Rio instalada próxima a foz



.Fonte: SILVA, 2021.

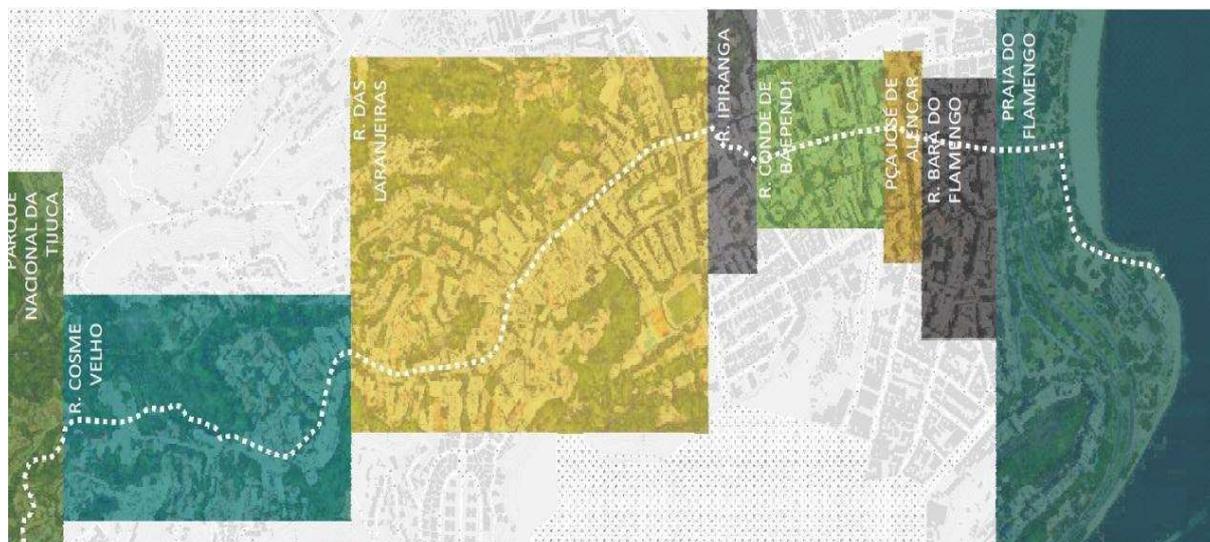
### Legenda

- Estação de Tratamento de Efluente Flamengo
- Hospitais
- Rio Carioca
- Bairros do Rio Carioca
- Sub Bacia do Rio Carioca



O percurso atual do Rio Carioca (Figuras 6 e 7), se inicia na sua nascente, situada em uma área de preservação ambiental, na Floresta da Tijuca, percorre a Rua Cosme Velho, adentra a Rua das Laranjeiras, passa pela Rua Ipiranga, Rua Conde de Baependi, posteriormente passa brevemente pela Praça José de Alencar, Rua Barão do Flamengo, em seguida avança pela Unidade de Tratamento de Rio-Flamengo (UTR-Flamengo) e, por fim, deságua na praia do Flamengo (Figura 7) (REBOISSON, 2016; DE ARAÚJO et al., 2016).

Figura 7. Percurso atual do Rio Carioca. Início Floresta da Tijuca (nascente), seguindo a Rua Cosme Velho, Rua das Laranjeiras, Rua Ipiranga, Rua Conde de Baependi, Praça José de Alencar, Rua Barão do Flamengo, avança pela Unidade de Tratamento de Rio-Flamengo (UTR-Flamengo) e deságua na praia do Flamengo.



Fonte: Reboisson, 2016.

Segundo Dias e colaboradores (2012), foi estabelecida em 1992, pela Prefeitura, uma galeria de cintura (parte subterrânea e parte aberta) modificando o curso final do rio, com o objetivo de minimizar o aporte de águas poluídas na praia e melhorar as condições de balneabilidade. As águas do Rio Carioca passaram então a ser concentradas e direcionadas para a Unidade de Tratamento de Rio-Flamengo, cujo tratamento das águas ocorre somente imediatamente anterior à sua foz. Ainda segundo os autores, a Unidade somente funciona nos períodos de seca, com vazão máxima de projeto de 300 L/s e que em caso de chuvas, o processo é interrompido liberando a passagem do fluxo direto para a praia (DIAS, ROSSO, GIORDANO, 2012).

Atualmente, suas águas são visíveis somente em alguns locais: em sua nascente, no aqueduto/reservatório Mãe D'água, no trecho do Largo do Boticário, antes da UTR-Flamengo e logo posterior à mesma, desaguando na praia do Flamengo (REBOISSON, 2016).

### 3. JUSTIFICATIVA

A rápida urbanização das cidades e o sistema inadequado de gestão de lixo nas áreas urbanas criaram condições favoráveis para a proliferação de microrganismos patogênicos, que podem apresentar resistência aos antimicrobianos. A detecção desses patógenos é de extrema importância para a Saúde Pública, pois em alguns casos, as opções de fármacos são reduzidas ou até mesmo nulas. Tais microrganismos podem estar presentes no ambiente, inclusive no esgoto, aumentando a morbimortalidade da população, devido ao risco de infecção. Dentre eles, a *Leptospira* spp. se destaca como um importante patógeno de veiculação hídrica, representando um risco para a saúde da população, uma vez que os animais infectados e os reservatórios podem contaminar o meio ambiente, principalmente corpos aquáticos, através da sua urina. O isolamento e a identificação de cepas de *Leptospira* no ambiente é de grande importância, considerando a grande variedade de sorovares potencialmente infectantes em área urbana e rural.

Diante deste fato, a detecção de *Leptospira* spp. e o estudo da susceptibilidade dos isolados ambientais frente aos antimicrobianos convencionais utilizados no tratamento da leptospirose é de grande relevância, não só devido às dificuldades de isolamento, cultivo e taxonomia associadas a esse microrganismo fastidioso, mas também pela necessidade de realização de testes de susceptibilidade /resistência, assunto pouco explorado em nosso país, considerando esse gênero bacteriano. Além disso, a identificação de isolados ambientais contribui com informações epidemiológicas de espécies e sorovares de *Leptospira* spp. circulantes na região, fornecendo subsídios para medidas de vigilância sanitária.

Em função da importância da leptospirose na Saúde Pública e no conceito de Saúde Única, bem como o impacto ambiental que bactérias resistentes podem causar, o presente estudo visou identificar a circulação de cepas de *Leptospira* spp. em diferentes pontos do Rio Carioca e verificar a resistência/susceptibilidade das mesmas frente aos antimicrobianos comumente utilizados na clínica médica e avaliação dos riscos de disseminação da doença

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Isolar e caracterizar cepas de *Leptospira* spp. presentes no Rio Carioca - RJ, a fim de determinar seus perfis de resistência/susceptibilidade frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da leptospirose.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Revisar conceitos atualizados sobre a leptospirose humana e as principais técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas, ampliando a compreensão a respeito da doença e do seu agente, além de fornecer informações importantes sobre a escolha do melhor método diagnóstico;
- Pesquisar a presença de *Leptospira* spp. em diferentes pontos do Rio Carioca - RJ, através do cultivo;
- Identificar as cepas isoladas em nível de sorogrupo, utilizando técnicas sorológicas convencionais;
- Detectar a presença de marcadores de patogenicidade e de gênero, utilizando técnicas moleculares convencionais;
- Identificar as cepas isoladas em nível de espécie, por meio do sequenciamento do gene *ppk*;
- Avaliar a resistência/susceptibilidade das cepas frente aos principais antimicrobianos utilizados na clínica médica.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 ARTIGO DE REVISÃO

Foi elaborado um artigo de revisão narrativa da literatura, constituído a partir de pesquisa bibliográfica, baseada em trabalhos científicos contendo os dados mais relevantes para este estudo. A busca foi realizada através da base de dados PubMed, utilizando os termos leptospirose, leptospiras, taxonomia, ambiente, diagnóstico laboratorial, PCR, MAT, ELISA-IgM e teste rápido, contemplando artigos dos últimos 10 anos, além de revisões clássicas citadas em diversas publicações em leptospirose.

Após finalização e leitura pelos autores envolvidos, o artigo foi submetido à análise por pares na Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC (ISSN: 2448-3877) em 2021, com o título “Leptospirosis: Characteristics of the human disease and main laboratory diagnostic techniques”.

### 5.2 COLETA DAS AMOSTRAS NA SUB BACIA DO RIO CARIOCA - RJ

Seguindo instruções normativas, o projeto foi submetido ao SISBio, tendo sua aprovação (No 73355) para a realização de coletas no período de 02/12/2019 a 04/01/2021. Este projeto também foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado-SisGen, sob código **A3A15E4**.

Foram selecionados cinco pontos de coleta onde o Rio Carioca corre a céu aberto (Figura 8): dois pontos iniciais na Floresta da Tijuca que convergiam para a formação do rio, indicados por monitores da Floresta da Tijuca onde seriam as supostas nascentes (Figura 9, A e B); um ponto que funcionava como caixa de passagem das águas na ligação com o Aqueduto da Carioca - Reservatório Mãe d’água (Figura 9, C); um ponto no largo do boticário (Figura 9, D) e um ponto antes da Unidade de Tratamento do Rio (UTR) (Figura 9, D).

A coleta seguiu as recomendações de Silva (2021) onde a autora sugere evitar períodos de precipitação dentro de 24 horas anteriores, considerando também que a precipitação acumulada do período estimada estivesse entre os valores médios históricos (CPTEC/ INPE, 2020).

Figura 8. Mapa dos locais de amostragem na Sub Bacia do Rio Carioca – RJ, nos locais onde o rio corre a céu aberto. Fonte: Pontos plotados no Google Maps a partir da latitude e longitude obtidos no momento da coleta.



Fonte: Silva (2021).

Figura 9. Pontos onde as amostras de água do Rio Carioca foram coletadas



. Fonte: Silva (2021)

**Legenda: (A) Nascente 1A, (B) Nascente 1B, (C) Mãe D'água, (D) Largo do Boticário e (E) Ponto anterior a UTR-Flamengo.**

O material foi obtido a uma profundidade de aproximadamente 20 cm nos pontos de coleta C, D e E. Nas nascentes, a profundidade era rasa e a coleta foi realizada próxima ao fundo. As amostras (50 mL de cada ponto), foram coletadas, em frascos previamente esterilizados e com tampa rosqueável, em janeiro de 2020, transportadas em caixa térmica e mantidas refrigeradas (2 a 8° C) até serem processadas no Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose (LRNL)/ IOC /FIOCRUZ.

Os parâmetros físico-químicos como pH e temperatura foram mensurados no local de cada coleta, conforme descrito por Silva (2021). Foi utilizada a Tira Universal de pH 0-14 da KASVI®, com o intuito de determinar o pH inicial, no local e momento da coleta, seguindo as

instruções do fabricante. O pH foi confirmado no Laboratório de Microbiologia (LabMicro) do departamento de Ciências Biológicas da ENSP, utilizando um potenciômetro Luca 210®, de acordo com o POP (Procedimento Operacional Padrão) do Laboratório. Para a obtenção da temperatura *in situ*, foi utilizado o Termômetro de máxima e mínima digital da INCONTERM®.

### 5.3 ISOLAMENTO DE *LEPTOSPIRA* SPP. A PARTIR DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.

Os meios utilizados para cultivo foram o EMJH (Difco-BD<sup>®</sup>) e o Fletcher (Difco-BD<sup>®</sup>) semi-sólidos (Ágar 0,2%), preparados segundo Farias e colaboradores, 1997. Este último foi incluído por se tratar de um meio mais rico que o EMJH, pois contém soro de coelho na sua composição, fornecido pelo ICTB (Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/FIOCRUZ), em substituição à Albumina de Soro Bovino principal componente do enriquecimento comercial (*Leptospira* Enrichment EMJH-DIFCO), o que favorece o crescimento de cepas mais exigentes (FARIAS et al., 1997).

A fim de evitar contaminação das culturas, 100 µg/mL de 5-fluorouracil foram adicionados como agente seletivo para *Leptospira* spp. aos tubos contendo os meios (WHO/ILS, 2003). Para isolamento das cepas, foram preparadas placas contendo meio EMJH sólido (Ágar 1%), como descrito em FARIAS et al., (1997).

As amostras de água foram submetidas a duas filtrações, a primeira em membrana com poro de 0,45µm, para reduzir a carga de partículas e a segunda em membrana de poro 0,22µm para reter a maior parte da porção microbiana. Esta porosidade permite a passagem das leptospiros funcionando como uma seleção física deste microrganismo (FAINE et al., 1999; MENY et al., 2017). O filtrado foi semeado (0,5 mL) em tubos de meio EMJH e Fletcher (4,5 mL) e estes foram incubados à temperatura de 28-30°C. O crescimento das culturas foi monitorado semanalmente durante 3 semanas, utilizando microscópio de campo escuro (Axioskop 40, Zeiss®), com aumento de 200X, observando a morfologia e a motilidade características do gênero bacteriano: forma em espiral longa, ganchos nas extremidades e movimento helicoidal (FAINE et al, 1999; CASANOVAS-MASSANA et al, 2020).

As culturas com crescimento foram então semeadas em placas contendo meio EMJH sólido e incubadas na faixa de temperatura de 28-30 °C, até o surgimento de colônias abaixo da superfície do meio, característico das leptospiros. Foram separadas colônias individuais e então

semeadas em meio EMJH líquido para utilização nos testes de identificação (CASANOVAS-MASSANA et al., 2020).

## 5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

### 5.4.1 Identificação sorológica

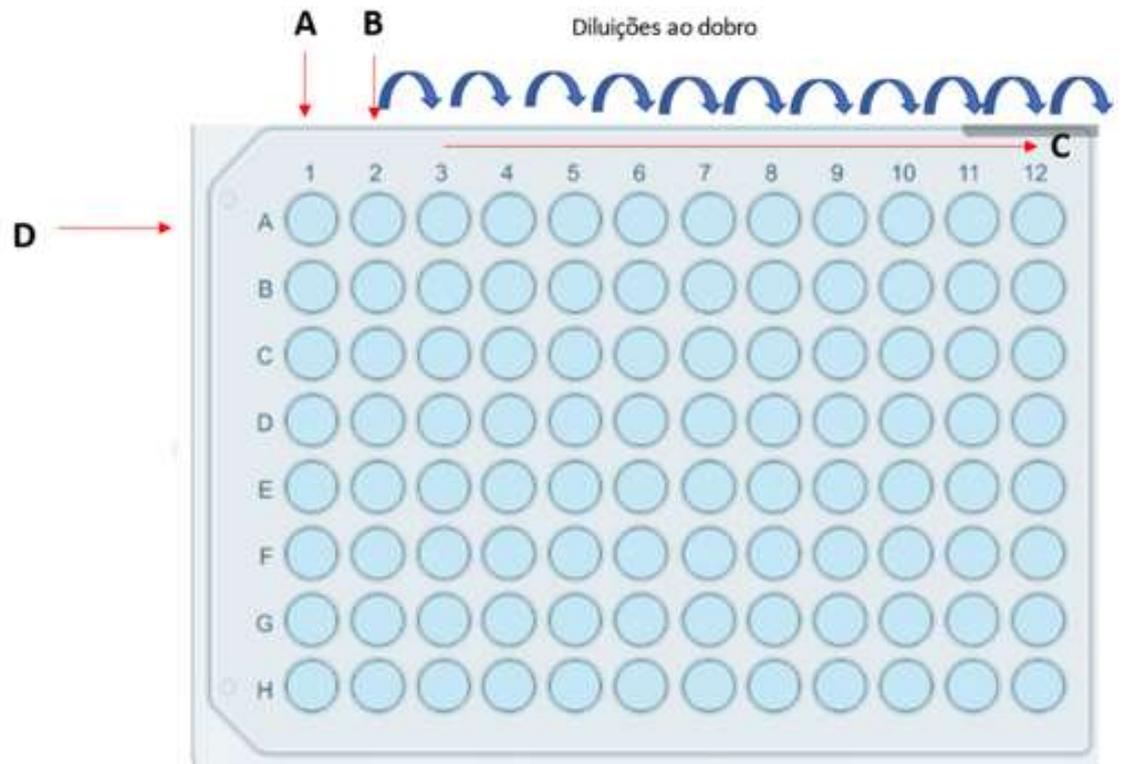
Para a identificação em nível de sorogrupo foi realizado o teste de aglutinação microscópica (MAT) utilizando 18 antissoros de referência produzidos em coelho e fornecidos pelo Instituto de Medicina Tropical, Amsterdam, Holanda, de acordo com o procedimento descrito a seguir.

O MAT foi realizado em 2 etapas: Triagem e Titulação. Na etapa de triagem, as cepas a serem identificadas foram submetidas ao teste de aglutinação frente aos 18 antissoros em uma única diluição. O teste foi realizado em uma microplaca de 96 orifícios. Foram adicionados 50 µL de uma diluição adequada ( $1,5 \times 10^6$  células/mL) das culturas a serem testadas a 50µL de cada soro de referência diluído a 1:50. Após incubação por 2h à temperatura ambiente (25°C), foi realizada a leitura em microscópio de campo escuro, com aumento de 100X para observação de aglutinação. O antissoro de referência que apresentou percentual de aglutinação maior que 50% com a cepa a ser identificada foi selecionado para a titulação (TERPSTRA et al., 1985; WHO/ILS, 2003).

Na etapa de titulação, o antissoro foi submetido a diluições seriadas ao dobro na faixa de 1:100 a 1:204.800 (Figura 10).

As reações foram realizadas em microplaca de 96 orifícios, com diluição inicial do antissoro de 1:50 e volume final de 50µL. Em seguida, foram adicionados 50µL da cepa teste ( $1,5 \times 10^6$  células/mL – diluídas em comparação com o tubo 0,5 da escala de Mcfarland) a cada orifício, de modo que a primeira diluição do soro passou a ser 1: 100 (TERPSTRA et al., 1985; WHO, 2003).

Figura 10. Esquema da placa de microaglutinação indicando a diluição seriada dos antissoros de referência - etapa da titulação.



- A - PBS + cepa – controle negativo
- B - Anti-soro (100 µL) – coluna 2
- C - 50 µL de PBS da 3ª a 12ª coluna
- D - Adição de 50 µL da cepa teste para cada anti-soro em todos os poços.

Fonte: autoria própria (2022)

Após incubação por 2h à temperatura ambiente (25°C), foi realizada a leitura em microscópio de campo escuro, com aumento de 100X. O ponto final da leitura foi aquela diluição onde se observou 50% de aglutinação ou de leptospiros livres, comparando-se ao controle do antígeno (sem antissoro) (Figura 11) (WHO, 2003).

Figura 11. Imagem representativa da visualização de aglutinação ao microscópio de campo escuro.



Fonte: autoria própria (2022).

Os títulos obtidos a partir dos isolados devem ser comparados a uma cepa de referência representante do sorogrupo correspondente (FAINE et al, 1999; WHO/ILS, 2003). A MAT utilizando antissoros pode apresentar reações cruzadas entre diferentes sorogrupos, o que pode dificultar a interpretação dos resultados, levando à necessidade de se utilizar as ferramentas moleculares para conclusão da tipagem (CAIMI, RUYBAL, 2020).

#### 5.4.2 Identificação molecular

Para realizar a identificação molecular das amostras isoladas, foram retirados 500  $\mu$ L do cultivo de cada cepa previamente cultivada em meio EMJH líquido por 7 a 10 dias a 28-30°C, e em seguida centrifugados a 3000 x g à temperatura ambiente, por 10 min, para separação do sedimento, contendo as leptospiras (POP-TEC-LRNL/CLEP-011). A extração de DNA a partir do sedimento foi realizada utilizando-se um kit comercial (*DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen*), conforme as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a -20°C até a utilização. Para a identificação do gênero bacteriano foi realizada a PCR convencional, utilizando iniciadores (*Forward* – 5' - GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG - 3'; *Reverse* – 5'

– TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT - 3') responsáveis por amplificar o gene *rrs*, que codifica uma região do RNA ribossomal 16S, específico de *Leptospira* spp. O produto esperado para a amplificação do gene é de 330 pares de base (pb) (MERIEN et al, 1992). Foram então adicionados 5 (cinco) microlitros do DNA obtido na extração à 20µL da mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 1X pH 8,3, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada nucleotídeo (Thermo Scientific®), 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific®) e 0,2 µM de cada iniciador (MERIEN et al, 1992).

O DNA extraído de um cultivo da cepa CLEP 00002 (*Leptospira. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni cepa M20) foi utilizada como controle positivo e água Mili-Q estéril foi usada como branco (sem DNA) em cada reação, segundo POP-TEC-LRNL/CLEP-011. As reações foram realizadas em termociclador (BioRad T100®), programado com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C/3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C/30 seg, anelamento a 55°C/30 seg e extensão a 72°C/45 seg, seguido por uma extensão final a 72°C/5min (MERIEN et al, 1992). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) a 100 V por 50 min., com a inclusão do padrão de peso molecular 100bp DNA ladder (Life Technologies) (POP-TEC-LRNL/CLEP-011).

Todas as amostras foram marcadas com o intercalante de base *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia) e após a corrida eletroforética, foram analisadas sob transiluminação por luz ultravioleta (LOCCUS). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen Science, EUA) de acordo com o manual do fabricante.

Os fragmentos purificados foram dosados no fluorímetro Qubit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, e enviados para sequenciamento tanto no sentido "forward" como no "reverse" e em duplicatas pela Plataforma de Sequenciamento de DNA - RPT01A - PDTIS, utilizando o kit *Big Dye Terminator* por eletroforese capilar em aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific™, EUA). A qualidade dos cromatogramas obtidos foi analisada através do *software Sequencher 5.0®* (Gene Codes Corporation, EUA). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelos programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) e EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) seguindo as recomendações de Kim et al, 2012.

Logo após confirmação do gênero, os isolados foram criopreservados em nitrogênio líquido e freezer -80°C, e depositados na Coleção de *Leptospira* (CLEP) pertencente ao Laboratório de Zoonoses do Instituto Oswaldo Cruz /FIOCRUZ.

## 5.5. DETECÇÃO DE MARCADORES DE PATOGENICIDADE

Para a avaliação da presença de marcadores de patogenicidade foram realizadas reações de multiplex-PCR convencional, tendo como alvos os genes *flaB* (*Forward*: 5' - TCT CAC CGT TCT CTA AAG TTC AAC - 3' / *Reverse*: 5' - CTG AAT TCG GTT TCA TAT TTG CC - 3') (KAWABATA et al., 2001) e *lipL41* (*Forward*: 5' - TAG GAA ATT GCG CAG CTA CA - 3' / *Reverse*: 5' - GCA TCG AGA GGA ATT AAC ATC A - 3') (AHMED et al., 2006), que codificam para a proteína flagelar FlaB e a lipoproteína de membrana externa LipL41, respectivamente. O produto esperado para a amplificação do gene *flaB* é de 793 pb e do gene *lipL41* é de 520 pb (KAWABATA et al., 2001; AHMED et al., 2006).

Para a reação, foram então adicionados 5 (cinco) microlitros do DNA obtido na extração à 20µL da mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 1X pH 8,3, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada nucleotídeo (Thermo Scientific®), 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific®) e 0,2 µM de cada iniciador (KAWABATA et al., 2001; AHMED et al., 2006).

O DNA extraído de um cultivo da cepa CLEP 00002 (*Leptospira. interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni cepa M20) foi utilizada como controle positivo e água Mili-Q estéril foi usada como branco (sem DNA) em cada reação, segundo POP-TEC-LRNL/CLEP-011.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (BioRad T100®), programado com o seguinte ciclo: desnaturação inicial 5 min/ 95° C; 34 ciclos de: desnaturação 30 seg/ 95°C, anelamento 30 seg/ 54°C e extensão 1 min/ 72° C, seguido por uma extensão final 7min/ 72° C (KAWABATA et al., 2001; AHMED et al., 2006).

## 5.6. AVALIAÇÃO DO GENE *PPK* COMO MARCADOR MOLECULAR DE IDENTIDADE

Com base no trabalho realizado por Vincent e colaboradores (2019), a amplificação do gene *ppk*, foi avaliada e padronizada como um marcador de identidade de gênero para espécies saprófitas e intermediárias. Segundo os autores, este gene alvo apresenta maior especificidade para a identificação de espécies saprófitas, contribuindo para a conclusão da identificação das cepas deste estudo.

Para realização desta análise, um volume de 5µL do DNA obtido na etapa de extração foi adicionado a 20µL da mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 1X pH 8,3, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada nucleotídeo (Thermo Scientific), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) e 0,1µM de cada iniciador (*Forward*: 5' -AAC MGW ATB TGG GGA GAY GC - 3'; *Reverse*: 5' - TGT TTK CCR TTY TCY GCV GC -3' (comunicação com os autores). O DNA obtido de um cultivo da cepa CLEP 00002 (*Leptospira interrogans*, sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa M20) foi incluído como controle positivo e água Milli-Q estéril como branco em cada reação (POP-TEC-LRNL/CLEP-011).

Uma vez que a reação de amplificação do gene *ppk* ainda não havia sido publicada, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (variando de 51 a 56°C) no ciclo rotineiramente utilizado pelo LRNL, que consiste da desnaturação inicial 3 min/ 94°C; 34 ciclos de: desnaturação 30 seg/ 94°C, anelamento 30 seg/ 51 a 56°C e extensão 45 seg/ 72°C, seguido por uma extensão final 5min/ 72°C. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (BioRad T100®). Os produtos obtidos pela PCR, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) a 100 V por 50 min., com a inclusão do padrão de peso molecular 100bp DNA ladder (Life Technologies) (POP-TEC-LRNL/CLEP-011).

Todas as amostras foram misturadas com o intercalante de base *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia) e após a corrida eletroforética, foram analisadas sob transiluminação por luz ultravioleta (POP-TEC-LRNL/CLEP-011). Os fragmentos foram sequenciados tanto no sentido "forward" como no "reverse" e em duplicatas utilizando o kit Big Dye Terminator v 3.1 por eletroforese capilar em aparelho SeqStudio (ThermoFisher Scientific™, EUA), no Laboratório de Microrganismos de Referência INCQS/FIOCRUZ.

Os *amplicons* foram submetidos previamente a uma avaliação no NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific-BR), para quantificação e medição das razões 280/260 e 260/230. Amostras com razões inferiores a 1.8 foram purificadas novamente. As concentrações dos produtos foram ajustadas para 3.0 ng/µL. O protocolo de sequenciamento foi realizado segundo o Manual

“Sequencing Standard BigDye v3.1” (Appliedbiosystems), com adaptações, conforme descrito a seguir. Para a realização do sequenciamento foi utilizada uma microplaca de 96 poços (MicroAmp™ Thermo Fisher, Cat. No. 4306737) e o mapa da placa foi montado segundo modelo padronizado pelo laboratório, reservando dois poços para o *Sequencing Standards* (controle da corrida) e dois poços para pGEM (controle da reação). Um volume de 6,5µL dos amplicons foram adicionados à placa.

Separadamente, foi preparada a mistura para a reação de sequenciamento, contendo 1,5 µL de tampão de sequenciamento (5x), 1,0 µL de iniciador (5µM), 1,0 µL de BigDye (2,5x). O mix de controle da reação (pGEM) foi preparado contendo 1,5 µL de tampão de sequenciamento, 1,0 µL do iniciador M13, 1,0 µL do BigDye, 1,0 µL do pGEM e 5 µL de H<sub>2</sub>O. Foram adicionados 10 µL deste mix em dois poços da placa, que foi centrifugada brevemente. A placa foi selada e então submetida à ciclagem de 96° C por 1min, 40 repetições de 96° C por 10 seg, 50° C por 5 seg e 60° C por 4 min.

Para a precipitação da reação de sequenciamento, a placa foi centrifugada brevemente. Foram adicionados, em seguida, 30 µL de isopropanol 75% em cada poço, homogeneizando e posteriormente centrifugando a placa por 15 segundos a 1000 g. Após incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos, a placa foi selada e centrifugada a 2500 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C.

A placa foi invertida sobre o papel toalha, cuidadosamente, por meio de movimentos circulares, apoiada sobre a bancada, a fim de descartar o sobrenadante. Foram adicionados 50 µL de etanol 75% em cada poço para precipitação do DNA. Em centrífuga de placas, refrigerada, a placa foi centrifugada a 2500 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado como descrito anteriormente. Em seguida, a placa foi centrifugada invertida (*spin down*), utilizando papel toalha para absorção do etanol. A placa foi então incubada em termociclador a 60°C, por 10 minutos, sem tampa, apenas com uma folha de papel alumínio protegendo da luz.

Na etapa de desnaturação da reação de sequenciamento, foi realizada a preparação do *Sequencing Standards*, conforme descrito no Manual do fabricante “BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied biosystems):

Um tubo contendo o *Sequencing Standards* liofilizado foi centrifugado brevemente e em seguida adicionados 300 µL de formamida, cuidadosamente. O tubo foi homogeneizado para ressuspender adequadamente o liofilizado. Em seguida, 20 µL foram alíquotados em microtubos de 1,5 mL, para uso. Foram dispensados 10 µL do *Sequencing Standards* em cada poço da placa. Em seguida, foram adicionados 10 µL de formamida Hi-Di em cada poço da

placa seca e esta foi selada. Foi feita uma breve centrifugação da placa por 10 segundos, a 600 rpm. Em seguida, a placa foi incubada em um termociclador a 95°C por 3 minutos, ao abrigo da luz e colocada, em seguida, imediatamente no gelo, por 5 minutos. Mais uma breve centrifugação a 600 rpm por 10 segundos foi realizada. A placa foi finalmente encaminhada para eletroforese capilar (sequenciamento). A ciclagem no equipamento SeqStudio foi selecionada de acordo com o tamanho do fragmento esperado (421pb). A qualidade dos cromatogramas obtidos foi analisada através do *software* *Sequencher 5.0* (*Gene Codes Corporation*, EUA). A análise de similaridade e alinhamento das sequências foi realizada pelos programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) e EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) (KIM et al., 2012).

Foram analisadas 68 sequências do gene *ppk* das diferentes espécies de *Leptospira* depositados no banco de dados no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI). O alinhamento e a árvore filogenética foram construídos usando CLC Genomics Workbench (22.0v) com o algoritmo *Neighbor joining* e parâmetros *Kimura* (Qiagen).

## 5.7. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As cepas foram avaliadas frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da leptospirose, tais como Penicilina, Cefotaxima, Doxiciclina, Azitromicina e Ampicilina (TROTT, 2018). O protocolo e as concentrações utilizadas foram baseados em Murray e Hospenthal (2004) e Chakraborty et al. (2010), com adaptações.

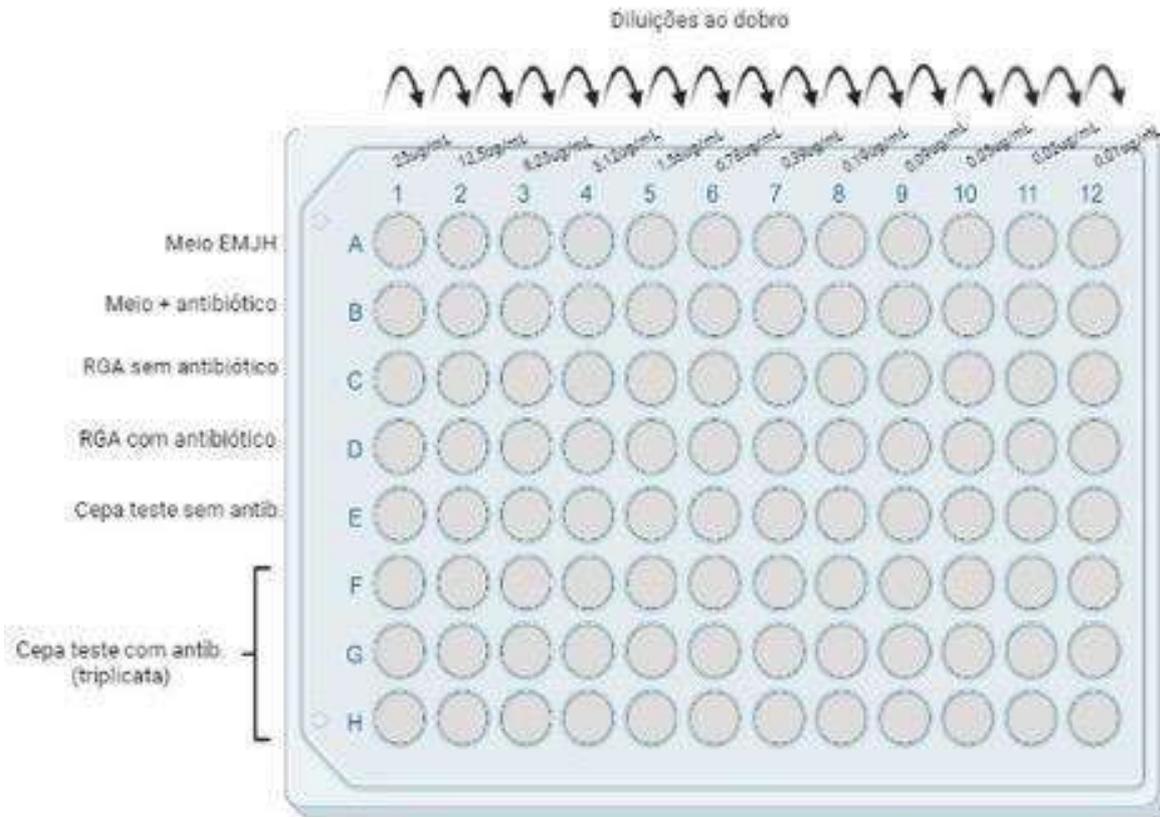
Uma vez que não há parâmetros tabelados pelo CLSI e EUCAST para a avaliação da susceptibilidade de leptospiros frente a antimicrobianos, a cepa CLEP 00001 (*L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA) foi incluída no experimento com base no protocolo previamente descrito por Murray e Hospenthal, (2004), considerando tratar-se de uma cepa de referência, representante do sorogrupo de maior importância epidemiológica na leptospirose (WHO, 2003).

As cepas foram previamente cultivadas em meio EMJH líquido por 7-10 dias a 28-30°C, e posteriormente quantificadas em câmara de Petroff Hausser® (Hausser Scientific) para ajustar a concentração para  $2 \times 10^6$  leptospiros/mL. Para essa análise, uma alíquota da cultura foi diluída na proporção de 1:10 em salina tamponada (PBS 0,1M) e inativada com solução de formol a 1% (em PBS 0,1M), da seguinte forma: 100µL da cultura + 800µL de salina tamponada

+ 100µL de formol 1%. Após 10 minutos (tempo para inativação das leptospiras) foram adicionados aproximadamente 20µL da preparação na câmara para contagem. Para a obtenção do número de leptospiras/mL, foi aplicado o seguinte cálculo, conforme instruções do fabricante da Câmara:  **$n^{\circ}$  de células X diluição X 50000 =  $n^{\circ}$  de células/mL.**

Os antimicrobianos Penicilina (Sigma-Aldrich P7794-1MU), Doxiciclina (Sigma-Aldrich D1822- 500mg), Cefotaxima (Sigma-Aldrich C7039- 100mg) e Azitromicina (Supelco PHR1088 -1g) foram reconstituídos segundo recomendado pelo fabricante e baseado na solubilidade tabelada no manual CLSI 2020. Foram preparadas soluções-estoque na concentração de 1mg/mL, que foram mantidas a – 30°C para posterior uso, no prazo de até 30 dias (recomendação do fabricante). Foram utilizadas microplacas de 96 poços, conforme ilustrado na figura 12.

Figura 12. Esquema de montagem das placas para a técnica de microdiluição incluindo controles negativos, a cepa controle (RGA) e a cepa teste, com diluições seriadas dos antibióticos.



Fonte: autoria própria (2023).

Os antibióticos foram diluídos no 1º poço (10 µL da solução 1mg/mL + 190 µL de meio) onde a concentração inicial foi de 50 µg/mL, seguindo com a diluição serial ao dobro em 100 µL de meio EMJH. Em seguida, 100 µL do inóculo contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  leptospiras/mL foram inoculados na placa, e as concentrações finais dos antibióticos foram de 25 a 0,01 µg/mL (MURRAY, HOSPENTHAL, 2004; BENACER et al., 2017).

Para cada antibiótico foram incluídos como controle negativo apenas o meio de cultura puro e o meio com o antibiótico. Como controle positivo foi utilizada a cepa CLEP 00001 (*L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA), apenas em meio de cultura e com cada antibiótico testado. Foi incluído também um controle de cada cepa teste sem antibiótico. Após adição das culturas, o volume final em cada poço foi de 200 µL. Após 3 dias de incubação na faixa de temperatura de 28-30° C, foram adicionados 20 µL do reagente AlamarBlue® 10X concentrado (Invitrogen). Este reagente é um indicador de oxidação-redução que muda de cor de azul-escuro para rosa claro, em resposta à redução química que

ocorre durante o crescimento celular no meio de cultivo, indicando crescimento bacteriano (BENACER et al., 2017).

As placas foram incubadas por mais 2 dias, com o AlamarBlue®, e no quinto dia de incubação, a cor de cada poço foi documentada visualmente, conforme protocolo previamente descrito (MURRAY E HOSPENTHAL, 2004; CHAKRABORTY et al, 2010; BENACER et al., 2017). Através da observação da mudança de cor é possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que representa a menor concentração do antimicrobiano que não resulta na mudança de cor de azul-escuro para rosa claro. Os testes foram repetidos pelo menos duas vezes para cada cepa (CHAKRABORTY et al, 2010)

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 ARTIGO DE REVISÃO**

O artigo de revisão foi submetido, aceito e publicado na Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC) no ano de 2021 (impresso): RBAC. 2021;53(3):211-218, DOI: 10.21877/2448-3877.202102110 (APENDICE 1) e contribuiu para a atualização dos conceitos sobre leptospirose, seu agente etiológico e as principais técnicas utilizadas para o diagnóstico da doença. Dentre as técnicas abordadas neste artigo, o isolamento em cultura, a PCR e a MAT foram utilizadas para alcançar os objetivos do estudo com os isolados do Rio Carioca, levando em consideração as limitações e vantagens de cada uma. Embora o tema da revisão tenha apontado para o diagnóstico clínico, as técnicas foram aplicadas às amostras ambientais com êxito, demonstrando a eficácia dessas metodologias para diferentes tipos de materiais (clínicos ou ambientais), de modo que a revisão prévia contribuiu fortemente para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Artigo de Revisão/Review

## Leptospirose: Características da enfermidade em humanos e principais técnicas de diagnóstico laboratorial

*Leptospirosis: Characteristics of the human disease and main laboratory diagnostic techniques*

Tabiano Mendes Varela Ramos<sup>1</sup>

Ilana Teruszkin Balassiano<sup>2</sup>

Talissa de Souza Menezes da Silva<sup>3</sup>

Josefina Maria da Rocha Nogueira<sup>4</sup>

### Resumo

A leptospirose é a zoonose de maior distribuição geográfica, com estimativa de cerca de 60.000 mortes por ano. A doença é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que possui mais de 300 diferentes sorovares e 64 espécies já identificadas, sendo o ambiente a principal fonte de contaminação. A doença em humanos apresenta manifestações clínicas variadas e caráter bifásico, devendo ser confirmada por meio do diagnóstico laboratorial. O objetivo deste trabalho foi reunir conceitos atualizados sobre a leptospirose humana e as principais técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas. A MAT é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose, mas devido à baixa sensibilidade na fase inicial da doença é necessário o emprego de técnicas mais sensíveis neste período. Baseado em diversos estudos, as metodologias de PCR, ELISA-IgM e teste rápido apresentaram sensibilidade satisfatória nos primeiros dias após o início dos sintomas. Na segunda semana, a MAT apresentou 100% de sensibilidade, mantendo sua alta especificidade em ambas as fases. No geral, os testes sorológicos de ELISA-IgM e teste rápido apresentaram resultados satisfatórios como métodos de diagnóstico precoce, principalmente tratando-se de locais com pouca infraestrutura, diferente dos laboratórios de referência onde é possível empregar as técnicas de PCR e MAT.

### Palavras-chave

Leptospirose humana; Espiroquetas; Diagnóstico Laboratorial

## INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das zoonoses de maior distribuição geográfica presente em praticamente todo o planeta. Estima-se que a cada ano ocorram 1,03 milhão de casos e 58.900 mortes, o que torna a leptospirose uma das zoonoses mais prevalentes no mundo.<sup>(1)</sup> Além disso, dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, no período de 2007 a 2019, foram registrados 48.670 casos confirmados de leptospirose humana e 4.287 óbitos, sendo notificada a maior incidência da doença nas regiões Sul e Sudeste.<sup>(2)</sup>

A doença é causada por espiroquetas invasivas pertencentes ao gênero *Leptospira*, sendo o ambiente contaminado a fonte de infecção indireta para o homem e outros mamíferos.<sup>(3)</sup> A leptospirose humana torna-se epidêmica nas estações chuvosas, quando podem ocorrer enchentes,

sobretudo em cidades com condições inadequadas de saneamento básico, como esgoto a céu aberto e lixões, que propiciam a contaminação da água com urina de roedores, principalmente o *Rattus norvegicus* (ratanos), que habitam comumente esses ambientes.<sup>(4)</sup>

O diagnóstico da leptospirose baseia-se principalmente no teste sorológico pela reação de microaglutinação, que é a técnica reconhecida como padrão-ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde, pela alta sensibilidade e especificidade, porém é limitada a centros de referência. O tratamento é baseado na antibioticoterapia, a qual apresenta maior eficácia nos primeiros dias após início dos sintomas.<sup>(5)</sup>

A eficácia do tratamento para a leptospirose depende principalmente do diagnóstico precoce da doença, o que tem levado à busca por técnicas laboratoriais mais modernas

<sup>1</sup> Doutoranda/Fiocruz (Laboratório de Zoonoses - IOC - FIOCRUZ).

<sup>2</sup> Doutoranda/Fiocruz (Curadora da Coleção de *Leptospira* - IOC - FIOCRUZ).

<sup>3</sup> Mestranda/ENSP (Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fiocruz).

<sup>4</sup> Doutoranda/Fiocruz (Chefe do Laboratório de Microbiologia - ENSP - FIOCRUZ).

Instituição: ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em: 18/02/2021

Aprovado em: 12/03/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102110

## 6.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DO GÊNERO *LEPTOSPIRA*

A metodologia empregada para o isolamento a partir de amostras de água foi considerada eficaz, pois foram isoladas cinco cepas a partir dos 5 pontos de coleta (uma de cada ponto), sendo morfológicamente sugestivas para o gênero *Leptospira*.

Ao analisarmos os pontos de coleta no percurso entre a nascente do rio (A e B) e o ponto anterior à Unidade de Tratamento de Resíduo-Flamengo (UTR) (E), observou-se o impacto sobre a qualidade da água, sendo este último local o mais degradado pela poluição, sofrendo os efeitos do processo de urbanização. Além disso, há maior incidência solar nos trechos do Largo do Boticário (P4) e no ponto anterior à UTR, com temperaturas de 31,9 °C e 31,8 °C, respectivamente, conforme registrado no momento da coleta, enquanto que, nos pontos P1, P2 e P3 as temperaturas foram 27,6°C, 29°C e 29,9°C, respectivamente (SILVA, 2021). Segundo Buzelli e Cunha-Santino (2013), temperaturas mais elevadas podem influenciar na qualidade da água, uma vez que a temperatura é inversamente proporcional à concentração de oxigênio dissolvido, e quanto menor a sua concentração, mais poluído o curso d'água se encontra. Contudo, este parâmetro não influenciou no isolamento de *Leptospira* spp. nestes dois últimos pontos.

Outro parâmetro relevante é o pH, o qual se manteve constante (pH = 6) em todos os pontos de coleta. Um estudo realizado por Smith e Turner (1961) testou pelo menos 4 diferentes sorovares patogênicos em água destilada, na faixa de pH entre 5,3 e 8, demonstrando o efeito deste parâmetro na sobrevivência das leptospiras. Os resultados revelaram maior tempo de sobrevivência (até 152 dias) em pH alcalino (acima de 7) e diferença entre os sorovares, em resposta às variações do pH. Esses achados, diferem dos resultados obtidos em nosso estudo, onde foram isoladas cepas em todos os pontos, mesmo em pH levemente ácido.

Embora os parâmetros medidos no momento da nossa coleta tenham revelado condições desfavoráveis para a sobrevivência das leptospiras, e os dois últimos pontos tenham sido os mais degradados, as técnicas empregadas em nossa pesquisa permitiram o isolamento deste gênero em todos os pontos de coleta, demonstrando a assertividade dessa metodologia.

Houve crescimento bacteriano em ambos os meios, EMJH e Fletcher, embora tenha sido observado um crescimento mais intenso nas culturas em Fletcher. Esse incremento no crescimento dos isolados ambientais ao utilizar o meio Fletcher corrobora com o que tem sido observado no Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose (IOC/FIOCRUZ) quando

esse meio é empregado para a recuperação de cepas clínicas. Assim, o meio Fletcher é a escolha mais assertiva quando há necessidade de maior isolamento deste gênero bacteriano.

Não foi observada contaminação nos tubos com ausência do 5-Fluorouracil (100 µg/mL), demonstrando a eficácia da filtração com a porosidade de 0,22µm. O 5-fluorouracil é um quimioterápico que tem sido empregado para minimizar a contaminação por outras bactérias em protocolos de isolamento de leptospiros, sendo incorporado aos meios nas concentrações que variam de 100 µg/mL a 400 µg/mL (RIDZLAN et al., 2010; BENACER, 2013; CHAIWATTANARUNGRUENGPASAN et al., 2018). Ademais, um trabalho realizado por Hami, Mohammad e Ashraf (2010) testou a eficiência da técnica de filtração por diferentes porosidades e constatou que para uma melhor recuperação de leptospiros a partir de amostras de águas superficiais, deve-se utilizar membranas cujos poros tenham diâmetro inferior a 0,45µm, o que foi confirmado em nosso estudo e por outros pesquisadores (AZALI, et al., 2016).

### 6.2.1 Identificação sorológica

Dentre as cepas isoladas, apenas a cepa obtida do ponto da nascente B (CLEP 00368) apresentou reatividade na MAT frente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, com título de 800 (Tabela 1). Em paralelo, foi realizada a titulação deste mesmo soro com a cepa de referência homóloga CLEP 00001 (*L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA), obtendo título de 102400, superior ao encontrado para a cepa em estudo. Apesar da diferença de título, segundo Terpstra e colaboradores (1985), este título de 800 como resultado já sugere que a cepa tenha relação com o sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, é preciso levar em consideração que neste método é comum ocorrerem reações cruzadas entre diferentes sorogrupos, e que a MAT não define esta classificação, de modo que esse achado deve ser considerado um resultado sugestivo (WHO, 2003). Apesar dessa ressalva, o título obtido nesta técnica tem uma grande relevância, uma vez que outros estudos com isolados ambientais utilizando painéis de antissoros de referência representantes dos sorogrupos mais comuns em cada região, reportaram resultados negativos ou com títulos inferiores ( $\leq 100$ ) ao obtido em nosso estudo na MAT, sugerindo que os isolados não tinham relação com nenhum dos sorogrupos testados (RIDZLAN et al., 2010; BENACER et al., 2013; AZALI, et al., 2016; FERNANDES et al., 2022). Isto fortalece a

importância do nosso resultado, pois relaciona a cepa CLEP 368 com o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, que é o mais prevalente na leptospirose humana no meio urbano e está relacionado aos casos graves (FAINE et al., 1999; WHO, 2003), apontando para a necessidade de uma investigação mais detalhada.

### **6.2.2 Identificação molecular e marcadores de patogenicidade**

Com base nas análises moleculares realizadas, o gênero *Leptospira* foi confirmado pela amplificação do gene *rrs* em todos cinco isolados, que foram depositados na Coleção de *Leptospira* (CLEP), do LRNL/ IOC, com os números CLEP 00366 a 00370 (Tabela 1). Este gene pode ser empregado como marcador de gênero, para detecção de bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, o que foi reportado em trabalhos anteriores ao nosso (MURGIA et al., 1997; CÁRDENAS-MARRUFO et al., 2011).

Tabela 1. Caracterização sorológica e molecular dos isolados ambientais obtidos no Rio Carioca e pesquisa dos genes de patogenicidade *flaB* e *lipL41*.

Identificação das cepas	Local de coleta	Tipagem sorológica	Sequenciamento do <i>rrs</i>	<i>flaB</i> e <i>lipL41</i>
CLEP00367	Nascente A	Não reagente	100% - <i>L. broomii</i> e <i>L. inadai</i>	Negativo
CLEP00368	Nascente B	Sorogrupo Icterohaemorrhagiae* Título 800	100% - <i>L. broomii</i> e <i>L. inadai</i>	Negativo
CLEP00366	Caixa da mãe D'água	Não reagente	99% - <i>Leptospira</i> sp. (sem definição de espécie)	Negativo
CLEP00369	Largo do Boticário	Não reagente	99% - <i>Leptospira</i> sp. (sem definição de espécie)	Negativo
CLEP00370	Anterior à Unidade de tratamento do Rio	Não reagente	99% - <i>Leptospira</i> sp. (sem definição de espécie)	Negativo

\*Soro SH-1 (sorogrupo Icterohaemorrhagiae) apresentou título de 102400 com a cepa homóloga RGA

Fonte: Autoria própria (2023).

O sequenciamento baseado no gene *rrs* apresentou baixo nível de discriminação entre as espécies, não sendo capaz de identificar as cepas neste nível taxonômico, principalmente para as cepas CLEP 00366, 00369 e 00370. Confirmando este resultado, um estudo realizado por Vincent e colaboradores (2019) demonstrou que a análise filogenética utilizando o gene *rrs* confere a visualização da diversidade do gênero *Leptospira* de forma geral, porém não permite uma inferência filogenética robusta e precisa, principalmente no caso de cepas saprófitas ou intermediárias. Segundo Picardeau (2017), isto ocorre devido às sequências do RNA ribossomal 16S serem altamente conservadas (em geral) e apresentarem duas cópias deste gene no genoma de *Leptospira*, que podem ser divergentes e virem de uma transferência horizontal.

Em contrapartida, apesar da baixa especificidade sugerida por Vincent (2019), as cepas CLEP 00367 e 00368 foram classificadas parcialmente como pertencentes às espécies *L. broonii* ou *L. inadai*, com base na avaliação do gene *rrs*, categorizadas no grupo das espécies intermediárias ou subclado P2 (Figura 1).

Não foi observada amplificação dos genes *flaB* e *lipL41* nas cepas isoladas, todavia segundo KAWABATA et al. (2001) e AHMED et al. (2006), estes genes são encontrados somente em cepas patogênicas, o que aumenta a probabilidade de os isolados não pertencerem a este grupo, levando em consideração as espécies descritas até o momento.

### 6.3 AVALIAÇÃO DO GENE *PPK* NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *LEPTOSPIRA* SP.

Nos testes com diferentes temperaturas de anelamento, realizado para padronização da amplificação do gene *ppk* para *Leptospira* spp. ambientais, a temperatura de 56°C foi ideal para as cepas CLEP 00368, CLEP 00369 e CLEP 00370, mas para as cepas CLEP 00366 e CLEP 00367 a temperatura ideal foi 51°C. Corroborando com o que foi sugerido por Vincent e colaboradores (2019), o sequenciamento deste fragmento forneceu um resultado mais claro do que o obtido com o gene *rrs*, conforme observado na Tabela 2. Ainda segundo esses autores, este gene de cópia única, foi que o apresentou melhor resultado na diferenciação entre as espécies saprófitas (S1 e S2) e intermediárias (P2) dentre 553 outros genes do core genoma.

Isto foi mais claramente observado pelo resultado obtido com a cepa CLEP 00369, que apresentou uma correlação genética de 100% com a espécie *Leptospira bandrabouensis*, em contraste com o resultado obtido anteriormente, o qual indicava inespecificidade do gene *rrs*. A espécie *Leptospira bandrabouensis* pertence ao subclado S1 (Figura 1), que representa as cepas saprófitas, as quais não são capazes de desenvolver a doença. Além disso, foi possível determinar uma correlação cepa-espécie, baseado na árvore filogenética comparativa entre as 68 espécies já descritas para o gênero *Leptospira* (Figura 13).

Tabela 2. Resultado do sequenciamento genômico baseado nos genes *rrs* e *ppk*, revelando maior capacidade discriminatória deste último gene.

Identificação das cepas	Sequenciamento do gene <i>rrs</i>	Sequenciamento do gene <i>ppk</i>
CLEP00367	100% - <i>L. broomii</i> e <i>L. inadai</i>	99,0% - <i>L. broomii</i>
CLEP00368	100% - <i>L. broomii</i> e <i>L. inadai</i>	85,0% - <i>L. idonii</i>
CLEP00366	99% - <i>Leptospira</i> sp. (sem definição de espécie)	88,0% - <i>L. noumeaensis</i>
CLEP00369	99% - <i>Leptospira</i> sp. (sem definição de espécie)	100% - <i>L. bandrabouensis</i>
CLEP00370	99% - <i>Leptospira</i> sp. (sem definição de espécie)	98,0% - <i>L. bandrabouensis</i>

Fonte: Autoria própria (2023).

Podemos observar que as cepas CLEP 00368, 00366 e 0370 apresentaram correlação genética com as espécies *L. idonii* (85,0 %), *L. noumeaensis* (88,0 %) e *L. bandrabouensis* (98,0 %), respectivamente (Tabela 2). Contudo, constatamos uma similaridade do gene abaixo de 98,7% que, segundo proposto por Chun e colaboradores (2018) indica a possibilidade de pertencerem a espécies ainda não descritas. Estes dados apontam para a necessidade de maior investigação acerca da identidade destas cepas para melhor esclarecimento sobre os riscos de infecção a partir do ambiente aquático em estudo neste trabalho.

A cepa CLEP 00367 apresentou uma correlação mais estreita com a espécie *L. broomii* (99,0 %) (Tabela 2), confirmando resultado sugestivo obtido anteriormente no sequenciamento do gene *rrs*. Este resultado tem grande relevância neste trabalho, pois a espécie *L. broomii* está entre as pertencentes ao grupo P2 (Figura 1), que são capazes de causar a doença branda em humanos, apesar de haver relato de casos severos de leptospirose também associados à esta espécie (LEVETT et al., 2006). Além disso, a presença de cepas com potencial patogênico no ambiente reforça a importância desta investigação, uma vez que o ambiente é a principal fonte de infecção para o homem e a água o principal elo de transmissão (RAMOS et al., 2021).



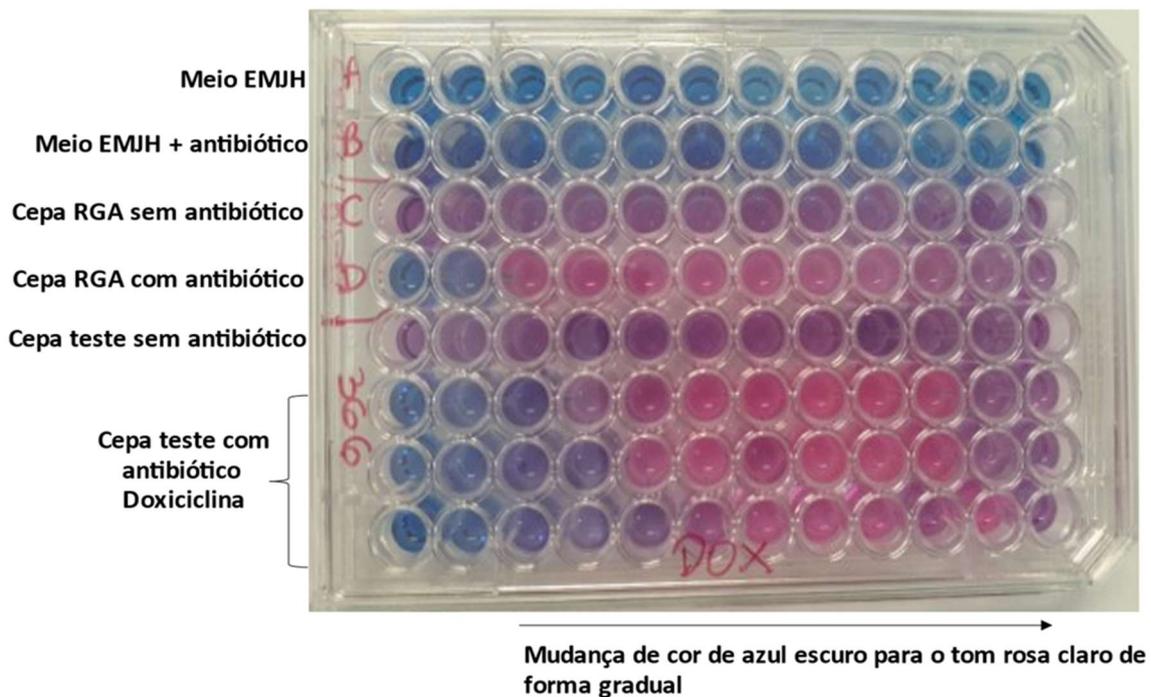
É importante ressaltar que, segundo Bierque e colaboradores (2020), os pesquisadores que utilizaram a cultura como método de detecção de cepas de *Leptospira* em amostras de águas superficiais, em geral isolaram cepas saprófitas, ou pertencentes ao subgrupo das patogênicas, relacionadas à baixa virulência, sendo muito poucos os trabalhos que descreveram o isolamento de cepas patogênicas relacionadas ao subclado P1 (Figura 1), o que apoia os resultados obtidos em nosso trabalho de pesquisa.

Portanto, nossos resultados são de extrema relevância, uma vez que a taxonomia deste gênero bacteriano é complexa, e vasta a sua diversidade, e os testes de virulência realizados por outros grupos de pesquisa em modelos animais foram limitados para avaliar o risco de desenvolvimento da doença pelas cepas caracterizadas como patogênicas (CASANOVAS-MASSANA et al., 2020; FERNANDES et al., 2022). Sendo assim, o isolamento de cepas que possivelmente ainda não foram descritas na literatura representa um risco para a Saúde Pública, principalmente por terem sido isoladas do ambiente urbano, o que pode levar ao estreitamento do contato com a população local, em especial no período de fortes chuvas.

#### 6.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO

Os resultados foram observados visualmente, de acordo com a virada do reagente AlamarBlue® da cor azul escuro para rosa, conforme representado na figura 14. Não foi observada alteração de cor nos controles com ausência de bactérias (meio EMJH e meio EMJH + antibiótico). No controle interno (Cepa RGA) e na cepa teste, sem adição do antibiótico foi observada mudança de cor para rosa, após adição do reagente AlamarBlue® em todos os poços, revelando a eficiência deste reagente (Figura 14).

Figura 14. Placa de microdiluição testando a cepa CLEP00366 contra o antibiótico doxiciclina, após incubação com AlamarBlue®. Mudança da cor de azul para rosa indica atividade celular



Fonte: autoria própria (2023).

Os resultados encontrados nesse estudo, quando comparados com a cepa CLEP 00001 (RGA) mostraram um achado interessante, observado na etapa de padronização da metodologia, anterior à análise dos isolados ambientais, já que esta bactéria apresentou resistência à azitromicina (dentro da faixa de concentração estabelecida no estudo), com CIM acima de 25  $\mu\text{g/mL}$ , além de alta CIM para doxiciclina (12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 3). Este dado é muito relevante, uma vez que estes antibióticos são também indicados para o tratamento da leptospirose em ambientes não hospitalares ou em casos de alergia ao tratamento tradicional, e esta cepa pertence ao sorogrupo de maior importância epidemiológica da doença (WHO, 2003). Além disso, a cepa CLEP 00001 é mantida no LRNL sob sucessivos repiques semanais, excluindo, assim, o contato com agentes que possam contribuir para o surgimento de resistência aos antimicrobianos, o que reforça a necessidade de maior investigação para esclarecimento deste resultado. Em estudos anteriores não houve relato a respeito dos valores de CIM obtidos para a cepa RGA, com exceção do trabalho realizado por Murray e Hospenthal (2004), onde foi registrada a CIM de 12,5 $\mu\text{g/mL}$  desta cepa de referência com o antibiótico penicilina, em 4

dos 11 testes de reprodutibilidade, mas é preciso levar em consideração a padronização da técnica, que foi primeiramente descrita por este grupo.

Tabela 3. Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cepas em estudo com os principais antimicrobianos utilizados no tratamento da leptospirose, na faixa de concentração de 25µg/mL a 0,01 µg/mL.

CLEP	CIM (µg/mL)				
	Penicilina	Ampicilina	Cefotaxima	Azitromicina	Doxiciclina
00001	0,09	<0,01	<0,01	>25	12,5
00366	25	12,5	6,75	12,5	12,5
00367	0,05	0,02	0,05	>25	25
00368	0,39	0,39	1,56	25	12,5
00370	6,25	1,56	3,16	0,19	25

Fonte: Autoria própria (2023).

Em contrapartida, para essa mesma cepa, foram observadas CIMs baixas para penicilina (0,09 µg/mL), cefotaxima (<0,01 µg/mL) e ampicilina (<0,01 µg/mL), o que reforça a eficácia destes antimicrobianos recomendados por Haake e Levett (2015) no tratamento da leptospirose. Segundo Trucolo e colaboradores (2002) é importante ressaltar que embora a ampicilina seja uma boa opção de tratamento, sua ação é limitada por não ser distribuída a todos os órgãos ou tecidos, como os rins e o coração, comprometendo o tratamento da doença após a fase de bacteremia. A penicilina, recomendada tradicionalmente para o tratamento da leptospirose severa, apresenta como vantagem sua baixa toxicidade, podendo ser administrada pelas vias intramuscular ou intravenosa em altas doses, no estágio inicial da doença (WATT et al., 1988; BRASIL, 2014). Segundo Moreno e colaboradores (2016), há pouca evidência a respeito do surgimento de resistência antimicrobiana para o gênero *Leptospira*, prevalecendo a sensibilidade universal aos beta-lactâmicos como a penicilina.

Um estudo realizado por Miraglia e colaboradores (2013), partindo de isolados de origem humana e animal revelou valores de CIM baixos para os antibióticos penicilina e ampicilina (< 0,125 µg/mL e < 0,25 µg/mL respectivamente), corroborando com nossos resultados e reforçando a eficácia destes antimicrobianos contra o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, o qual representa o principal sorogrupo envolvido na leptospirose humana. Contudo, um estudo realizado por Benacer e colaboradores (2017) registrou a ocorrência de resistência à penicilina G e ampicilina, com MIC de 25µg/mL, frente a um isolado

ambiental pertencente à espécie patogênica *Leptospira kirschneri*, o que ressalta a importância de maior investigação sobre a resistência de bactérias do gênero *Leptospira*, principalmente para as cepas isoladas do ambiente.

Em um outro estudo realizado por Ressler e colaboradores (2008), foram testados 11 isolados da espécie *Leptospira interrogans* contra 13 antibióticos, incluindo penicilina G, ampicilina, cefotaxima, azitromicina e doxiciclina, sendo obtidos valores de CIM baixos (0,25 µg/mL a < 0,016 µg/mL) para estes fármacos, exceto para doxiciclina, que apresentou CIM mais elevadas (2 µg/mL a 0,016 µg/mL), contudo, ainda mais baixo do que o observado em nosso estudo. Em contrapartida, o trabalho realizado por Liegeon, Deloy e Picardeau (2018) testou cepas de origem animal contra diferentes antimicrobianos, incluindo penicilina e doxiciclina, apresentando uma CIM média de 0,06 µg/mL e 1 µg/mL respectivamente para estes fármacos, não sendo observada resistência à doxiciclina.

Com relação aos isolados do Rio Carioca, a cepa CLEP 00366 foi a que apresentou os maiores valores de CIM para penicilina (25 µg/mL), cefotaxima (6,25 µg/mL) e ampicilina (12,5 µg/mL) (Tabela 2). Esta cepa foi isolada do reservatório/aqueduto Mãe D'água, o qual está inserido em uma unidade de conservação, sendo um patrimônio tombado. Segundo Silva (2021), mesmo estando em área cercada de mata, seu entorno possui considerável número de edificações, que podem contribuir para a contaminação deste trecho do Rio Carioca, por meio do lançamento de efluentes domiciliares, levando ao surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos ou até mesmo transferência de genes de resistência entre bactérias.

Em adição, um estudo realizado por De Araújo e colaboradores (2016), revelou a presença de diferentes genes que codificam as carbapenemases, enzimas que atribuem às bactérias resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos (Imipenem, meropenem e ertapenem) detectados diretamente de amostras de água do Rio Carioca e da Lagoa Rodrigo de Freitas, que são as duas importantes matrizes aquáticas urbanas da cidade do Rio de Janeiro, destacando o papel dos ambientes aquáticos como pools gênicos e a possibilidade de disseminação da comunidade.

As cepas CLEP 00367 e CLEP 00368 foram isoladas dos pontos considerados nascentes do Rio Carioca, que estão inseridas em uma área de mata, sob a proteção de uma unidade de conservação e que aparentemente não sofrem impacto direto do processo de urbanização. Todavia, ambas apresentaram CIMs elevadas para os antibióticos doxiciclina e azitromicina (12,5 µg/mL a >25 µg/mL) (Tabela 2). Este dado demanda maior investigação principalmente por conta da classificação taxonômica destas cepas, pois a CLEP 00367 foi classificada como

pertencente à espécie *L. bromii*, capaz de causar infecção moderada a severa (LEVETT et al., 2006), enquanto a CLEP 00368 foi classificada como uma espécie ainda não descrita até o momento (Tabela 2). Reforçando esta ideia, Haake e Levett (2015), apontam a importância de sempre considerar o risco de possível contato humano com as leptospiros através de atividades recreativas ou esportes em corpos aquáticos, sendo uma forma relevante de infecção por leptospiros patogênicos.

A cepa CLEP 00370, isolada do ponto anterior à UTR-Flamengo (E) apresentou os segundos maiores valores de CIM para os antibióticos penicilina (6,25 µg/mL), doxiciclina (25 µg/mL), cefotaxima (3,16 µg/mL) e ampicilina (1,56 µg/mL) (Tabela 2). Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2022), constatou a presença de isolados de *Escherichia coli* resistentes ao trimetoprim, ampicilina, levofloxacino e ciprofloxacino, no mesmo ponto amostral anterior à UTR-Flamengo (E), corroborando com a hipótese de que o lançamento de efluentes de origem hospitalar e doméstico pode influenciar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Neste ponto do rio, as águas podem estar mais degradadas devido ao somatório de todas as ações realizadas ao longo de seu percurso, pois o Rio Carioca percorre próximo a unidades de saúde (Figura 6), constituindo desta forma um grande reservatório para a manutenção de genes de resistência (SILVA, 2021). Assim como para as demais cepas, faz-se necessária maior investigação acerca dos resultados obtidos, uma vez que a CLEP 00370 também foi classificada como uma espécie ainda não descrita até o momento.

Diante da ausência de padrões de comparação tabelados, os valores de CIM encontrados são comparados entre os diferentes antibióticos utilizados nos testes, visando avaliar a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano e assim apontando para a melhor opção de tratamento da leptospirose. Contudo, é preciso considerar que os dados disponíveis na literatura abrangem cepas isoladas de fontes diversas, como humana, animal e ambiental, de modo a dificultar ainda mais a correlação entre os resultados de CIM encontrados em cada estudo. Portanto, os dados a respeito da terapia antimicrobiana para a leptospirose ainda são insuficientes, sendo necessária maior investigação acerca deste tema (BRETT-MAJOR, COLDREN, 2012).

Segundo TROTT (2018) existem poucos dados a respeito de susceptibilidade *in vivo* de *Leptospira* spp., portanto, apesar deste trabalho ter realizado testes *in vitro*, e segundo esse autor os resultados para uma ou mais espécies ou de diferente região geográfica podem não ser extrapoláveis para outro local e que as comparações das CIM utilizando diferentes metodologias podem ser discutíveis, acredita-se que este estudo alcançou seus objetivos de

forma inquestionável, já que trata-se de um trabalho inédito que conseguiu pela primeira vez isolar *Leptospira* spp. do Rio Carioca, associando técnicas de cultivo, sorológicas e moleculares, avaliando também a susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos comerciais.

## 7. CONCLUSÕES

- O artigo de revisão ampliou os conhecimentos sobre a leptospirose, o agente etiológico e as técnicas laboratoriais atuais, contribuindo fortemente para a construção desta tese, pois as principais técnicas abordadas no artigo foram empregadas para o isolamento e identificação dos isolados ambientais, demonstrando a eficácia das técnicas para diferentes materiais;
- A publicação da revisão em um periódico de circulação nacional possibilitou a ampla divulgação de informações atualizadas acerca do diagnóstico da leptospirose para a comunidade científica;
- As metodologias empregadas permitiram o isolamento de *Leptospira* spp. em todos os pontos de coleta, mesmo se tratando de um microrganismo fastidioso;
- Não foi observada contaminação nos tubos com ausência do 5-Fluorouracil, demonstrando a eficácia da filtração em membrana 0,22 $\mu$ m;
- Apesar de não ser uma técnica precisa, pela possibilidade de apresentar reações cruzadas, a MAT permitiu relacionar a cepa isolada da nascente B com o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, o mais prevalente entre os casos de leptospirose;
- O gênero *Leptospira* foi confirmado pela amplificação do gene *rrs* em todos os cinco isolados;
- O sequenciamento do gene *rss* possibilitou a identificação parcial das amostras de ambos os pontos da nascente como *L. broomii* ou *L. inadai*;
- Nas cepas isoladas não foram detectados os genes *flaB* e *lipL41*, marcadores de patogenicidade do subclado P1, excluindo a probabilidade de pertencerem a este grupo;
- A análise filogenética baseada no gene *ppk* das cepas CLEP 00368, 00366 e 00370 mostrou uma correlação genética próxima às espécies *L. idonii* (85,0%), *L. noumeaensis* (88,0%) e *L. bandrabouensis* (98,0%), respectivamente, indicando a possibilidade de pertencerem a espécies do gênero *Leptospira* ainda não descritas;
- A análise filogenética baseada no gene *ppk* da cepa CLEP 00369 demonstrou correlação de 100% com a espécie *Leptospira bandrabouensis*, em contraste com o resultado obtido anteriormente, o qual indicava inespecificidade do gene *rrs*.
- A análise filogenética baseada no gene *ppk* da cepa CLEP 00367 demonstrou uma correlação mais estreita com a espécie *L. broonii* (99%), a qual é capaz de causar doença em humanos;

- A cepa CLEP 00366 apresentou os maiores valores de CIM para todos os antibióticos testados, embora tenha sido isolada de um ponto inserido em área de conservação. Isto pode ser consequência do impacto antropogênico sobre este local, o qual possui considerável número de domicílios no seu entorno, o que pode contribuir para o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos;
- A cepa CLEP 00370, sob condições desfavoráveis de pH e temperatura, foi isolada do ponto mais degradado do Rio Carioca e apresentou os segundos maiores valores de CIM para os antibióticos penicilina, doxiciclina, cefotaxima e ampicilina, corroborando com a hipótese de que ação do homem sobre o meio ambiente pode influenciar na seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos;
- As cepas CLEP 00367 e CLEP 00368 apesar de isoladas das nascentes do Rio Carioca, apresentaram CIMs elevadas para os antimicrobianos doxiciclina e azitromicina, os quais são utilizados para o tratamento ambulatorial da leptospirose, sendo este um resultado que necessita de maior investigação;
- As cepas de *Leptospira* spp. isoladas do Rio Carioca que apresentaram valores altos de CIM para os antibióticos de escolha no tratamento da leptospirose representam um risco para a Saúde Pública, sobretudo por terem sido classificadas como espécies que possivelmente ainda não foram descritas até o momento;
- As informações obtidas neste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de medidas de prevenção quanto aos riscos de infecção tanto em áreas silvestres, quanto em área urbana. É importante considerar os locais com infraestrutura precária, onde pode haver transbordamento de rios e alagamentos após fortes chuvas, o que leva ao estreitamento do contato com as leptospiras.

## 8. DESAFIOS E PERSPECTIVAS

- O principal fator que prejudicou o desenvolvimento deste estudo foi a pandemia por COVID-19, que impediu o curso normal das atividades laboratoriais, limitando o avanço da pesquisa, dentro do cronograma proposto no início do projeto. Embora servidora, a frequência ao laboratório foi reduzida, o que atrasou e comprometeu determinados protocolos;

- Após flexibilização da rotina laboratorial, o projeto foi retomado, mas surgiram outras questões, como a interrupção do atendimento na Plataforma de Sequenciamento de DNA - RPT01A - PDTIS, o que atrasou a identificação molecular das cepas isoladas. Em contrapartida, este problema foi contornado pela colaboração com o Laboratório de Microrganismos de Referência - INCQS-FIOCRUZ. Desta colaboração, surgiu uma orientação que permitiu a obtenção e interpretação dos dados de análise molecular, garantindo os resultados obtidos neste trabalho;

- A partir desta parceria, o trabalho seguirá com a avaliação do genoma completo das cepas em estudo, para confirmação acerca das espécies possivelmente ainda não descritas na literatura, além da avaliação de outras características do genoma que venham a corroborar com os achados deste trabalho de pesquisa.

- Outro detalhe importante é que a rotina do LRNL foi interrompida desde novembro de 2022, devido à mudança para o *campus* Maré, o que comprometeu a reprodutibilidade dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, que estavam sendo realizados neste local. O estudo será retomado para confirmação dos resultados obtidos e posterior publicação.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, Ben; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, Alejandro. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AHMED, Niyaz et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2006.
- AHMED, Siti Aminah et al. Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 19, n. 3, p. 9, 2012.
- AL SALAH, Dhafer Mohammed M. et al. Hospital wastewaters: A reservoir and source of clinically relevant bacteria and antibiotic resistant genes dissemination in urban river under tropical conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110767, 2020.
- ALIA, Siti N. et al. Diagnostic accuracy of rapid diagnostic tests for the early detection of leptospirosis. **Journal of infection and public health**, v. 12, n. 2, p. 263-269, 2019.
- AZALI, Muhammad Azharuddin et al. Molecular characterization of *Leptospira* spp. in environmental samples from North-Eastern Malaysia revealed a pathogenic strain, *Leptospira alstonii*. **Journal of tropical medicine**, v. 2016, 2016.
- BARCELLOS, Christovam; QUITÉRIO, Luiz Antônio Dias. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Revista de Saúde pública**, v. 40, n. 1, p. 170-177, 2006.
- BARRAGAN, Veronica A. et al. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. **Current microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1802-1806, 2011.
- BARRAGAN, Veronica et al. Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 19, p. e01190-17, 2017.
- BENACER, Douadi et al. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. **Microbes and environments**, p. ME12154, 2013.
- BENACER, Douadi et al. Antimicrobial susceptibility of *Leptospira* spp. isolated from environmental, human and animal sources in Malaysia. **Indian journal of medical microbiology**, v. 35, n. 1, p. 124-128, 2017.
- BIERQUE, Emilie et al. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0227055, 2020.
- BHARTI, Ajay R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos Confirmados de leptospirose de 2007 a 2021. [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose-leptospirose/arquivos/anexo1\\_casos\\_conf\\_lepto.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose-leptospirose/arquivos/anexo1_casos_conf_lepto.pdf/view). Acesso em 31 out. 2022.

BRETT-MAJOR, David M.; COLDREN, Rodney. Antibiotics for leptospirosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2012.

BUZELLI, Giovanna Moreti; CUNHA-SANTINO, Marcela Bianchessi da. Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita, SP. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 186-205, 2013.

CAIMI, K.; RUYBAL, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, p. 104241, 2020.

CARDENAS-MARRUFO, Maria Fidelia et al. Seropositivity to leptospirosis in domestic reservoirs and detection of *Leptospira* spp. from water sources, in farms of Yucatan, Mexico. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 14, n. 1, p. 185-189, 2011.

CARRIJO, Renata de Saldanha da Gama Gracie. O efeito da escala geográfica na análise dos determinantes da leptospirose. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

CARVALHO, Delgado de. História da cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Biblioteca Carioca, 1990.

CARVALHO, Mayra Costa da Cruz Gallo de; SILVA, Danielle Cristina Gregorio da. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 735-744, 2010.

CASANOVAS-MASSANA, Arnau et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. **Water research**, v. 130, p. 176-184, 2018.

CASANOVAS-MASSANA, Arnau et al. *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1450-1456, 2020.

CASTRIGNANO, Silvana Beres. Enzimas em biologia molecular. II. Sequenciamento genômico pelo método de Sanger: T7 DNA polimerase, Sequenase e Termo Sequenase. **Bol Inst Adolfo Lutz**, 27(U): art.2, p 1-3, 2017.

CHAKRABORTY, Antara et al. In vitro sensitivity and resistance of 46 *Leptospira* strains isolated from rats in the Philippines to 14 antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5403-5405, 2010.

CHAKRABORTY, Antara et al. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. **Microbiology and immunology**, v. 55, n. 7, p. 494-501, 2011.

CHAIWATTANARUNGRUENGPASIAN, Somjit et al. Potentially pathogenic *Leptospira* species isolated from a waterfall in Thailand. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 71, n. 1, p. 65-67, 2018.

CHO, Sohyun et al. Genetic characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from a mixed-use watershed in northeast Georgia, USA. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 19, p. 3761, 2019.

CHO, S.; JACKSON, C. R.; FRYE, J. G. The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. in surface water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 3-25, 2020.

CHUN, Jongsik et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 1, p. 461-466, 2018.

COSTA, Federico et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

CPTEC/INPE Centro de Previsão de Tempo e Estudo Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2020. Disponível em: <https://www.cptec.inpe.br/>

DA SILVA OGEDA, Mariana; DA ARAÚJO, Thais Ramos; DE SEIXAS FILHO, José Teixeira. Rio carioca: sua história e sua degradação. **Semiotes**, v. 10, n. 3, p. 69-77, 2016.

DE ARAÚJO, Carlos Felipe Machado et al. Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4380-4383, 2016.

DE BRITO, Thales; SILVA, Ana Maria Gonçalves da; ABREU, Patrícia Antonia Estima. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 2018.

DE SOUZA SUGUIURA, Igor Massahiro. Leptospirose no estado do Paraná, Brasil: uma abordagem de saúde única. **Revista de Saúde Pública do Paraná**, v. 2, n. 2, p. 77-84, 2019.

DIAS, A. P.; ROSSO, T.C.A.; GIORDANO, G. A. Historiografia do Rio Carioca da cidade do Rio de Janeiro. Cap 3. **In: Série Temática: Recursos Hídricos e Saneamento Volume 1**. Rio de Janeiro, 2012.

ELLWANGER, Joel Henrique; CHIES, José Artur Bogo. Saúde Única (One Health): uma abordagem para entender, prevenir e controlar as doenças infecciosas e parasitárias. **Bio Diverso**, v. 2, n. 1, 2022.

FAINE S, ADLER B, BOLIN C, PEROLAT P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: Medsci; 1999.

FARIAS et al. Manual de Leptospirose 1997. 3ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 98p.

FERNANDES, Luis GV et al. *Leptospira sanjuanensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from soil in Puerto Rico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 005560, 2022.

FINN, Thomas J. et al. A comprehensive account of *Escherichia coli* sequence type 131 in wastewater reveals an abundance of fluoroquinolone-resistant clade A strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 4, p. e01913-19, 2020.

FRANCA, Dalvino Troccoli. A história do uso da água no Brasil: do descobrimento ao século XX. **Brasília: ANA**, 2007.

GALLOWAY, Renee L.; HOFFMASTER, Alex R. Optimization of LipL32 PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 82, n. 3, p. 199-200, 2015.

GASTEZZI-ARIAS, Paola; ALVARADO-GARCÍA, Virginia; PÉREZ-GÓMEZ, Gabriela. La importancia de los ríos como corredores interurbanos. **Biocenosis**, v. 31, n. 1-2, 2017.

GOARANT, Cyrille. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. **Research and reports in tropical medicine**, v. 7, p. 49, 2016.

GRACIE, R. et al. O efeito da escala geográfica na análise dos determinantes da leptospirose. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, p. 10366-10383, 2014.

GUERNIER, Vanina et al. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006503, 2018.

HAAKE, David A.; LEVETT, Paul N. Leptospirosis in humans. **Leptospira and leptospirosis**, p. 65-97, 2015.

HAMI, Kaboosi; MOHAMMAD, Reza Razavi; ASHRAF, al Sadat Noohi. Efficiency of filtration technique for isolation of leptospires from surface waters: Role of different membranes with different pore size and materials. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 9, p. 671-676, 2010.

INEPAC- Instituto Nacional do Patrimônio Cultural. Tombamento do Rio Carioca. Disponível em: <http://www.inepac.rj.gov.br/index.php/publicacao/leiamais/199/index>. Acesso em: 31 ago. 2022.

JOHNSON, Russell C.; ROGERS, Palmer. 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of leptospirae. **Journal of bacteriology**, v. 87, n. 2, p. 422-426, 1964.

- KAWABATA, Hiroki et al. flaB-Polymerase Chain Reaction (flaB-PCR) and Its Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis Are an Efficient Tool for Detection and Identification of *Leptospira* spp. **Microbiology and immunology**, v. 45, n. 6, p. 491-496, 2001.
- KHAKI, Pejvak. Clinical laboratory diagnosis of human leptospirosis. **International Journal of Enteric Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 1-31859, 2016.
- KIM, Ok-Sun et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt\_3, p. 716-721, 2012.
- KO, Albert I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.
- LEVETT PN. Leptospirosis. **Clin Microbiol Ver.**; v 14, p 296-326, 2001
- LEVETT, Paul N. et al. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 3, p. 671-673, 2006.
- LEVETT, Paul N.; PICARDEAU, Mathieu. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae Minutes of the closed meeting, 10 July 2019, Vancouver, British Columbia, Canada. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 005002, 2021.
- LI, Shijun et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immunity**, v. 16, n. 2, p. 80-92, 2010.
- LIEGEON, Geoffroy; DELORY, Tristan; PICARDEAU, Mathieu. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of *Leptospira*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 5, p. 693-699, 2018.
- LÖFFLER, Dirk; TERNES, Thomas A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1021, n. 1-2, p. 133-144, 2003.
- MARQUEZ, Aurélie et al. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. **International Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 184-193, 2017.
- MCARTHUR, J. V. et al. Patterns of multi-antibiotic-resistant *Escherichia coli* from streams with no history of antimicrobial inputs. **Microbial ecology**, v. 72, n. 4, p. 840-850, 2016.
- MENY, Paulina et al. Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.
- MIRAGLIA, Fabiana et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 77, n. 3, p. 195-199, 2013.

MURGIA, Rossella et al. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. **FEMS Microbiology Letters**, v. 148, n. 1, p. 27-34, 1997.

MURRAY, Clinton K.; HOSPENTHAL, Duane R. Broth microdilution susceptibility testing for *Leptospira* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1548-1552, 2004.

MURRAY, Clinton K. et al. Use of patient-specific *Leptospira* isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic agglutination testing (MAT). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 4, p. 209-213, 2011.

NABITY, Scott A. et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1878, 2012.

NABITY, Scott A. et al. Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the Dual Path Platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized patients. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006285, 2018.

PARQUE NACIONAL DA TIJUCA. Rio Carioca. Disponível em: <https://parquenacionaldatijuca.rio/locais/rio-carioca/>. Acesso em: 31 de ago. 2022.

PEGORARO, Ligia Margareth Cantarelli et al. Biossegurança e saúde única. 7 Dia de Campo do Leite: da Pesquisa para o Produtor, p. 35, 2018.

PEREIRA, João Cláudio Barroso et al. Leptospirose pulmonar. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, v. 13, n. 6, p. 827-839, 2007.

PICARDEAU, Mathieu. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297-307, 2017.

PHILIP, Noraini et al. Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. **PloS one**, v. 15, n. 9, p. e0239069, 2020.

RAMOS, Tatiane Mendes Varela et al. Leptospirose: Características da enfermidade em humanos e principais técnicas de diagnóstico laboratorial. **Rev. bras. anal. clin.**, p. 211-218, 2021.

RAO, Mohan; AMRAN, Fairuz; AQILLA, Nadia. Evaluation of a rapid kit for detection of IgM against *Leptospira* in human. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, 2019.

RAWLINS, Julianne et al. Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on St. Kitts. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 8, p. 7953-7960, 2014.

REIS, J. R. G. et al. Vigilância em Saúde Ambiental: interferência do ambiente na saúde humana em um município de Minas Gerais. **Investigação**, v. 12, n. 2-3, p. 24-9, 2012.

- RESSNER, Roseanne A. et al. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of *Leptospira*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2750-2754, 2008.
- RIEDIGER, Irina N. et al. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005940, 2017.
- REBOISSON, TBS. 28º Opera Prima: Rio carioca. **Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2016.
- RIDZLAN, F. R. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia. **Trop Biomed**, v. 27, n. 3, p. 632-638, 2010.
- ROMERO, Eliete Caló; BLANCO, Roberta Morozetti; YASUDA, Paulo Hideki. Aseptic meningitis caused by *Leptospira* spp diagnosed by polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 988-992, 2010.
- SAITO, Mitsumasa et al. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 2, p. 601-609, 2013.
- SANGER, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, Welika Faria et al. Sequenciamento de dna: métodos e aplicações. In: **Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress**. 2013. p. 139-41.
- SCHEID, Neusa Maria John; FERRARI, Nadir; DELIZOICOV, Demétrio. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. **Ciência & Educação**, v. 11, n. 02, p. 223-233, 2005.
- SCHLEE, Mônica Bahia; CAVALCANTI, Nireu Oliveira; TAMMINGA, Kenneth. As transformações da paisagem na bacia do rio Carioca. **Paisagem e Ambiente**, n. 24, p. 267-284, 2007.
- SILVA, Taíssa de Souza Menezes da. Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos. 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.
- SILVA, Taíssa de Souza Menezes da et al. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de águas superficiais do Rio Carioca-RJ, Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 27, p. 673-682, 2022.
- SILVESTRINI, Angela Ramos; HEINEMANN, Marcos Bryan; DE CASTRO, Alessandra Marnie Martins Gomes. Leptospirose no contexto da Saúde Única e diretrizes de vacinação. **Pubvet**, v. 14, p. 137, 2019.

SMITH, CE Gordon; TURNER, L. H. The effect of pH on the survival of leptospire in water. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 24, n. 1, p. 35, 1961.

SOO, Zoey May Pheng; KHAN, Naveed Ahmed; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. **Acta tropica**, v. 201, p. 105183, 2020.

SUGATHAN, S.; VARGHESE, T. P. Multiplex PCR on leptospiral isolates from Kolenchery, Kerala, India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 114-116, 2005.

TERPSTRA, Wiepko J. et al. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v. 259, n. 4, p. 498-506, 1985.

TROTT, Darren J.; ABRAHAM, Sam; ADLER, Ben. Antimicrobial resistance in *Leptospira*, *Brucella*, and other rarely investigated veterinary and zoonotic pathogens. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6.4. 18, 2018.

TRUCCOLO, Johann et al. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 848-853, 2002.

VASCONCELOS, Cíntia Honório et al. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001? 2009. **Cad. saúde colet.,(Rio J.)**, 2012.

VINCENT, Antony T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019.

WAGGONER, Jesse J.; PINSKY, Benjamin A. Molecular diagnostics for human leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 29, n. 5, p. 440, 2016.

WATSON, James D.; CRICK, Francis HC. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 964-967, 1953.

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

WHITE, ELLEN G. Testemunhos Seletos: Palavras finais de confiança. São Paulo: Casa Publicadora Brasileira (CPB), 1949. v 3, p. 196.

WHO, World Health Organization. International Leptospirosis Society (ILS). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Geneva: World Health Organization.

## ANEXO

Artigo de Revisão/Review

**Leptospirose: Características da enfermidade em humanos e principais técnicas de diagnóstico laboratorial*****Leptospirosis: Characteristics of the human disease and main laboratory diagnostic techniques***Tatiane Mendes Varela Ramos<sup>1</sup>Ilana Teruszkin Balassiano<sup>2</sup>Taíssa de Souza Menezes da Silva<sup>3</sup>Joseli Maria da Rocha Nogueira<sup>4</sup>**Resumo**

A leptospirose é a zoonose de maior distribuição geográfica, com estimativa de cerca de 60.000 mortes por ano. A doença é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que possui mais de 300 diferentes sorovares e 64 espécies já identificadas, sendo o ambiente a principal fonte de contaminação. A doença em humanos apresenta manifestações clínicas variadas e caráter bifásico, devendo ser confirmada por meio do diagnóstico laboratorial. O objetivo deste trabalho foi reunir conceitos atualizados sobre a leptospirose humana e as principais técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas. A MAT é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose, mas devido à baixa sensibilidade na fase inicial da doença é necessário o emprego de técnicas mais sensíveis neste período. Baseado em diversos estudos, as metodologias de PCR, ELISA-IgM e teste rápido apresentaram sensibilidade satisfatória nos primeiros dias após o início dos sintomas. Na segunda semana, a MAT apresentou 100% de sensibilidade, mantendo sua alta especificidade em ambas as fases. No geral, os testes sorológicos de ELISA-IgM e teste rápido apresentaram resultados satisfatórios como métodos de diagnóstico precoce, principalmente tratando-se de locais com pouca infraestrutura, diferente dos laboratórios de referência onde é possível empregar as técnicas de PCR e MAT.

**Palavras-chave**

Leptospirose humana; Espiroquetas; Diagnóstico Laboratorial

**INTRODUÇÃO**

A leptospirose é uma das zoonoses de maior distribuição geográfica presente em praticamente todo o planeta. Estima-se que a cada ano ocorram 1,03 milhão de casos e 58.900 mortes, o que torna a leptospirose uma das zoonoses mais prevalentes no mundo.<sup>(1)</sup> Além disso, dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, no período de 2007 a 2019, foram registrados 48.670 casos confirmados de leptospirose humana e 4.287 óbitos, sendo notificada a maior incidência da doença nas regiões Sul e Sudeste.<sup>(2)</sup>

A doença é causada por espiroquetas invasivas pertencentes ao gênero *Leptospira*, sendo o ambiente contaminado a fonte de infecção indireta para o homem e outros mamíferos.<sup>(3)</sup> A leptospirose humana torna-se epidêmica nas estações chuvosas, quando podem ocorrer enchentes,

sobretudo em cidades com condições inadequadas de saneamento básico, como esgoto a céu aberto e lixões, que propiciam a contaminação da água com urina de roedores, principalmente o *Rattus norvegicus* (rataranas), que habitam comumente esses ambientes.<sup>(4)</sup>

O diagnóstico da leptospirose baseia-se principalmente no teste sorológico pela reação de microaglutinação, que é a técnica reconhecida como padrão-ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde, pela alta sensibilidade e especificidade, porém é limitada a centros de referência. O tratamento é baseado na antibioticoterapia, a qual apresenta maior eficácia nos primeiros dias após início dos sintomas.<sup>(5)</sup>

A eficácia do tratamento para a leptospirose depende principalmente do diagnóstico precoce da doença, o que tem levado à busca por técnicas laboratoriais mais modernas

<sup>1</sup> Doutoranda/Fiocruz (Laboratório de Zoonoses - IOC - FIOCRUZ).<sup>2</sup> Doutorado/Fiocruz (Curadora da Coleção de *Leptospira* - IOC - FIOCRUZ).<sup>3</sup> Mestranda/ENSP (Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fiocruz).<sup>4</sup> Doutorado/Fiocruz (Chefe do Laboratório de Microbiologia - ENSP - FIOCRUZ).

Instituição: ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em: 18/02/2021

Aprovado em: 12/03/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102110

que ofereçam um resultado rápido e confiável, permitindo que a terapia antimicrobiana seja iniciada em tempo hábil para garantir sua eficiência.<sup>(5)</sup>

## OBJETIVO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de reunir conceitos atualizados sobre a leptospirose humana e as principais técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas, ampliando a compreensão a respeito da doença e do seu agente, além de fornecer informações importantes sobre a escolha do melhor método diagnóstico levando em consideração a característica bifásica da doença em humanos.

## METODOLOGIA

O presente artigo de revisão foi constituído a partir de pesquisa bibliográfica baseada em artigos científicos contendo os dados mais relevantes para este trabalho. A busca foi realizada através da ferramenta de pesquisa PubMed, utilizando os termos leptospirose, leptospirosas, taxonomia, ambiente, diagnóstico laboratorial, PCR, MAT, ELISA-IgM e teste rápido, contemplando artigos dos últimos 10 anos, além de revisões clássicas citadas em diversas publicações em leptospirose.

## ETIOLOGIA

O agente etiológico da leptospirose pertence ao gênero *Leptospira*, que compreende um grupo heterogêneo de espécies patogênicas e saprófitas. São espiroquetas que exibem uma forma em espiral longa, fina (0,1 a 0,2µm de diâmetro e 6 a 20µm de comprimento) e flexível, sendo altamente móveis e apresentando uma ou ambas as extremidades em forma de gancho.<sup>(6)</sup> São bactérias aeróbias obrigatórias, com crescimento fastidioso *in vitro*, e podem ser cultivadas em meios líquidos, semissólidos e sólidos, sendo o meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) o mais frequentemente utilizado. A temperatura ideal para o cultivo situa-se na faixa de 28°C-30°C e o tempo de geração em cultura ou em modelos animais é de 6 a 8 horas.<sup>(3)</sup>

As leptospirosas apresentam dois flagelos situados no periplasma que são responsáveis pela motilidade e compostos pelas proteínas FlaA e FlaB.<sup>(6)</sup> A bactéria apresenta uma estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede de peptidoglicana estão intimamente associadas e envolvidas pela membrana externa. Nesta estrutura, o lipopolissacarídeo (LPS) constitui o principal antígeno para *Leptospira*, o qual apresenta uma baixa toxicidade para células animais, quando comparado ao LPS das bactérias Gram-negativas.<sup>(6)</sup> Isto ocorre porque o LPS das leptospirosas difere da macromolécula tipicamente

encontrada nas bactérias Gram-negativas no que diz respeito às atividades biológicas, propriedade que possivelmente está relacionada com a estrutura única do lipídio A do gênero *Leptospira*.<sup>(7)</sup> Outras estruturas presentes na membrana externa são as lipoproteínas (LipL32, LipL21, LipL41, por exemplo), proteínas integrais de membrana e sistemas proteicos de secreção (T2SS, por exemplo).<sup>(8)</sup>

Desde 1907, após sua descrição original por Stimson, o gênero *Leptospira* foi dividido tradicionalmente em dois grupos: saprófitas (*Leptospira biflexa*) e patogênicas (*Leptospira interrogans*). O conceito evoluiu e essas duas espécies foram submetidas a dois esquemas de classificação, um baseado na sorologia, onde o sorovar representa a unidade taxonômica básica, e outro baseado na análise do DNA, o qual utiliza a taxonomia molecular para identificar espécies.<sup>(8)</sup> A classificação sorológica baseia-se na reatividade de antígenos de superfície contra anticorpos específicos, sendo o LPS o antígeno responsável pela diversidade entre os sorovares.<sup>(8)</sup> Por essa classificação já foram identificados mais de 300 sorovares, sendo a maioria patogênicos, agrupados em quase 30 sorogrupos, utilizando o Teste de Aglutinação Microscópica e o Teste de Aglutinação-Absorção Cruzada.<sup>(9)</sup>

Esquemas de classificação molecular envolvem estudos em análise filogenética e consideram também o nível de patogenicidade de cada espécie: saprófitas – presentes no ambiente e não causam infecção; intermediárias – possuem baixa virulência e estão relacionadas à doença branda; patogênicas – virulentas e causam infecção.<sup>(10)</sup> O estudo mais recente, baseado em sequenciamento de *whole-genome* e genômica comparativa, revelou a existência de 64 espécies agrupadas em dois clados principais: saprófitas e patogênicas (inclui espécies responsáveis por doença em homens e animais e espécies ambientais que ainda não tiveram sua virulência elucidada). Estes clados são subdivididos em quatro subclados: P1 – Espécies patogênicas; P2 – anteriormente descritas no grupo intermediário; S1 – 21 espécies anteriormente classificadas no grupo saprófita; S2 – 05 espécies incapazes de estabelecer o processo infeccioso em modelos animais, porém exibem características de crescimento *in vitro* similares às de espécies patogênicas.<sup>(11)</sup>

A grande questão concernente à taxonomia em *Leptospira* é que não há correlação entre as classificações sorológica e genética, pois alguns sorogrupos incluem cepas de até seis espécies diferentes, caracterizando a complexidade deste gênero bacteriano.<sup>(10)</sup> No entanto, é possível identificar um determinado sorovar circulante e assim contribuir com os dados epidemiológicos de uma dada região, empregando-se tanto os métodos sorológicos de referência quanto os moleculares, como por exemplo o PFGE (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*).<sup>(10)</sup>

## LEPTOSPIRAS E O AMBIENTE

As leptospirosas patogênicas colonizam os rins dos reservatórios (várias espécies de mamíferos) e são eliminadas através da urina diretamente no ambiente, onde sobrevivem por longos períodos que podem variar de poucas horas a vários meses, dependendo da espécie do sorovar e das características da matriz ambiental.<sup>(4)</sup>

Os mecanismos que permitem a persistência de leptospirosas patogênicas em ambientes aquosos, fora do hospedeiro, ainda são pouco conhecidos. Alguns estudos demonstraram que o ambiente viscoso favorece a permanência das leptospirosas no solo, tornando-o potencialmente infectante, e como outras espiroquetas, as leptospirosas podem alterar sua morfologia de acordo com as condições ambientais, incluindo agregação celular.<sup>(12)</sup> A aderência é uma estratégia de sobrevivência bacteriana, característica do biofilme, representando um importante fator que pode estar envolvido na persistência das leptospirosas fora do hospedeiro.<sup>(12)</sup>

A formação de biofilme já foi identificada (*in vitro*) para o gênero *Leptospira*, e pode conferir a capacidade de sobrevivência em diversos ambientes, mesmo sob escassez de nutrientes, tanto para as saprófitas quanto para as patogênicas.<sup>(13)</sup> A persistência de cepas virulentas no ambiente (solo ou água) exerce um papel importante, pois constitui uma fonte de patógenos potencialmente infectantes naquele local.<sup>(14)</sup> Após as fortes chuvas, as leptospirosas virulentas presentes no solo entram em suspensão, juntamente com

outras partículas, tornando aquele ambiente aquoso uma fonte de contaminação para o homem e os animais.<sup>(13)</sup>

## MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEPTOSPIROSE

A infecção por bactérias do gênero *Leptospira* pode ser assintomática ou produzir uma ampla variedade de sinais e sintomas que se confundem com outras doenças febris.<sup>(3)</sup> Evidências sorológicas de infecção são encontradas em 15% a 40% dos indivíduos que foram expostos, mas não desenvolveram a doença.<sup>(3)</sup> Nos casos sintomáticos de leptospirose, as manifestações clínicas variam de leve a moderada ou grave, podendo ser fatais. Mais de 90% dos indivíduos sintomáticos apresentam a forma mais branda e, geralmente, anictérica, enquanto a forma grave com icterícia ocorre em 5% a 10% dos pacientes infectados.<sup>(5)</sup>

A forma mais severa da doença, com danos sistêmicos que incluem injúria vascular, hepática, renal, pulmonar e músculo-esquelética, é conhecida como a Síndrome de Weil.<sup>(15)</sup> O período de incubação é de uma a duas semanas, podendo variar de 2 a 30 dias. Nesses casos, a leptospirose em humanos apresenta um caráter bifásico, mas a distinção entre a primeira e a segunda fase nem sempre é tão evidente. A primeira fase, ou fase de bacteremia, corresponde à disseminação das bactérias no sangue e em outros líquidos corporais, com duração de 4 a 7 dias. A segunda fase, ou fase imune (Figura 1), inicia-se com o aparecimento de anticorpos e posterior eliminação das bactérias na urina de forma intermitente, tendo duração de 10 a 30 dias.<sup>(16)</sup>

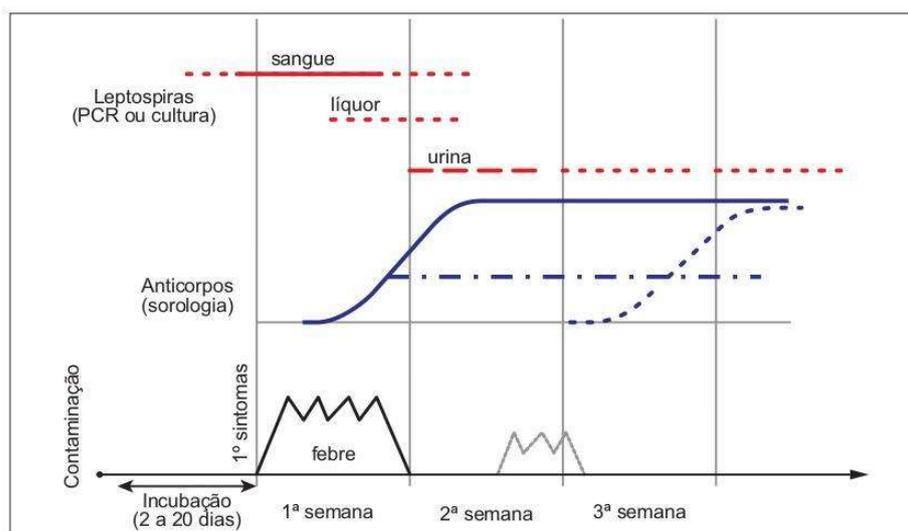


Figura 1. Esquema representando as fases da leptospirose e o emprego das técnicas de diagnóstico laboratorial mais adequadas. Adaptado de Goarant, 2016.<sup>(10)</sup>

## PATOGÊNESE

A primeira etapa na patogênese da leptospirose é a penetração através da barreira tecidual, que é facilitada por abrasões na pele e pelo contato direto com as mucosas da conjuntiva ou cavidade oral.<sup>(7)</sup> Nos períodos chuvosos onde ocorre a imersão em águas de enchentes ou até mesmo nas atividades recreativas aquáticas, o contato com águas contaminadas torna-se um fator de risco para infecção, principalmente pela exposição das mucosas.<sup>(17)</sup>

A transmissão pode acontecer pelo contato direto com um hospedeiro infectado, porém é mais comum através do solo e da água contaminados com urina de animais colonizados pelas leptospirosas. No entanto, atividades que envolvem manejo de animais infectados também são um risco de desenvolver a leptospirose.<sup>(15)</sup>

A segunda etapa na patogênese é a disseminação através da corrente sanguínea. Após atravessar a pele, leptospirosas patogênicas seguem pela circulação sanguínea e persistem nesta via durante a fase de leptospiremia (bacteremia), diferente de outros espiroquetas patogênicos como *B. burgdorferi* e *T. pallidum*, os quais estabelecem a infecção na pele.<sup>(7)</sup>

Os mecanismos envolvidos na patogênese da leptospirose podem ser relacionados tanto aos efeitos diretos das leptospirosas no hospedeiro, quanto à resposta imune à infecção. Um mecanismo importante de virulência é a motilidade, que permite a migração dessas bactérias através de meios viscosos, sendo importante no início da infecção e na sua disseminação desde o sítio de entrada até os alvos dentro do hospedeiro.<sup>(16)</sup>

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A leptospirose não pode ser diagnosticada com base apenas em fundamentos clínicos devido à variabilidade nas manifestações sintomáticas, as quais se assemelham a outras enfermidades, o que torna necessária a confirmação por meio do diagnóstico laboratorial.<sup>(5)</sup>

Segundo Adler (2010), o critério para considerar um resultado indicativo de infecção recente por *Leptospira* spp. é aceito como um título  $\geq 400$  de aglutinação de leptospirosas na MAT, na presença de sinais clínicos e história epidemiológica, ou pelo aumento de quatro vezes no título entre amostras pareadas.<sup>(6)</sup>

Nos primeiros dias da doença, o diagnóstico envolve a detecção direta de *Leptospira* spp. em fluidos como sangue e líquor, pelo cultivo em meio específico (em geral, utiliza-se o meio EMJH) ou a detecção indireta pela técnica da PCR (do inglês *polymerase chain reaction*), pois nesta fase inicial as leptospirosas circulam na corrente sanguínea. A partir da segunda semana, elevam-se os níveis de anticorpos das classes IgM e IgG (Figura 1), aumentando a sensibilidade

dos testes sorológicos, sendo a técnica de aglutinação microscópica (MAT – do inglês *Microscopic Agglutination Test*) o método padrão-ouro para investigação da leptospirose em humanos e animais.<sup>(5)</sup>

### 1. Cultura

Os principais meios de cultura desenvolvidos para o gênero *Leptospira* são o Korthof, Fletcher e Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris (EMJH), sendo este último o mais utilizado na rotina de isolamento de leptospirosas. Com o intuito de minimizar a contaminação do cultivo a partir de amostras clínicas, principalmente nos casos de urina, o antibiótico 5-fluorouracil pode ser empregado na preparação dos meios.<sup>(18)</sup>

As leptospirosas podem ser recuperadas de amostras de sangue e líquor, na fase aguda da doença. No caso de isolamento a partir de amostras de urina, esta deve ser coletada na segunda semana após o início dos sintomas.<sup>(5)</sup> A duração da excreção destas bactérias na urina pode ocorrer por semanas, porém é necessário alcalinizar o pH da amostra, a fim de garantir a viabilidade das bactérias.<sup>(7)</sup>

Os cultivos em meio semissólido são incubados na faixa de 28°C-30°C, por várias semanas (6 a 13), ao abrigo da luz, sendo regularmente examinados ao microscópio de campo escuro para detecção do espiroqueta. Este exame identifica características como morfologia e motilidade, de modo que são necessárias outras técnicas para confirmação do gênero bacteriano e para a identificação da cepa isolada.<sup>(3)</sup>

O isolamento de leptospirosas de espécimes clínicos é a mais forte evidência para a confirmação do diagnóstico e permite a posterior identificação dos sorovares circulantes em uma determinada região.<sup>(7)</sup> No entanto, a técnica apresenta algumas desvantagens, dentre elas o crescimento fastidioso (dias a semanas) e a complexidade na tipagem, que pode demorar até meses e atrasar consideravelmente o diagnóstico.<sup>(5)</sup> Contudo, a despeito das dificuldades, este é o método que melhor contribui para os estudos epidemiológicos da leptospirose. Outro detalhe importante é que a técnica de isolamento deve ser empregada antes do início do tratamento com antibióticos.<sup>(7)</sup>

Um estudo realizado por Boonsilp e colaboradores<sup>(19)</sup> comparou a sensibilidade de detecção de *Leptospira* spp. empregando as técnicas de cultura e PCR. O estudo foi conduzido com 418 pacientes apresentando doença febril aguda a partir de amostras de sangue coletadas em heparina e EDTA para os métodos de cultura e PCR (detecção do gene *rrs*, que codifica o RNA ribossomal 16S), respectivamente. As cepas isoladas foram posteriormente sequenciadas para identificação da espécie. Do total de amostras (418), 39 (9%) foram positivas no cultivo e 81 (19%) foram positivas na PCR (e negativas na cultura). Os resultados deste estudo demonstraram que há uma alta taxa de falso negativo no exame baseado na cultura, comparando-se com a PCR. Além disso, especula-se que o pré-tratamento

com antibióticos pode influenciar na baixa sensibilidade do isolamento por cultivo.

## 2. PCR (*Polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase)

A técnica da PCR tem sido utilizada para a detecção de *Leptospira* spp. a partir de amostras clínicas por muitos anos, objetivando o diagnóstico precoce da leptospirose, que deve ocorrer na fase aguda da doença, ou fase de leptospirose, o que é crucial para que a terapia antimicrobiana seja administrada de forma eficaz (WHO, 2003). A utilização de PCR em tempo real tem sido uma ferramenta de grande importância para agilizar o diagnóstico da leptospirose, principalmente na fase aguda da doença.<sup>(20)</sup>

Atualmente, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos são usadas a partir de amostras de sangue, urina e líquido, e têm como alvo genes específicos tanto para detecção do gênero *Leptospira* (ex: *rrs* e *secY*) quanto para espécies patogênicas (ex: *lfb1*, *lipL32*, *ligA* e *ligB*), de modo que DNA de outros espiroquetas, como *Borrelia* spp., por exemplo, não são amplificados.<sup>(21,22)</sup>

Além da pesquisa em amostras clínicas, o gene *lipL32* tem sido utilizado como alvo para detecção de leptospirose patogênicas em amostras ambientais, pois durante o isolamento, as amostras (água e solo) coletadas podem carrear cepas saprófitas, as quais acabam por se multiplicar mais rapidamente no meio de cultivo e mascarar a presença das patogênicas.<sup>(13)</sup> A detecção indireta pela técnica molecular aumenta a sensibilidade do método, uma vez que este gene está presente em todas as espécies patogênicas, porém ausente nas espécies intermediárias e saprófitas.<sup>(23)</sup>

Os métodos moleculares, embora promissores, deparam-se com a dificuldade de acesso às plataformas, principalmente quando se trata de ambientes remotos ou rurais, além da exigência de alto nível técnico para tal metodologia.<sup>(10)</sup> Outra limitação do diagnóstico da leptospirose baseado em PCR é a incapacidade de identificar tanto a espécie quanto o sorovar infectante.<sup>(7)</sup> Entretanto, esta informação pode não ser significativa para o tratamento individual do paciente, mas é de grande importância para a vigilância epidemiológica.<sup>(7)</sup> Apesar das limitações relacionadas às técnicas moleculares, a demonstração da presença de leptospirose patogênicas ou de seu DNA, em qualquer um dos fluidos biológicos mencionados anteriormente, permite o diagnóstico precoce, definitivo e correto da leptospirose.<sup>(10)</sup>

## 3. Testes sorológicos

Devido à baixa sensibilidade do isolamento de leptospirose em cultura e das dificuldades técnicas encontradas em alguns laboratórios para a realização da PCR, a maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada pela sorologia. Na primeira fase da doença, 5 a 7 dias após o início dos sintomas, os anticorpos da classe IgM já são detectáveis.

A partir da segunda semana, ambas as classes IgM e IgG podem ser detectadas pelas técnicas sorológicas.<sup>(5)</sup>

### 3.1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

A complexidade do teste de MAT leva ao emprego de testes sorológicos mais simples, que podem ser utilizados na fase aguda da doença, permitindo o diagnóstico precoce da leptospirose. ELISA é uma técnica que tem sido amplamente utilizada no diagnóstico da leptospirose, pela detecção dos anticorpos da classe IgM, que tem maior importância quando se trata de amostras coletadas na fase aguda da doença, pois este anticorpo está presente na primeira fase da resposta imune.<sup>(24)</sup>

Existem muitos testes ELISA-IgM comerciais e a maior parte deles utiliza a espécie *Leptospira biflexa* (saprófita) para preparação de antígeno, pois apresenta reação cruzada com espécies patogênicas através de antígenos de superfície como o LPS, o que torna possível a detecção de anticorpos gerados contra uma cepa patogênica na amostra clínica.<sup>(25)</sup> Lipoproteínas recombinantes como a LipL32 ou LigA também foram desenvolvidas como preparação de antígenos para este teste.<sup>(8)</sup>

Além da praticidade e reprodutibilidade, outra vantagem do ELISA é que não requer a manutenção de culturas de antígenos vivos, como na MAT, o que é trabalhoso e de alto custo, restrito a centros de referência. Por outro lado, uma grande desvantagem desta técnica é que, sozinha, não pode assegurar o diagnóstico final, sendo necessária a confirmação pela MAT.<sup>(5)</sup>

Um estudo realizado por Rosa e colaboradores<sup>(26)</sup> demonstrou a eficácia do teste de ELISA-IgM como teste rápido para detecção precoce da doença, devido à alta sensibilidade, contribuindo para o melhor prognóstico dos pacientes e diminuindo a letalidade da doença. Estes achados sugerem que, embora não apresente a mesma especificidade do padrão-ouro (MAT), o teste pode ser utilizado como triagem em locais com pouca infraestrutura, o que contribui para o diagnóstico precoce da leptospirose.

### 3.2. Teste rápido

Qualquer esforço no desenvolvimento de um novo kit de diagnóstico rápido para leptospirose é valioso e significativo, pois permite o início do tratamento de forma adequada, oferecendo um bom suporte laboratorial. Os kits de teste rápido para leptospirose disponíveis no mercado também se baseiam na detecção do anticorpo IgM, justificando seu emprego na fase inicial da doença.<sup>(27)</sup>

Nabity e colaboradores<sup>(28)</sup> realizaram um estudo para testar a precisão do teste rápido DPP (do inglês, *Dual Path Platform*), em amostras de casos severos e brandos de leptospirose. A sensibilidade em amostras de soro pareadas foi de 100% e 73% para doença severa e branda,

respectivamente. Na fase aguda o ensaio alcançou a sensibilidade menor para leptospirose severa e branda (85% e 64%, respectivamente). A sensibilidade do teste também foi similar ao ELISA-IgM. Os resultados demonstraram que o teste DPP apresentou uma performance aceitável para o diagnóstico da leptospirose severa e pode ser facilmente implementado em hospitais e postos de saúde. Contudo, a precisão do teste pode ser melhorada para os casos de doença branda e no estágio inicial, onde os sintomas são confundíveis com outras doenças febris, como dengue e hepatite, em regiões de alta transmissão da leptospirose.

Posteriormente, Nabity e colaboradores<sup>(29)</sup> avaliaram a precisão do teste rápido DPP através de outro estudo, partindo de três tipos de amostra: gota de sangue (dedo), sangue venoso total em EDTA e soro. Os resultados demonstraram uma sensibilidade para leptospirose clássica de 93% para amostras de gota de sangue e 96% para sangue venoso total, ambos maiores que para o soro. Concluíram, então, que houve uma boa performance do teste DPP para amostra coletada de forma mais simples (gota), nos casos de leptospirose clássica, o que demonstra a viabilidade de utilização do teste em pequenas unidades de saúde.

Outros testes rápidos disponíveis no mercado também foram submetidos a avaliação de precisão, como o *Leptocheck-WB* e o teste *ImmuneMed Leptospira IgM Duo Rapid*. Alia e colaboradores<sup>(30)</sup> testaram amostras de pacientes com suspeita de leptospirose utilizando esses dois kits. A sensibilidade e especificidade gerais foram 47,37% e 80,65% para o *Leptocheck-WB* e 21,05% e 90,32% para o teste *ImmuneMed Leptospira IgM Duo Rapid*. Comparando os resultados a partir de amostras positivas previamente confirmadas na MAT, o primeiro teste mostrou maior sensibilidade (90,72%) do que o segundo (40,21%), porém os valores de especificidade foram similares, sendo 82,89% para o primeiro e 88,89% para o segundo. Com base nos resultados deste estudo, o teste *Leptocheck-WB* foi considerado o mais sensível para o rastreamento da leptospirose em ambientes hospitalares.

### 3.3. Teste de Aglutinação Microscópica (MAT, do inglês *Microscopic Agglutination Test*)

O MAT é uma técnica baseada na aglutinação antígeno-anticorpo, sendo o teste de referência para o diagnóstico da leptospirose, reconhecido como “padrão-ouro”. Esta técnica detecta anticorpos de ambas as classes, IgM e IgG, e determina o título de anticorpos, diferenciando infecção recente de contato prévio.<sup>(5)</sup>

O princípio da técnica é simples e consiste na reação do soro-teste com culturas de leptospiros, observando então a formação de aglutinação ao microscópio de campo escuro em duas etapas. Na primeira observa-se apenas a formação de aglutinação e na segunda etapa, os soros são diluídos serialmente para determinação do título (recíproca da diluição). O ponto final de leitura é aquele em que se observa 50%

de aglutinação ou de leptospiros livres, quando comparado ao controle do antígeno (sem soro). Utiliza-se uma bateria de antígenos vivos, representantes de 19 diferentes sorovares, recomendados pela OMS.<sup>(5)</sup> Este número é limitado diante da diversidade de sorovares já reconhecidos e pode não contemplar um sorovar desconhecido em uma determinada região. Por conta disso, a cepa saprófita Patoc I (*L. biflexa*) está incluída na bateria de antígenos, pois apresenta reação cruzada com vários sorovares patogênicos.<sup>(31)</sup>

O MAT não tem a capacidade de detectar o sorovar infectante, uma vez que, dentro de um mesmo sorogrupo, todos os sorovares pertencentes a ele podem apresentar títulos similares, caracterizando uma reação inespecífica em nível de sorovar.<sup>(7)</sup> Por esta razão, a interpretação da MAT é complexa, em especial na fase aguda da doença, onde ocorre alto grau de reação cruzada entre diferentes sorogrupos, o que difere da fase convalescente, onde se observa relativa especificidade de sorogrupo.<sup>(7)</sup>

Outro ponto a ser considerado é a dificuldade de concluir o diagnóstico da leptospirose pela MAT na fase inicial da doença, principalmente porque, em muitos casos, é necessária a análise de uma segunda amostra, o que se torna um desafio, uma vez que a maioria dos pacientes ambulatoriais não retorna para segunda coleta.<sup>(32)</sup> Além disso, os demais testes sorológicos empregados no diagnóstico laboratorial da leptospirose devem ser comparados a MAT, avaliando os critérios de especificidade e sensibilidade.<sup>(5)</sup>

Niloofoa e colaboradores<sup>(33)</sup> conduziram um estudo com pacientes diagnosticados clinicamente para leptospirose e as amostras foram submetidas aos testes de MAT, ELISA-IgM e teste rápido (*Leptocheck -WB*). Nas amostras coletadas na fase aguda da doença, a MAT apresentou especificidade e sensibilidade de 95,7% e 55,3% respectivamente, comparando-se com o resultado da MAT total (fase aguda + fase convalescente – 100%). O teste rápido e o ELISA-IgM apresentaram sensibilidade similar, comparando-se com a MAT na fase aguda, apesar do ELISA-IgM mostrar maior especificidade (84,5%) que o teste rápido (73,3%). Segundo os pesquisadores, os resultados indicaram que o ELISA-IgM pode ser superior à MAT durante a fase aguda como método de diagnóstico precoce, e o teste rápido também apresentou-se adequado para este propósito.

Em contrapartida, Araghian e colaboradores<sup>(34)</sup> realizaram um estudo mais recente comparando as técnicas de MAT e ELISA-IgM em amostras de pacientes sintomáticos com suspeita de leptospirose. Os resultados revelaram uma sensibilidade de 82,4% no ELISA-IgM, comparado à sensibilidade de 100% na MAT. Os valores de especificidade mostraram uma diferença significativa entre os dois métodos (MAT – 100%, ELISA-IgM – 78,8%), mantendo a categoria de padrão de diagnóstico para a MAT.

Segundo Philip e colaboradores,<sup>(32)</sup> uma forma de melhorar a eficiência no diagnóstico da leptospirose é

associar outra técnica à MAT, quando se trata de amostras coletadas na fase aguda. De acordo com os resultados deste estudo, o emprego da técnica de PCR em conjunto com a MAT aumentou a eficácia no diagnóstico da doença, comparando-se com o uso das técnicas individualmente.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, que pode levar ao óbito, quando ocorrem manifestações mais severas. Com o intuito de melhorar o prognóstico dos pacientes e iniciar o tratamento adequado, muitos estudos têm sido conduzidos para o desenvolvimento de técnicas mais simples e rápidas, que permitam o diagnóstico precoce e acurado da leptospirose.

Todas as técnicas conhecidas até o momento precisam ser comparadas à MAT, que permanece como o teste padrão-ouro, reconhecido pela OMS. Contudo, por ser uma técnica complexa e laboriosa, torna-se inviável em locais sem a infra-estrutura dos centros de referência.

O emprego de técnicas de diagnóstico precoce, quando ajustadas às diferentes fases da doença, pode oferecer bons resultados, permitindo, assim, o início da terapia antimicrobiana dentro do intervalo de tempo em que seja efetiva, diminuindo, assim, o agravamento dos casos de leptospirose e possíveis intimações. Além disso, o conhecimento das técnicas disponíveis e a viabilidade do uso de cada uma delas, no contexto logístico do laboratório disponível para o diagnóstico, reflete um melhor manejo de insumos, equipamentos e mão de obra especializada, o que implicará a rapidez e melhoria do diagnóstico bem como a brevidade do tratamento deste agravo nos casos positivos, como também a redução dos índices de óbitos por essa enfermidade em nosso país.

### Abstract

*Leptospirosis is the most widespread zoonosis, which has a balance of almost 60,000 deaths per year. Bacteria of *Leptospira* genus, which has more than 300 different serovars and 64 species already identified, cause the disease, being the environment the main source of contamination. The human disease presents a large set of clinical manifestations, showing biphasic presentation, the reason why leptospirosis must be confirmed by laboratory diagnosis. This study aimed to group recent concepts concerning human leptospirosis and the main diagnosis techniques employed at the laboratory. MAT is considered the gold standard for leptospirosis diagnosis, but has low sensitivity on the onset of disease, leading to the use of techniques with higher sensitivity on this period. Based on several studies, PCR, ELISA-IgM and rapid test presented satisfactory sensitivity on the onset of symptoms. In the second week, MAT showed 100% of sensitivity, maintaining its high specificity in both phases. In general, the ELISA-IgM and rapid serological tests showed satisfactory results as methods for early diagnosis, especially in the case of places with poor infrastructure, different from the reference laboratories where it is possible to use the PCR and MAT techniques.*

### Keywords

*Human leptospirosis; Spirochaetes; Laboratory Diagnosis*

## REFERÊNCIAS

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9): e0003898.
- BRASIL. Casos Confirmados de leptospirose de 2007 a 2019. 2020. Disponível em: <<http://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/07/casos-conf-lepto-2007-2019.pdf>> acessado em: 03/01/2021.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: Medsci; 1999.
- Casanovas-Massana A, Costa F, Riediger IN, Cunha M, Oliveira D, Mota DC, et al. Spacial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. *Water Research*. 2018; 130: 176-184.
- World Health Organization (WHO): International Leptospirosis Society (ILS). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Geneva: World Health Organization.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirose. *Vet Microbiol*. 2010; 140: 287-296.
- Haake DA e Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387: 65-97.
- Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol*. 2017; 20(4): 184-193.
- Guemier V, Goarant C, Benschop J, Lau CL. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(5): e0006503.
- Goarant C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res Rep Trop Med*. 2016; 7: 49-62.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bemet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(5): e0007270.
- Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA. Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water. *Curr Microbiol* 2011; 62: 1802-6.
- Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE*. 2020; 15 (1): e0227055.
- Kumar KV, Lall C, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 2015; 91: fiv051.
- De Brito T, da Silva AMG, Abreu PAE. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018;60:e23
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:757-71.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol. Ver*. 2001; 14: 296-326.
- Johson RC, Rogers P. 5-Fluorouracil as a Selective Agent for Growth of Leptospirae. *J Bacteriol*. 1964; 87: 422-6.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Day NP, Peacock SJ. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases*. 2011; 11:338.
- Riediger IN, Stoddard RA, Ribeiro GS, Nakatani SM, Moreira SDR, Skraba I, et al. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic leptospira lipL32- based real-time PCR assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(9): e0005940.
- Waggoner JJ e Pinsky BA. Molecular diagnostics for human leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2016 Oct; 29(5): 440-5.
- Galloway RL and Hoffmaster AR. Optimization of LipL32 PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82: 199-200.

23. Rawlins J, Portanova A, Zuckerman I, Loftis A, Ceccato P, Willingham AL, et al. Molecular Detection of Leptospiral DNA in Environmental Water on St. Kitts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014; 11: 7953-7960.
24. Soo ZMP, Khan NA, Siddiqui R. Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. *Acta Tropica*. 2020; 201: 105183.
25. Khaki P. Clinical laboratory diagnosis of human leptospirosis. *Int J. Enteric Pathog.* 2016; 4: e 31859.
26. Rosa MI, dos Reis MF, Simon C, Dondossola E, Alexandre MC, Colonetti T, Meller FO. IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet.* 2017; 22(12):4001-12.
27. Rao M, Amran F, Aqilla N. Evaluation of a rapid kit for detection of IgM against *Leptospira* in human. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2019; 1-4.
28. Nabity SA, Ribeiro GS, Aquino CL, Takahashi D, Damião AO, Gonçalves AH, et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(11): e1878.
29. Nabity SA, Hagan JE, Araújo G, Damião AO, Cruz JS, Nery N, et al. Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the dual path platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(2): e0006285.
30. Alia SN, Joseph N, Philip N, Azhari NN, Garba B, Masri SN, Sekawi Z, Neela VK. Diagnostic accuracy of rapid diagnostic test for the early detection of leptospirosis. *J Infect Public Health.* 2019; 12(2):263-9.
31. Murray CK, Gray MR, Mende K, Parker TM, Samir A, Rahmam BA, et al. Use of a patient-specific isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic agglutination testing (MAT). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011; 105: 209-213.
32. Philip N, Affendy NB, Masri SN, Yuhana MY, Than LTL, Sekawi Z, et al. Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. *PLoS ONE.* 2020; 15(9): e0239069.
33. Niloofa R, Fernando N, Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, Dikmadugoda N, et al. Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. *PLoS ONE.* 2015; 10(6): e0129236.
34. Araghian A, Elmi A, Farahbakhsh M, Hosseini S, Faezi S. Seroepidemiology of leptospirosis in Guilan province, northern Iran: comparison between MAT and IgM-ELISA techniques. *J Infect Dev Ctries.* 2018; 12(2):109-114.

Correspondência

**Joseli Maria da Rocha Nogueira**

Laboratório de Microbiologia

Departamento e Ciências Biológicas

Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Manguinhos

Rio de Janeiro-RJ, Brasil

E-mail: joselimaria@gmail.com