

Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico

Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey

Claudiomar Soares Brod¹, José Antonio Guimarães Aleixo², Sandra Denise Dorneles Jougard², Cláudia Pinho Hartleben Fernandes¹, José Luís Rodrigues Teixeira¹ e Odir Antônio Dellagostin²

RESUMO

A leptospirose canina é conhecida como enfermidade de Stuttgart desde 1898, sendo os cães, depois dos roedores, considerados como a segunda principal fonte de infecção para o homem. O isolamento de um sorovar patogênico da urina de um cão, laboratorial e clinicamente identificado como tendo leptospirose, e sua utilização para testar amostras de soro de casos de leptospirose humana e canina, evidenciou a sua importância no ecossistema da região sul do Brasil. Os resultados do teste de soroaglutinação microscópica indicaram que 100% das amostras de soro humano de 12 pacientes do banco de soro de 2001 do Centro de Controle de Zoonoses, que haviam reagido com títulos que variaram de 25 a 3.200 para o sorovar canicola, e 72% das amostras de 105 soros caninos do mesmo banco de soro, também reagiram contra o novo isolado. O título médio e mediana dos soros humanos testados com a bateria de antígenos recomendada pela OMS, foi respectivamente 630 e 100, ao passo que os testados com o isolado foi de 1.823 e 400. Nos soros caninos, os títulos foram respectivamente de 347 e 100 para a bateria e de 1.088 e 200 para o isolado.

Palavras-chaves: *Leptospira*. Isolamento. PCR. Sorologia.

ABSTRACT

Canine leptospirosis has been known as Stuttgart disease since 1898, and dogs are considered to be the second principal source of infection in man. The isolation of a pathogenic serovar from dog urine that was diagnosed clinically and laboratorial as having leptospirosis and its utilization to test serological samples of human and canine cases of leptospirosis, has demonstrated its importance to the ecosystem of the southern region of Brazil. The results of the serological microscopic agglutination test indicated that 100% of human serum samples from 12 patients from the serum bank of 2001 at the Center for Control of Zoonoses, that had titers between 25 and 3,200 with the canicola serovar, and 72% of 105 canine serum samples from the same serum bank, also reacted with the new isolate. The mean and median titers of the human serum samples tested with the battery of antigens recommended by WHO was 630 and 100 respectively, and when tested with the isolate it was 1,823 and 400. In the dog sera, the values were respectively 347 and 100 with the battery, and 1,088 and 200 with the isolate.

Key-words: *Leptospira*. Isolation. PCR. Serology.

1. Centro de Controle de Zoonoses da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2. Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Endereço para correspondência: Prof. Claudiomar Soares Brod. Centro de Controle de Zoonoses/UFP. Campus Universitário. Prédio nº 42, 96010-900 Pelotas, RS. Tel: 55 53 3275-7307; Fax: 55 53 3275-7551

e-mail: clauhart@terra.com.br

Recebido em 14/12/2002

Aceito em 16/4/2005

Infecções com *Leptospira interrogans* foram reconhecidas pela primeira vez no Brasil, em 1917, no Paraná²¹. Em 1930, foi identificado o primeiro caso de leptospirose humana ocorrido na Cidade de São Paulo, onde o sangue do paciente foi inoculado em cobaias, reproduzindo-se experimentalmente a doença²⁵. No Rio de Janeiro, em 1940, 11 cães com manifestações clínicas compatíveis com leptospirose foram submetidos à necropsia para confirmar a presença do agente causador da leptospirose em cães no Brasil⁸. Em 1954, descreveu-se um caso de febre canicola humana, relacionando o sorovar canicola ao contato com os cães, que seriam freqüentemente infectados por este agente³².

Os cães são os hospedeiros do sorovar canicola e, em populações não vacinadas, a incidência de infecção por este sorovar pode ocorrer de 50 a 75%⁵. Os ratos são os hospedeiros do sorovar icterohaemorrhagiae, mas os cães são freqüentemente hospedeiros acidentais deste agente²⁹.

A inclusão de cepas de leptospira, isoladas dos locais onde há ocorrência de casos, na bateria de antígenos padrão para diagnóstico, a qual é constituída de isolados de diferentes ecossistemas e distribuída pela OMS, justifica-se pelo aumento na especificidade e sensibilidade do teste de aglutinação microscópica (MAT), devido à particularidade antigênica entre as cepas de *Leptospira* patogênica. Na Índia, no ano de 2000, após o isolamento de 296 espiroquetas de 1348 culturas de rins de quatro espécies de roedores, foi recomendada a inclusão da *L. inadai*, espécie identificada em maior número, na bateria de antígenos leptospirais usada para estudos soroepidemiológicos^{10 13}.

No Município de Pelotas, a avaliação da prevalência e fatores de risco à leptospirose canina, identificou a prevalência de 28,9% em cães domiciliados, sendo predominante as reações para os sorovares canicola e icterohaemorrhagiae. O mesmo estudo conclui que cães mantidos em pátios abertos apresentaram risco duas vezes maior para contrair a doença e a ausência de esgoto na residência dos proprietários dos cães foram os principais fatores de risco à leptospirose¹². Estudo semelhante, realizado na zona rural do Município de Pelotas, identificou os sorovares icterohaemorrhagiae, copenhageni, australis e canicola como os mais freqüentes. Neste estudo, o contato dos cães com açudes, banhados e a localização dos animais em propriedades com altitudes inferiores a 100m foram os principais fatores de risco à leptospirose canina¹⁷.

Na área de abrangência do Centro de Controle de Zoonoses de Pelotas (CCZ-Pelotas), a análise de 425 amostras de soros de cães errantes, evidenciou a prevalência de 34,8% de leptospirose canina, sendo os sorovares canicola e icterohaemorrhagiae os mais freqüentes. A prevalência da doença, naquele período, esteve diretamente associada aos fatores climáticos de temperatura elevada e alta precipitação pluviométrica; biológicos, pela presença de reservatórios domésticos e/ou silvestres nos locais de ocorrência de casos; e pelo fator econômico-social. Estes três fatores associados foram importantes para a manutenção das leptospirosas no ambiente e conseqüentemente para a ocorrência da infecção canina, podendo ocorrer infecção do homem³.

Quanto ao estudo da leptospirose humana realizado através da MAT, de 386 amostras de soros de trabalhadores do serviço

de saneamento ambiental do Município de Pelotas, ocorreu a prevalência de 10,4% de soros reagentes. Este resultado comprova que profissionais envolvidos com esse tipo de atividade apresentam alto risco de contrair leptospirose, devido ao contato direto com ambientes contaminados por urina de roedores e carnívoros domésticos¹. Em relato de cinco casos clínicos, de pacientes internados no Hospital Universitário de Rio Grande, quatro pacientes apresentaram síndrome de Weil e um caso oligossintomático e anictérico. Os pacientes apresentaram leptospiremia, leptospirúria e sorologia positiva para os sorovares pomona, icterohaemorrhagiae e bataviae. Porém, em um caso de síndrome de Weil o soro não foi reagente na MAT e somente foi identificada leptospiremia e leptospirúria²⁴. A presença de espiroquetas foi constatada em 196 amostras de soro de pacientes suspeitos de leptospirose, sendo que 196 apresentavam espiroquetas no sangue e destes somente 166 apresentaram correspondência de anticorpos¹¹, tanto no teste de aglutinação macroscópica (SAT) e/ou na de aglutinação microscópica (MAT) com antígenos vivos.

Devido à controvertida interpretação diagnóstica em casos de leptospirose e da recomendação da utilização de cepas locais no diagnóstico, descreve-se neste trabalho, o isolamento de um sorovar de *L. interrogans*, sua caracterização sorológica e molecular e seu desempenho na detecção de anticorpos antileptospira em uma bateria de soros humanos e caninos suspeitos de leptospirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Caso clínico. Um cão SRD, de nome *Tande*, macho, com 4 anos de idade, pesando 9kg, procedente de uma clínica veterinária do Município de Pelotas, apresentava temperatura de 40°C, dificuldade de movimentação do trem posterior, apatia, anorexia, dor à palpação abdominal e dos membros posteriores. Foi realizado tratamento antipirético e antiinflamatório. No segundo dia, o animal obteve melhora acentuada, com movimentação normal e apetite recuperado. No terceiro dia, após consumo de alimento enlatado, o cão apresentou vômito, sendo então preconizado antiemético. No oitavo dia, ocorreu diarreia com sangue e vômito de cor amarelada, sendo administrado reconstituente da microbiota intestinal e antiemético. No nono dia, ocorreu melhora do estado geral, sendo mantido tratamento por mais dois dias. No décimo quarto dia, o animal apresentou salivação sangüinolenta, necrose de toda a borda da língua, desidratação moderada e temperatura de 39°C. Foi procedida a hospitalização do animal e envio de amostra de urina para o CCZ. Neste momento, foi iniciada a antibióticoterapia com penicilina G potássica, penicilina G procainica e dihidroestreptomicina; soroterapia com Ringer com lactato e solução de própolis em spray. No décimo quinto dia, foi enviada amostras de sangue heparinizado para o CCZ. No décimo sexto dia, o cão apresentou melhora, com a língua em processo de cicatrização avançado. No décimo nono dia, após cinco dias de hospitalização, com respostas positivas ao tratamento e estado geral próximo ao normal, o cão apresentou hematúria,

dor à palpação abdominal e ataxia dos membros posteriores pelo período da manhã; taquipnéia e taquicardia à tarde e óbito às 22 horas.

Pesquisa direta de espiroquetas no sangue, em microscopia de campo escuro (BDFM). Foi realizada a pesquisa de espiroqueta no sangue heparinizado, após centrifugação a 3.000 x g por 5 minutos. Foram examinados 5µL do sobrenadante entre lâmina e lamínula (18X18mm), utilizando-se objetivas de 40X, ocular de 15X e condensador de campo escuro a seco. A visualização de uma ou mais espiroquetas com morfologia e movimentação características, indicava diagnóstico positivo.

Pesquisa direta de espiroquetas na urina, em microscopia de campo escuro (UDEM). As amostras de urina coletadas em potes estéreis foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos. Desprezou-se o pellet e centrifugou-se o sobrenadante a 14.000 x g a 5°C por 20 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, o pellet foi suspenso em 100µL de PBS (pH 7,2). Foram examinados 5µL, entre lâmina e lamínula (18X18mm), utilizando-se objetivas de 40X, ocular de 15X e condensador de campo escuro a seco. A visualização de uma ou mais espiroquetas com morfologia e movimentação características, indicava diagnóstico positivo.

Inoculação em hamster. Foi inoculado intraperitonealmente, 1mL da urina do cão, em quatro hamsters sírio capa dourada, recém-desmamados (20 dias), os quais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos e óbito.

Inoculação em meio de cultura EMJH. Procedeu-se a diluição seriada da urina do cão (10^{-1} a 10^{-5}) em PBS (pH 7,2) e inoculou-se 0,5mL de cada diluição em três séries de três tubos contendo 5mL dos seguintes meios de cultura líquidos: EMJH enriquecido a 10% com soro de coelho; EMJH enriquecido a 10% com albumina bovina e TSB. Também foi inoculada uma série de três tubos de meio EMJH semi-sólido enriquecido com albumina bovina. Os tubos inoculados foram incubados por 24 horas a 37°C, passando após para estufa a 30°C, sendo acompanhado o crescimento de leptospiros macro e microscopicamente.

Preparação das amostras para PCR. amostra de urina na quantidade de 10mL foi centrifugada a 15.000 x g por 20 minutos a 5°C. O pellet lavado duas vezes com 500µL de PBS (pH 7,4) foi ressuspenso em 50µL de PBS (pH 7,4) e aquecido a 100°C por 10 minutos, para extração do DNA.

PCR. Primers A e B²², correspondendo aos nucleotídeos 38 a 57 e 348 a 368 na estrutura primária do gene *rrs* que codifica para o RNA ribossomal 16S de *L. Interrogans* foram utilizados. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 10µL da amostra, 2,5µL de tampão 10X contendo 2,5mM de MgCl₂, 0,5µL de dNTP 10mM, 150ng de cada primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Gibco BRL). Para processar a reação utilizou-se um termociclador Perkin Elmer 2.400 (PE Biosystems) programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min, e polimerização a 72°C também por 1 min. Para finalizar,

a reação foi submetida a 72°C por 7 min. O produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (0,05µg/µL), e a visualização foi feita em transiluminador com luz ultravioleta. O resultado foi fotografado utilizando-se uma câmera digital Kodak EDAS 40.

Sequenciamento. Após purificação do produto do PCR com a utilização do kit "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), seguindo as instruções do fabricante, o DNA foi enviado para o Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan em São Paulo, para ser sequenciado pelo método de Sanger, utilizando os próprios primers usados no PCR. A reação utilizou a tecnologia do *dye terminator* em sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

Identificação do sorovar. A seqüência parcial do rDNA 16S obtida foi comparada com as seqüências de rDNA 16S de organismos representados na base de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta comparação foi feita usando BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool).

Inquérito sorológico. Para o inquérito sorológico, foi utilizado o teste de MAT conforme recomendado¹⁰, incluindo 52 culturas de leptospiros representantes das espécies genômicas *interrogans*, *borgpetersenii*, *weilii*, *kirshneri*, *noguchii*, *santarosai*, *biflexa*, *illini*, *fainei* e *meyeri*, constando os sorogrupos *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Bataviae*, *Canícola*, *Celledoni*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Panama*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Sejroe*, *Shermani*, *Tarassovi*, *Andamana*, *Semaranga*, *Djasiman*, *Mini*, *Illini*, *Doberdo*, *Louisiana*, *Garcia*, *Nazaré* e *Pulpudeva*. O teste foi considerado positivo se a partir de uma diluição de 1:25 fosse encontrado 50% ou mais do antígeno aglutinado, ou se a densidade do antígeno, no complexo antígeno anticorpo, fosse menor que 50%.

Soros humanos. Foram utilizadas 20 amostras de soro humano reagentes para o sorovar canicola, com títulos que variaram de 25 a 3.200, provenientes do banco de soros do CCZ, ano de 2001.

Soros caninos. Foram utilizados 105 soros caninos do banco de soros 2001 do CCZ, dos quais 52,4% eram soro reagentes com pelo menos um sorovar da bateria de antígenos para diagnóstico, sendo os sorovares *illini*, *canicola*, *ballum*, e *bratislava* os mais prevalentes.

RESULTADOS

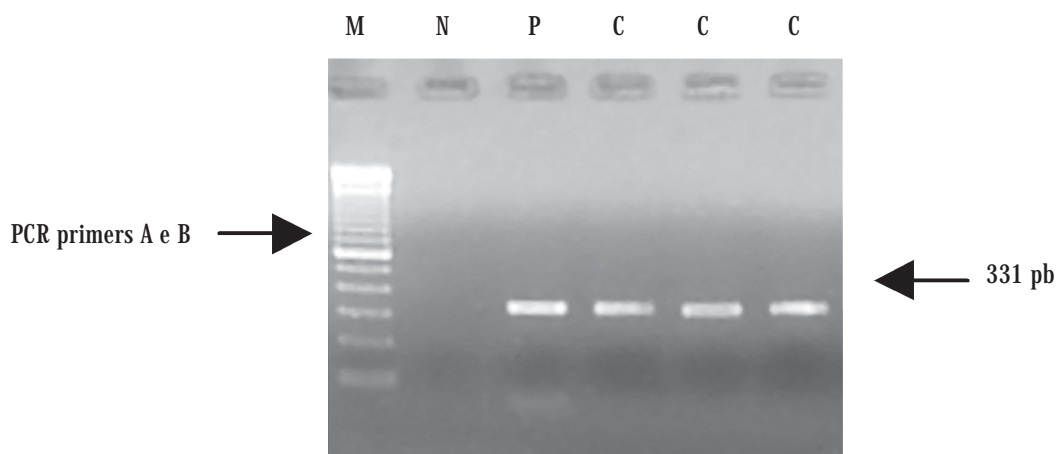
Caso clínico. No exame direto em microscopia de campo escuro da urina do cão, foi constatada a presença de um grande número de espiroquetas. Entre os quatro hamsters inoculados, 2 morreram com 10 dias de inoculação, 1 com 18 dias e o outro foi sacrificado no 20º dia, sendo coletado material (fígado e rins) para inocular em meios de cultura. Foram isoladas leptospiros em todos os meios de cultura, tanto da sementeira da urina do cão como de fígado e rins dos hamsters, sendo que a melhor adaptação do isolado ocorreu no EMJH enriquecido com 10% de soro de coelho. A reação sorológica do cão no 15º dia do curso da enfermidade revelou

positividade característica de reações paradoxais, com títulos de 25 para o sorovar sentot; 50 para hardjo e Buenos Aires; 100 para hurstbridge, hebdomadis e andamana, e 200 para butembo, ballum, castellonis, canicola, copenhageni e sejroe. Logo que se obteve uma densidade do isolado de 2×10^7 leptospiras por mL (aferida por contagem em câmara de Petroff-Hausser), enfrentou-se o mesmo com o soro do próprio animal em uma reação de MAT, não sendo observada reação de aglutinação, provavelmente caracterizando a presença de antígeno superficial "Vi" comum nos isolados recentes, que bloqueia os antígenos superficiais aglutinantes. Na 4ª passagem do isolado, foi repetida a reação obtendo-se um título de 1.600.

PCR. O resultado da reação de PCR mostrou a amplificação de uma banda de 331pb (Figura 1), correspondente a amplificação do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S de *L. interrogans*.

Sequenciamento. O sequenciamento pelo método de Sanger do rDNA 16S, quando comparado com as seqüências do GenBank, identificou 100% de homologia para a *Leptospira interrogans* sorovar canicola amostra Moulton e para a *Leptospira meyeri* amostra Bandicoot.

Inquérito sorológico. *Soros humanos:* das vinte amostras de soro analisadas (Tabela 1) revelaram que nos pacientes 1, 2, 3, 6, 7, 8 e 9 (58,3%), o diagnóstico com a bateria normal de antígenos não identificaria o título mais alto de



M-marcador peso molecular, N-amostra urina negativa, P- controle positivo, C-amostras de urina.

Figura 1 - Reação de PCR com três amostras de urina do cão.

Tabela 1 - Resultado da titulação sorológica de vinte amostras de 12 pacientes humanos suspeitos de leptospirose, utilizando 52 sorovares já identificados e um sorovar não identificado (Tande).

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12								
DPIS	7	20	7	37	7	12	19	7	32	61	8	11	7	35	52	79	180	7	9	12
Butembo						100								50				100		
Ballum					100															
Castellonis					200				400											
Canicola	3.200	400	25	200	3.200	100		200	100				50	25	100	50	200	200		
Grippotyphosa	3.200		25																	
Hebdomadis			100						400											
Copenh. M20		50	100		100	100	200	200												
Ictero. RGA					3.200															
Ictero. Verdum									200											
Copenh. Wijnberg									400											
Pyrogenes														25						
Sejroe	25	3.200			400								50					400	200	
Hardjo	25																			
Tarassovi		800			200															1.600
Andamana	25			25										25			100	200		
Andam. Bovedo									25											
Buenos Aires									25											
Patoc							100							100				200	400	
Illini			100																	
Semarang																				50
Hurstbridge									100											
Maior/Titulo	25	3.200	50	400	25	400	3.200	0	100	200	400	400	0	50	50	100	100	100	400	1.600
TANDE	0	6.400	400	9.600	50	400	3.200	400	400	100	800	8.000	0	200	400	100	100	50	400	100

DPIS - Dias pós início dos sintomas em que foi coletada a amostra de sangue

anticorpos, uma vez que este ocorreu com o novo sorovar *tande*. Observa-se também que a precocidade em detectar um título significativo, nos pacientes 2, 6 e 9, foi respectivamente de 7, 7 e 35 dias com o *tande*, contra 37 dias para *canicola*, 32 dias para *copenhageni* M20 e 180 dias para *canicola*, ou seja, nos três pacientes, *tande* foi cinco vezes mais precoce do que os demais sorovares. Nos pacientes 4, 5 e 11, os títulos mais altos (400, 3.200 e 400) dos sorovares *sejroe*, *icterohaemorrhagiae* RGA e *pyrogenes*, coincidiram com os títulos de *tande*. Finalmente, nos pacientes 10 e 12 (16,7% dos pacientes), os títulos de 100 para *andamana* Bovedo e de 1.600 para *tarassovi*, superaram os 50 e 100 de *tande*.

Inquérito sorológico. *Soros caninos*: as 105 amostras de soro canino, testadas através de MAT (Tabela 2) revelaram 55 (52,4%) reagentes e, quando enfrentou-se as mesmas somente com *tande*, encontrou-se 54 (51,4%) reagentes. A sensibilidade e especificidade da cepa *tande* testada com a bateria de antígenos, foi respectivamente de 61,8% e 60%. A prevalência de 52,4% (55/105), considerada verdadeira é semelhante à prevalência aparente de 51,4% (54/105). Entretanto, a soma dos soros MAT positivos encontrados na bateria de antígenos padrão e com a cepa *tande* apresentou prevalência de 71,4% (75/105), quase 20% acima do percentual inicial.

Tabela 2 - Resultados de 105 amostras de soro canino testados com a bateria de antígenos padrão e o sorovar *tande* na MAT

Tande	MAT		Total
	P	N	
Positivos	34	20	54
Negativos	21	30	51
Total	55	50	105

Razão de chances (OR) 2,43 Limite de confiança de 95% para $OR_{1,02} < OR < 5,81$

Máxima probabilidade estimada para OR (MPE) 2,41

Limite de confiança de 95% para MPE $1,03 < OR < 5,74$

risco relativo (RR) (saída: Micro=1; Exposição: *tande*=1) 1,53

Limite de confiança de 95% para RR $1,04 < RR < 2,25$

Qui quadrado valor de p

Não corrigido: 4,99 0.02547819 ←

Mantel-Haenszel: 4,94 0.02618815 ←

Yates corrigido: 4,16 0.04149070 ←

Calculando-se o coeficiente de correlação Kappa dos resultados de MAT com *tande* e a bateria de antígenos, encontra-se um coeficiente de 0,22, o que constitui uma correlação regular na escala de valores Kappa. Contudo, como se trata da comparação de um único sorovar contra toda a bateria de antígenos, esta correlação poderia ser considerada de moderada a substancial, ou até mesmo excelente, se fosse calculada com sorovares individuais.

Dos soros caninos analisados, 55 foram reagentes na bateria de rotina no diagnóstico laboratorial, com títulos variando de 100 a 6.400, título médio de 347 e mediana de 100. Entretanto, a inclusão do sorovar *tande* aumentou para 75 o número de reagentes com títulos entre 100 e 25.600, título médio de 1.088 e mediana três vezes maior. A inclusão de *tande* substituiu totalmente os sorovares *canicola*, *ballum*, *icterohaemorrhagiae* RGA, *bataviae* Van Tienem e *buenos aires*, por apresentar título

igual ou superior, e substituiu parcialmente os sorovares *illini*, *bratislava*, *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae* Kantorovic e *icterohaemorrhagiae* Verdum por apresentar o mesmo título sorológico (Tabela 3). A avaliação da frequência de sorovares, considerando o título mais alto e/ou coagulações em mesmo título identificou que o sorovar *Tande*, isoladamente, foi capaz de detectar 72% dos soros positivos.

Tabela 3 - Sorovares leptospirais mais frequentes na análise de 75 soros caninos positivos na MAT utilizando a bateria de antígenos padrão mais a inclusão de *tande*.

Sorovares	Título de anticorpos								Total
	100	200	400	800	1.600	6.400	9.600	25.600	
Tande	9	9	9	7	3	4	1	1	43
Illini	8	1							9
Tande/Canicola	3								3
Bratislava	1	1							2
Copenhageni	1		1						2
Tande/Bratislava	2								2
Sejroe	2								2
Autumnalis	1		1						2
Tande/Canicola/ Ballum/Copenhageni	1								1
Tande/Illini	1								1
Tande/Ictero. Kantorovic	1								1
Ictero. Kantorovic	1								1
Tande/Ictero. Verdum	1								1
Ictero. Verdum	1								1
Tande/Ictero. RGA	1								1
Butembo Tande/Bataviae	1								1
Van Tienem	1								1
Bataviae Swart	1								1
Total	36	12	11	7	3	4	1	1	75

DISCUSSÃO

No caso relatado, os sinais clínicos como temperatura de 40°C, dificuldade de movimentação do trem posterior, apatia, anorexia, dor à palpação abdominal e dos membros posteriores, diarreia sanguinolenta, vômitos amarelados, salivação sanguinolenta e necrose da borda da língua, são típicos de leptospirose^{4 6 10 16}. Já foi demonstrado que as leptospiras não sobrevivem por muito tempo na urina, e que a sua pesquisa direta em microscopia de campo escuro quase sempre é um procedimento diagnóstico não compensatório²⁶, o que torna o sucesso do diagnóstico dependente do exame imediato ou da utilização de meio de transporte para isolamento. Apesar disto, mesmo não utilizando meio de transporte, conseguimos tanto visualização em microscopia de campo escuro, quanto isolamento diretamente em meio de cultura e também por inoculação em hamster, cumprindo o postulado de Koch.

O resultado do PCR mostrando a banda de 331 pares de bases e o seqüenciamento indicando homologia de 100% para os sorovares *canicola* e *bandicoot*, acrescido da morte dos hamsters inoculados, confirma a patogenicidade do isolado *tande*.

O isolado *tande*, da primeira à terceira passagem em cultivo, não aglutinou quando enfrentado com o próprio soro

do animal. Entretanto, na quarta passagem apresentou um título de 1.600, sendo provável esta ocorrência a presença de antígeno superficial “Vi”, comum nos isolados recentes, o qual bloqueia os antígenos superficiais aglutinantes, concordando com observações feitas em leptospiros recém isoladas as quais são inaglutináveis até que sejam cultivadas por algumas passagens³¹, sendo que na 4ª passagem do isolado, foi repetida a reação obtendo-se um título de 1.600.

Na MAT, o soro suspeito deve ser enfrentado com um número expressivo de antígenos leptospirais, entre os quais estejam representantes dos principais sorogrupos patogênicos⁹ e de todos os sorovares comuns da localidade de ocorrência dos casos³⁰. Os títulos de anticorpos geralmente são maiores com antígenos provenientes da região onde estão ocorrendo os surtos ou casos do que com as cepas de antígenos estocadas no laboratório ainda que do mesmo sorogrupo^{15,28}. Portanto, um número expressivo de sorovares deve ser utilizado no teste de diagnóstico para que sejam detectados sorovares pouco comuns ou não detectados até então¹⁸. As reações de MAT podem não corresponder exatamente ao sorogrupo que causou a infecção, sendo a capacidade de prever o sorogrupo infectante menor do que 40%²⁰.

É recomendável testar-se amostras pareadas de soro para comprovar a positividade da primeira amostra, pela observação da soroconversão da segunda amostra. No entanto, a avaliação de amostras pareadas de 200 pacientes suspeitos de leptospirose, evidenciou que somente 3,3% dos pacientes aumentaram o título em 4 ou mais vezes na segunda amostra, sugerindo que a antibióticoterapia imediata seria um fator limitante para a soroconversão, aliada a falta do antígeno correspondente na bateria de diagnóstico, sendo que a maioria das reações de coaglutinação ocorreu com sorovares saprófitas¹¹.

O resultado da MAT de 12 pacientes humanos mostra que, se fosse testada a primeira amostra de soro de cada paciente com a bateria de antígenos de rotina, 7 (58,3%) amostras seriam identificadas com título igual ou superior a 100 e com um título médio de 1:929. Porém, o mesmo teste usando o isolado como antígeno, identificaria 8 pacientes na primeira amostra de soro, com um título médio de 1.713. Considerando a amostra de soro em que o título foi igual ou maior que 100, o maior título encontrado com a bateria de rotina foi de 3.200 com média de 945. Na mesma avaliação feita com o isolado, o maior título foi de 9.600, com média de 2.970, ou seja, três vezes superior. Os pacientes de números 6 (com três amostras de soro) e 9 (com cinco amostras de soro), pelos critérios tradicionais de soroconversão, seriam considerados negativos por não alcançarem um título mínimo de 400 com a bateria recomendada pelos laboratórios de referência. Entretanto, os dois pacientes, além de um quadro clínico e epidemiológico compatível com leptospirose, apresentaram título de 400 para o isolado. Os pacientes de números 3 e 10, ambos com uma única coleta de sangue com sete dias de início de sintomas, apresentaram títulos de 25 e 100 para a bateria e de 50 para o isolado, ou seja, pelos critérios laboratoriais não seriam considerados casos de leptospirose. Entretanto, se observarmos a primeira amostra dos pacientes 1, 2, 6 e 9 (7 DPIS), todos seriam também negativos pela bateria padrão, apesar dos pacientes 2 e 6 já neste momento apresentarem título de 400 para o isolado.

No inquérito sorológico canino, a importância do isolado ficou mais evidente. A prevalência detectada com a bateria de rotina foi de 52,4%, identificando 14 sorovares reagentes em maior título. Porém, quando se incluiu o isolado na bateria, esta prevalência subiu para 71,4%, não havendo necessidade da inclusão de cinco sorovares (canicola, ballum, icterohaemorrhagiae RGA, bataviae Van Tienem e buenos aires), e parcialmente de 50% da bratislava, da icterohaemorrhagiae Verdum e da icterohaemorrhagiae Kantorovic, 33% da copenhageni e 18% da illini. A análise sorológica feita com a bateria de rotina (Tabela 2) revelou que 61,8% dos soros reagentes também reagiram com o isolado, com um risco relativo de 1,53 (com um limite de confiança de 95%, $1,04 < RR < 2,25$), um $\chi^2_{\text{Mantel-Haenszel}}$ de 4.94 e um $p = 0,026$, o que justifica estatisticamente, a importância do isolado para o diagnóstico em nosso ecossistema. O coeficiente de correlação Kappa de 0,22 do isolado com toda a bateria representa uma correlação regular, entretanto, com alguns sorovares como canicola, ballum, bataviae Van Tienem, buenos aires e icterohaemorrhagiae RGA, este coeficiente de correlação é excelente. O título médio de 347 com uma mediana de 100 com a bateria de rotina, contra um título médio de 1.088 e uma mediana de 200 com o isolado, mais uma vez reforça a importância da inclusão do isolado na bateria de diagnóstico.

Os resultados encontrados com o isolado, tanto no inquérito sorológico humano quanto canino, revelam que a leptospirose está presente em índices superiores aos normalmente registrados, e que o problema do diagnóstico está na limitada suspeição clínica, na falta de investigação epidemiológica para avaliar fatores de risco e no uso de uma bateria de diagnóstico com isolados locais, que apesar de ser uma recomendação internacional, não há distribuição por parte do laboratório de referência nacional de cepas brasileiras, e praticamente todos os laboratórios que trabalham com MAT, usam cepas oriundas de países como Holanda, França, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, entre outros, ou seja, todas originárias de países de clima frio e que apresentam uma fauna de reservatórios diferente da América do Sul. Outros pesquisadores têm identificado o mesmo problema de diagnóstico, onde em uma investigação ativa para infecção leptospiral no Hawaii, encontrou-se 500% de acréscimo na incidência, quando comparada com os casos oficialmente registrados²⁷. Do mesmo modo que em regiões onde a leptospirose é endêmica, ela pode ocorrer em 5 a 15% dos diagnósticos de pacientes com enfermidade febril¹⁹. Estudo em Baltimore, encontrou que 16% de 1.150 pacientes selecionados aleatoriamente de um grupo de enfermidades sexualmente transmitidas, apresentaram evidência de exposição prévia ao agente leptospira, com um paciente apresentando elevado título para IgM⁷.

Considerando a leptospirose como uma doença comum em nosso ecossistema e, ainda que tenhamos testado um único isolado local, podemos, como A. Vanotti, concluir que: *a apresentação incomum de uma doença comum é mais comum do que a apresentação comum de uma doença incomum*. Cabe, portanto, um esforço na busca de novos isolados, para que seja descoberto a ponta do *iceberg* da leptospirose animal e humana na região sul do Estado do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida LP, Martins LFS, Brod CS, Germano PM. Seroepidemiologic survey of leptospirosis among environmental sanitation workers in an urban locality in the south of Brazil. *Revista de Saúde Pública* 1: 76-81, 1994.
2. Ávila MO. Pesquisa de anticorpos antileptospira em alunos de Medicina Veterinária da UFPeL. Pelotas, 1998. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 1998.
3. Ávila MO, Furtado LRI, Teixeira MM, Rosado RLI, Martins LFS, Brod CS. Leptospiral agglutinins in dogs, in the influence area of the Center for Control of Zoonosis, Pelotas city, RS, Brazil, 1995. *Ciência Rural de Santa Maria* 28: 107-110, 1998.
4. Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *Journal of Small Animal Practice* 39: 231-236, 1998.
5. Bolin CA. Diagnosis of Leptospirosis: A re-emerging disease of companion animals. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal* 11: 166-171, 1996.
6. Cacchione RA, Cedro VCF, Bulgini MJD, Cascelli ES, Martinez ES. Leptospirosis canina en la Republica Argentina. *Revista de Investigación Ganadera* 14: 125-132, 1962.
7. Childs JE, Schwartz BS, Ksiazek TG. Risk factors associated with antibodies to leptospire in inner-city residents of Baltimore: A protective role for cats. *American Journal of Public Health* 82: 597-599, 1992
8. Dacorso Filho P. Leptospirose canina. *O Hospital* 18: 797-809, 1940.
9. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. *World Health Organization, Offset Publication n° 76, Geneve, 1982.*
10. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd edition. MedSci, Melbourne, Vic Australia, 1999.
11. Fernandes CPH. Espiroquetemia persistente e baixos títulos de anticorpos em sorologia pareada de casos de leptospirose humana. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2001.
12. Furtado LRI, Fehlberg MFB, Avila MO, Teixeira MM, Rosado RLI, Martins LFS, Brod CS. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no Município de Pelotas, R.S. *Arquivos do Instituto Biológico* 64: 57-61, 1997.
13. Gangadhar NL, Rajasekhar M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF. Reservoir hosts of *Leptospira inadai* in India. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 19: 793-799, 2000.
14. Hergt R. Meaning of serotype Patoc (biflexa complex) for the diagnosis of leptospirosis by microscopic agglutination test. *Zentralblatt und Bakteriologie* 235: 506-511, 1976.
15. Hutter ER. Leptospirosis canina. *Revista de Medicina Veterinária de Buenos Aires* 53: 303-312, 1972.
16. Jouglaard SDD. Prevalência da leptospirose canina, fatores de risco e constituição da população no meio rural do Município de Pelotas, RS. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 1999.
17. Katz AR, Manea SJ, Sasaki DM. Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. *American Journal of Public Health* 81:1310-1312, 1991.
18. Kreissberg RA. Clinical problem solving - An abundance of options. *New England Journal of Medicine* 329: 413-416, 1993.
19. Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? *Journal of Medical Microbiology* 48: 417-418, 1999.
20. McDowell A. "Do icterus epidemicus". *Arquivos Brasileiros de Medicina* 7: 335-345, 1917.
21. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30:2219-2224, 1992.
22. Pereira HCP. Prevalência sorológica da leptospirose humana entre trabalhadores dos frigoríficos de matadouros com inspeção estadual do Município de Pelotas, RS. Pelotas, 1996. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Fundação Universidade de Rio Grande, 1996.
23. Pereira HCP, Baruffa G, Brod CS, Furtado LRI, Rosado RLI, Pedot T. Leptospirose: Relato de cinco casos internados no Hospital Universitário de Rio Grande, RS. *Jornal Brasileiro de Medicina* 72: 110-118, 1997.
24. Piza JT, Gomes LS. Moléstia de Weil em S. Paulo. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia* 21: 23-32, 1930.
25. Prescott J, Ferrier R, Nicholson V, Johnson K, Hoff B. Is canine leptospirosis under diagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. *Canadian Veterinary Journal* 32:481-486, 1991.
26. Sasaki DM, Pang L, Minette HP. Active Surveillance and Risk Factors for Leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 35-43, 1993.
27. Tan DSK, Welch QB. Evaluation of *Leptospira biflexa* antigens for screening human sera by the microscopic agglutination (MA) test in comparison with the sensitized-erythrocyte-lysis (SEL) test. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 5:12-16, 1974.
28. Thiermann AB. Canine leptospirosis in Detroit. *American Journal Veterinary Research* 41: 1659-1661, 1980.
29. Torten M. Leptospirosis. In: Stoenner HE, Torten M, Kaplan W (eds) *CRC handbook series in zoonoses, section A: bacterial, rickettsial and mycotic diseases*, CRC Press, Boca Raton, Flórida, vol. I, p. 363-420, 1979.
30. Ueno K, Yanagawa R, Kida H. Presence of Vi antigen in a virulent strain of *Leptospira interrogans* serovar pomona and relation of Vi antigens of leptospiras to resistance to leptospiricidal activity mediated by antiserum plus complement. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie un Hygiene* 252: 557-565, 1982.
31. Veronesi R, Amato Neto V, Corrêa MOA. Considerações em torno de um novo caso humano de febre canicola. *O Hospital* 46: 69-79, 1954.