ANGELA MANETTI ARMENTANO RODRIGUES

**LEPTOSPIROSE CANINA: DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO,
SOROLÓGICO E MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO
CRUZADA ENTRE OS SOROVARES ICTEROHAEMORRHAGIAE E
COPENHAGENI**

SÃO PAULO

2008

ANGELA MANETTI ARMENTANO RODRIGUES

Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof^a. D^{ra}. Mitika Kuribayashi Hagiwara

**São Paulo
2008**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1979
FMVZ

Rodrigues, Angela Manetti Armentano

Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni / Angela Manetti Armentano Rodrigues. – São Paulo : A. M. A. Rodrigues, 2008.
116 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara.

1. Leptospirose canina. 2. Soroaglutinação microscópica. 3. Isolamento. 4. Reação em cadeia por polimerase. 5. Teste de inibição de crescimento *in vitro*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da proteção cruzada entre os sorovares *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* de *Leptospira interrogans* por meio do teste de inibição de crescimento *in vitro* (TIC)", protocolo nº790/2005, utilizando 80 (oitenta) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/2006.

(We certify that the Research "Evaluation of the cross-protection between sorovars *icterohaemorrhagiae* and *copenhageni* of *Leptospira interrogans* by *in vitro* growth inhibition test (GIT)", protocol number 790/2005, utilizing 80 (eight) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006.

São Paulo, 18 de outubro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Angela Manetti Armentano

Título: Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Emília, pela confiança depositada em mim e total apoio, por todo o seu esforço para a minha formação profissional, apesar de todas as dificuldades. Dedico a você, mãe, por toda a amizade, cumplicidade, paciência, compreensão e principalmente pelo amor incondicional, que você sabe, é mútuo e eterno.

Aos meus irmãos Sylvia e José Valter. Vocês nem imaginam a importância que tiveram nessa minha jornada. Foram essenciais. Cada palavra de apoio, as tiradas engraçadas para me levantar o moral. Vocês demonstraram interesse genuíno por mim, me valorizando sempre. Eu amo vocês com todo o meu coração.

Aos meus tios Ada e Harald. Eu não chegaria ao fim sem a sua ajuda. A disposição para sempre mais uma conversa, as dicas, ainda que tivessem coisas mais importantes para resolver ou ultrapassar. Esse trabalho é uma forma de retribuição e estou feliz por isso. Sinto uma satisfação enorme por estarmos cada vez mais próximos. Amo vocês.

Milton, Alice, Isabel e Homero, meus amores. Só eu sei como são importantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora, Profa. Dra. Mitkia Kuribayashi Hagiwara, por enxergar em mim o potencial que nem eu mesma via; por se dedicar em me fazer desenvolvê-lo. Obrigada pela amizade, o interesse pela minha vida pessoal, os conselhos, as críticas que me faziam refletir, ainda que mais tarde. Agradeço o incentivo e por muitas vezes demonstrar satisfação com meu trabalho e amadurecimento, me oferecendo sempre boas oportunidades. Nossa relação, desde minha iniciação científica, tem sido de respeito e amizade. E muito gratificante. Digo com amor, Professora, que isto foi mais que orientação. Foi doação.

Agradeço ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, por permitir o uso do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal dessa Faculdade. Obrigada pela disponibilidade em me tirar dúvidas e dar sugestões, pela preocupação verdadeira com os problemas enfrentados e pela ajuda em solucioná-los. Agradeço o incentivo e o modo carinhoso como me acolheu, como se eu fosse, de fato, sua orientada. Muito Obrigada.

Obrigada também ao Prof. Dr. Albert Ko que permitiu a caracterização dos meus isolados de leptospira no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – BA, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo pesquisador Adriano Queiroz Silva, a quem muito devo por ter processado meus isolados.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain agradeço a disponibilidade e por permitir a realização da PCR no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal dessa Faculdade.

À Zenaide Maria de Moraes, Zê, uma verdadeira mãezona, e à Gisele Oliveira de Souza, Gi, sempre com alto astral contagiante, o meu muitíssimo obrigada pela dedicação e por se preocuparem com os meus resultados. Peço desculpas por todo o trabalho que eu dei. A colaboração de vocês foi essencial, primordial. Vocês são muito corajosas e de uma boa vontade admirável.

À Sheila Oliveira de Souza, obrigada por toda a ajuda com a PCR.

À Amane Paldês Gonçalves, agradeço pelo auxílio, pelas dúvidas tiradas, pela ajuda no processamento das minhas amostras, ainda que tivesse seu próprio projeto para desenvolver. Isso foi de extrema generosidade. Muito obrigada.

Agradeço ao Dr. Roberto Corrêa, da BIOVET, e também a Sandra Fernandes e Jane Fraga pelo esforço na formulação das vacinas. Lamento não termos podido continuar com essas vacinas, mas os resultados iniciais foram essenciais para o andamento do experimento. Domingues e Cláudio, obrigada por tudo.

Obrigada às veterinárias do HOVET Vera Fortunato Wirthl, Denise Maria Nunes Simões, Bruna Maria Pereira Coelho, Khadine Kazue Kanayama, Paula Romy Gonçalves Monteiro e a todos os residentes por colaborarem com o projeto. Obrigada também aos enfermeiros do HOVET pela ajuda.

Aristides, Nilo, Ovideo, Barbosa, Gondo, Daniele e outros que infelizmente não recordo os nomes, muito obrigada pela inestimável colaboração.

Marli e Cláudia, agradeço a amizade e convivência tão agradável.

Às meninas "da salinha", Aline, Chris, Carol, Mari, Mônica, Leila. Uma das melhores coisas foi ter conhecido vocês. Foi bom dividirmos nossas angústias, alegrias, cursar disciplinas juntas, falar besteira para descontrair e dar risada. Nos tornamos cúmplices, amigas. Vocês foram um grande presente.

Às minhas amigas Bel (Paula), por sua pontaria certa nas cistocenteses mais difíceis dos cães mais oligúricos, e Babi (Simone), por revisar meu resumo em inglês. Obrigada por todo o apoio e por me dar força.

Finalmente, obrigada aos cães do projeto piloto e às pessoas que os adotaram; aos cães atendidos no HOVET, dos quais coletei amostras de sangue e urina para soroaglutinação, PCR e isolamento, e aos cães do estudo de proteção cruzada.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muita para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

RODRIGUES, A. M. A. **Leptospirose canina:** diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni. [Canine leptospirosis: etiological, serological and molecular diagnosis and evaluation of cross-protection between sorovars icterohaemorrhagiae and copenhageni.]. 2008. 116 f. - Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Realizou-se a pesquisa de anticorpos aglutinantes (AcA) anti-leptospira, através da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) e tentativas de isolamento do agente etiológico em 29 cães com suspeita clínica de leptospirose. Foi também realizada a pesquisa de material genético de *Leptospira* spp., utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em 24 amostras de urina dos mesmos cães. Com o objetivo de determinar a proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni, 24 cães adultos foram avaliados antes e após a vacinação com uma dose de vacina contendo os antígenos icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa e pomona, utilizando-se o teste de inibição de crescimento *in vitro* (TIC) dos sorovares canicola, copenhageni e icterohaemorrhagiae. Os títulos de AcA anti-copenhageni foram os mais freqüentemente observados nos cães com suspeita clínica de leptospirose, havendo entretanto, reação cruzada entre diferentes sorovares. Foram isoladas quatro amostras de leptospira, das quais três foram caracterizadas por anticorpos policlonais e por Variable Number Tandem Repeat (VNTR) como sorovar canicola. A quarta amostra isolada reagiu em alto título com o anti-soro policlonal anti-sorovar copenhageni (51.200), não tendo sido testado com o anti-soro anti-icterohaemorrhagiae. Pela técnica de VNTR, essa amostra foi classificada como pertencente ao sorogrupo icterohaemorrhagiae e, finalmente, pelo uso dos anticorpos monoclonais F70 C24, F70 C14-10, F12 C3-11 e F89 C12, para a diferenciação dos representantes do sorogrupo icterohaemorrhagiae, essa amostra isolada apresentou o comportamento imunológico do sorovar copenhageni (cepa padrão L1 130, FIOCRUZ - Bahia). Considerando-se como critério sorológico de confirmação do diagnóstico clínico de leptospirose, títulos maiores ou iguais a 800 em amostra única de soro, ou o aumento ou declínio de quatro vezes os títulos de AcA (duas diluições) em duas amostras pareadas de soro, houve a confirmação do

diagnóstico etiológico em 9 de 24 cães (37,5%) pela SAM. Por outro lado, 11 das 24 amostras de urina (45,8%) foram positivas à PCR. A associação das duas técnicas permitiu a confirmação diagnóstica em 15 cães (62,5%). Os títulos de anticorpos neutralizantes (AcN) (TL_{50}) pré-vacinais contra os sorovares icterohaemorrhagiae, canicola e copenhageni foram respectivamente de $1,444 \pm 0,278$, $0,725 \pm 0,317$ e $0,583 \pm 0,322$, e os títulos pós-vacinais foram respectivamente de $1,455 \pm 0,287$, $1,475 \pm 0,270$ e $0,510 \pm 0,304$. Considerando-se o título de AcN maior ou igual a 1 como título protetor contra a infecção leptospírica, no momento pré-vacinal, os cães ainda apresentavam AcN contra o sorovar icterohaemorrhagiae capazes de protegê-los contra a infecção natural, não tendo havido também uma resposta adicional ao estímulo vacinal. Com relação ao sorovar canicola, houve aumento significativo dos títulos de AcN após a imunização ($p=0,001$) quando comparado ao momento pré-vacinal, tendo sido desenvolvida uma resposta protetora. Embora os animais não tenham sido vacinados contra o sorovar copenhageni, a presença de AcN pré-vacinal e pós-vacinal pode ser justificada pela reatividade cruzada entre ambos, copenhageni e icterohaemorrhagiae, pertencentes ao mesmo sorogrupo; entretanto os títulos pré- e pós-vacinais não foram da mesma magnitude dos produzidos contra o sorovar icterohaemorrhagiae. Portanto, a vacina contendo bacterina do sorovar icterohaemorrhagiae não é capaz de eliciar resposta protetora contra o sorovar heterólogo copenhageni.

Palavras chave: Leptospirose canina. Soroaglutinação microscópica. Isolamento. Reação em Cadeia por Polimerase. Teste de Inibição de Crescimento *in vitro*.

ABSTRACT

RODRIGUES, A. M. A. **Canine leptospirosis:** e etiological, serological and molecular diagnosis and evaluation of cross-protection between *sevorars icterohaemorrhagiae* and *copenhageni*. [Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*.]. 2008. 116 f. - Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A research on agglutinating antibodies (AAc) anti-leptospira has been performed, through microscopic agglutination test (MAT) and attempts of isolation of the etiologic agent in 29 dogs with clinical suspicious of leptospirosis. There was also made a research of *Leptospira* spp.'s genetic material, using polimerase chain reaction (PCR) in 24 urine samples of the same dogs. With the aim to determine the cross protection between serovars *icterohaemorrhagiae* and *copenhageni*, 24 adult dogs were evaluated before and after vaccination with one dose of a vaccine containing *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippotyphosa* and *pomona* antigens, by the *in vitro* inhibition growth test (GIT) of serovars *canicola*, *icterohaemorrhagiae* and *copenhageni*. The AAc anti-*copenhageni* titers were the most frequently obseved in the dogs with clinical suspicious of leptospirosis, existing however, cross reaction among different serovars. There were isolated four samplas of leptospira, of witch three were all characterizated by polyclonal antibodies and Variable Nunber Tandem Repeat (VNTR) as serovar *canicola*. The fourth isolated sample reacted in high titers to polyclonal antisera anti-*copenhageno* (51.200), but is was not tested with antisera anti-*icterohaemorrhagiae*. By VNTR technique, this sample was classified as belonging to the serogroup *icterohaemorrhagiae*, and finally by the use of monoclonal antibodies F70 C24, F70 C14-10, F12 C3-11 and F89 C12, for differentiation of the representatives of serogroup *icterohaemorrhagiae*. This isolated sample presented the immunological behavior of serovar *copenhageni* (standard strain LI 130, FIOCRUZ – Bahia). Considering the sorologic criteria confirmation of clinical diagnosis of leptospirosis, titers higher or equal than 800 in a unique serum sample, or the increase or decrease of four times of AAc titers (two dilutions) in two paired serum samples, there was the conformation of etiologic diagnosis in 9 of the 24 dogs (37,5%) by MAT. However, 11 out of 24 urine samples (45,8%) were positive

at PCR. The association of both techniques allowed the diagnostic confirmation in 15 dogs (62,5%). The prevaccinal neutralizing antibodies (NAc) titers (TL_{50}) were respectively $1,444 \pm 0,278$, $0,725 \pm 0,317$ and $0,583 \pm 0,322$. And the postvaccinal titers were respectively $1,455 \pm 0,287$, $1,475 \pm 0,270$ and $0,510 \pm 0,304$. Considering the NAc titer higher than 1 as a protective titer against leptospiral infection, at prevaccinal moment the dogs still presented NAc against serovar icterohaemorrhagiae capable to protect them against natural infection, an additional response to the vaccinal stimulus had not occurred. Concerning serovar canicola, there was a significant increase of NAc titers after immunization ($p=0,001$) when compared to prevaccinal moment, and a protective response was developed. Although the animals were not vaccinated against serovar copenhageni, the presence of prevaccinal and postvaccinal NAc can be explained by cross reactivity between both, copenhageni and icterohaemorrhagiae, belonging to same serogroup; however, the pre- and postvaccinal titers were not of the same magnitude of those produced against serovar icterohaemorrhagiae. Therefore, the vaccine containing bacterins of serovar icterohaemorrhagiae is not capable of eliciting protective response against the heterologous serovar copenhageni.

Key words: Canine leptospirosis. Microagglutination test. Isolation. Polimerase Chain Reaction. *In vitro* Growth Inhibition Test.

LISTA DE QUADROS DO CAPÍTULO 1

Quadro 1 –	Variantes sorológicas de leptospiros patogênicas e saprófitas incluídas na bateria de antígenos utilizada na reação de soroaglutinação microscópica – São Paulo – 2008.....	43
Quadro 2 –	Anticorpos monoclonais utilizados na identificação do sorovar de isolados pertencentes ao sorogrupo icterohaemorrhagiae – São Paulo – 2008.....	49
Quadro 3 –	Cães incluídos no estudo: Raça, sexo, idade e sinais clínicos apresentados na primeira consulta – São Paulo – 2008.....	52
Quadro 4 –	Resultados dos exames laboratoriais para determinação de produtos azotados séricos, proteínas séricas, atividade sérica de enzimas hepáticas, bilirrubinas séricas, no momento do primeiro atendimento – São Paulo – 2008.....	53
Quadro 5 –	Títulos de anticorpos aglutinantes no soro coletado na primeira consulta ou em momento subsequente, dos cães 2, 3, 5 e 16, à SAM, e títulos obtidos pela reação dos isolados A, B e C (D não realizado) com anti-oros policlonais de coelho para determinar o provável sorogrupo infectante – São Paulo – 2008.....	58
Quadro 6 –	Resultados da soroaglutinação microscópica para os cães 2, 3, 5 e 16 e resumo dos testes realizados para caracterização dos respectivos isolados A, B, C e D: reação dos isolados com anti-soro policlonal de coelho, VNTR e reação com anticorpos monoclonais – São Paulo – 2008.....	61

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1

Tabela 1 –	Tamanho em pares de bases (pb) da região flanqueadora e da repetição para os loci VNTR 4, 7 e 10 de <i>Leptospira interrogans</i> . – São Paulo – 2008.....	47
Tabela 2 –	Tamanho dos fragmentos em pares de bases para cada número de repetições dos loci VNTR 4 (4 bis), 7 (7 bis) e 10 (10 bis), de <i>Leptospira interrogans</i> – São Paulo – 2008.....	48
Tabela 3 –	Distribuição dos títulos para cada sorovar na primeira reação de soroaglutinação microscópica (SAM) de cada animal e resultados do isolamento – São Paulo – 2008.....	54
Tabela 4 –	Resultados das reações de soroaglutinação microscópica para os cães de que coletou-se mais de uma amostra de soro em diferentes momentos, com intervalo mínimo de 10 dias entre coletas – São Paulo – 2008.....	56

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 1–	Resultados da reação de soroaglutinação microscópica (SAM) realizada com o soro coletado no momento da primeira consulta – São Paulo – 2008.....	74
Tabela 2 –	Resultados das reações de soroaglutinação microscópica para os cães dos quais se pode coletar mais de uma amostra de soro em diferentes momentos, com intervalo de coleta mínimo entre amostras de 10 dias – São Paulo – 2008.....	75
Tabela 3 –	Resultados da(s) soroaglutinação(ões) microscópica(s), PCR e cultura de urina dos 24 cães incluídos no estudo – São Paulo – 2008.	76
Tabela 4 –	Total de animais positivos e negativos para cada um dos testes de soroaglutinação microscópica (SAM) e reação em cadeia de polimerase (PCR) na urina, para o diagnóstico da leptospirose dos cães incluídos nesse estudo – São Paulo – 2008.....	78

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 3

Tabela 1 –	Cálculo das freqüências acumuladas de tubos com crescimento positivo e negativo e porcentagens cumulativas de crescimento negativo para cada diluição do soro (expressa em logaritmo de base 10) para uma amostra de soro testada contra um sorovar – São Paulo – 2008.....	89
Tabela 2 –	Resultados das reações de soroaglutinação microscópica, realizadas 30 dias após a vacinação com vacina comercial contendo bacterinas contra os sorovares canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa e pomona – São Paulo – 2008	92
Tabela 3 –	Medianas e interquartis de 25% e 75% das TL ₅₀ (expressos em logaritmo de base 10) dos soros para cada sorovar utilizado no teste de inibição de crescimento <i>in vitro</i> , nos momentos pré- e pós-vacinais – São Paulo – 2008.....	93
Tabela 4 –	Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% de TL ₅₀ (expressos em logaritmo de base 10) contra os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola nos momentos pré- e pós-vacinais, após teste de inibição do crescimento <i>in vitro</i> . – São Paulo – 2008.....	95
Tabela 5 –	Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% dos TL ₅₀ (expressos como a recíproca das respectivas diluições) pré- e pós-vacinais contra os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola, após teste de inibição do crescimento <i>in vitro</i> – São Paulo – 2008.....	95

LISTA DE GRÁFICOS DO CAPÍTULO 1

- Gráfico 1 – Porcentagem de animais (dos 23 positivos à SAM) reagentes para cada sorovar da bateria de antígenos utilizada na reação de soroaglutinação microscópica, na primeira SAM realizada. Não houve reação positiva para os outros sorovares incluídos na bateria de antígenos não mostrados nesse gráfico – São Paulo – 2008..... 55
- Gráfico 2 – Porcentagem de animais reagentes para cada sorovar da bateria de antígenos utilizada na segunda reação de soroaglutinação microscópica realizada. Não houve reação positiva para os outros sorovares incluídos na bateria de antígenos não mostrados nesse gráfico – São Paulo – 2008..... 57

LISTA DE GRÁFICO DO CAPÍTULO 2

Gráfico 1 –	Porcentagens de diagnósticos confirmados pela soroaglutinação microscópica (SAM) e pela reação em cadeia de polimerase (PCR) isoladamente e em conjunto – São Paulo – 2008.....	78
-------------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS DO CAPÍTULO 3

- Gráfico 1 – BoxPlot dos TL_{50} (expressos em logaritmo de base 10) contra os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola, obtidos no teste de inibição de crescimento *in vitro*, nos momentos pré- (A) e pós vacinais (B): valores de mediana, interquartis de 25% e 75%, valores mínimos e máximos, cop = sorovar copenhageni; ict = sorovar icterohaemorrhagiae; can = sorovar canicola, * diferença significativa dos anticorpos neutralizantes pré-vacinais contra o sorovar icterohaemorrhagiae em relação aos outros sorovares no mesmo momento; # diferença significativa entre os títulos de anticorpos neutralizantes para o sorovar canicola antes e após a vacinação – São Paulo – 2008..... 94
- Gráfico 2 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes (MG TL_{50}) e respectivos intervalos de confiança (95%), expressos em valores logaritmos de base 10, dos soros dos cães, antes da vacinação (A) e trinta dias após a vacinação (B), obtidos no teste de inibição de crescimento *in vitro* contra os sorovares copenhageni (○), icterohaemorrhagiae (●) – São Paulo – 2008..... 96

LISTA DE FIGURA DO CAPÍTULO 1

- Figura 1 – VNTR das amostras isoladas A, B, C e D, realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – BA. *M*, Marcador de 100 pares de bases (pb); C+, controle positivo (Fiocruz L1130); C, controle negativo. Amostra A e controle positivo → Padrão 2,1,7. Amostras B, C e D → Padrão 1,10,3. – São Paulo – 2008..... 60

LISTA DE FIGURA DO CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Visualização dos produtos da PCR para o gene 16S rRNA de *Leptospira* spp. em gel de agarose (bandas de 331pb) nas amostras de urina dos 24 cães incluídos neste estudo. L, Lader (marcador de 100 pb); C, controle negativo, C+, controle positivo – São Paulo – 2008..... 77

LISTA DE ABREVISTURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	– Marca Registrada
°C	– Graus Celsius
A	– Amperes
AAc	– Agglutinating antibody
AcM	– Anticorpos monoclonais
AcN	– Anticorpos neutralizantes
AcA	– Anticorpos aglutinantes
ALT	– Alanina-aminotransferase
dl	– decilitro
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
dNTP	– desoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	– Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FA	– Fosfatase alcalina
FMVZ	– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	– Grama ou Gravidade
GIT	– <i>In vitro</i> Growth Inhibition Test
IgG	– Imunoglobulina G
IgM	– Imunoglobulina M
IV	– Intravenoso
L ou l	– litro
L.	– <i>Leptospira</i>
Log ₁₀	– Logaritmo na base 10
LPS	– Lipopolissacarídeo
M	– Molar
MAT	– Microagglutination test
Mg	– miligrama
ml	– mililitro
mM	– milimolar
Nº ou nº	– número
NAC	– Neutralizing antibody

OMS	– Organização Mundial de Saúde
p	– significância estatística
pb	– pares de bases
PBS	– phosphate buffer solution
pcM	– picomolar
PCR	– Reação em Cadeia de Polimerase
pH	– potencial hidrogeniônico
rpm	– rotações por minuto
SAM	– Soroaglutinação microscópica
spp.	– espécie por ser definida
sv(s)	– sorovar(es)
TBE	– Tris-Borato-EDTA
TE	– Tris-EDTA
TIC	– Teste de Inibição de Crescimento <i>in vitro</i>
U	– Unidade de medida
USP	– Universidade de São Paulo
VNTR	– Variable Number Tandem Repeat
μL	– microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	OBJETIVOS	29
3	REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1	HISTÓRICO	30
3.2	ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO AGENTE	32
3.3	EPIDEMIOLOGIA	32
3.4	PATOGENIA	33
3.5	SINAIS CLÍNICOS	34
3.6	DIAGNÓSTICO	35
3.7	TRATAMENTO	37
3.8	IMPORTÂNCIA COMO ZOONOSE E PREVENÇÃO	38
CAPÍTULO 1 ISOLAMENTOS DE <i>LEPTOSPIRA INTERROGANS</i>, SOROVARES COPENHAGENI E CANICOLA, DA URINA DE CÃES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEPTOSPIROSE EM SÃO PAULO (BRASIL)		40
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
2.2	TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)	42
2.3	ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTIVO DE FLETCHER	44
2.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	44
2.4.1	Reação dos isolados com anti-soro policlonal de coelho para sorogrupagem	44
2.4.2	Caracterização molecular pela técnica de VNTR-PCR	45
2.4.2.1	Purificação de DNA genômico total dos isolados	45
2.4.2.2	Amplificação de VNTR por PCR	46
2.4.2.2.1	Primers (oligonucleotídeos iniciadores)	46
2.4.2.2.2	Condições de amplificação	46
2.4.2.3	Eletroforese	47
2.4.2.4	Análise dos produtos amplificados	47
2.4.3	Determinação do sorovar de isolados de leptospira do sorogrupo <i>Icterohaemorrhagiae</i> por meio de anticorpos monoclonais (AcM)	48
2.4.3.1	Descrição da técnica	49
2.4.3.2	Interpretação dos resultados	50
3	RESULTADOS	51
4	DISCUSSÃO	62
5	CONCLUSÕES	64

CAPÍTULO 2	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) NA URINA ALIADA À SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA NO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE CANINA.....	65
-------------------	---	-----------

1	INTRODUÇÃO.....	66
2.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	68
2.2	REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA	68
2.3	ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTIVO DE FLETCHER	69
2.4	DETECÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO DE <i>LEPTOSPIRA</i> SSP. NA URINA POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	69
2.4.1	Extração do DNA	70
2.4.2	Amplificação do DNA por PCR	70
2.4.2.1	PRIMERS (OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES)	71
2.4.2.2	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO	71
2.4.3	Eletroforese	71
2.4.4	Análise dos produtos amplificados	72
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
3	RESULTADOS	73
4	DISCUSSÃO.....	79
5	CONCLUSÕES.....	82

CAPÍTULO 3	AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CRUZADA ENTRE OS SOROVARES ICTEROHAEMORRHAGIAE E COPENHAGENI DE <i>LEPTOSPIRA INTERROGANS</i> POR MEIO DO TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> (TIC).....	83
-------------------	--	-----------

1	INTRODUÇÃO.....	84
2	MATERIAIS E MÉTODOS	87
2.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	87
2.2	TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM).....	87
2.3	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> (TIC)	88
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
3	RESULTADOS	92
4	DISCUSSÃO.....	97
5	CONCLUSÕES.....	102

REFERÊNCIAS.....	103
-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial com altíssima incidência em regiões tropicais. No Brasil, além da questão ocupacional, esta doença tem caráter sazonal e está intimamente relacionada às épocas de chuvas e enchentes (ROMERO, et al., 2003). Animais de muitas espécies (domésticas e silvestres) podem tornar-se portadores dessa espiroqueta que se alberga preferencialmente nos túbulos renais (local de privilégio imunológico), contribuindo para a disseminação do microrganismo na natureza pela eliminação da leptospira na urina. O homem e muitas espécies animais são potenciais hospedeiros acidentais, após contato com urina contaminada (LEVETT, 2001).

Em cães, a infecção pelo sorovar icterohaemorrhagiae é caracterizada por doença hemorrágica aguda e insuficiências renal e hepática graves (MICHNA, 1970; WOHL, 1996). Os sorovares mais comumente incriminados na leptospirose canina são canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pomona e bratislava pertencentes aos sorogrupos canicola icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pomona e australis, respectivamente (GREENE, et al., 2006). Ao redor do mundo já foram isolados os sorovares australis, autumnalis, bratislava, canicola, grippotyphosa, hardjo, icterohaemorrhagiae, pomona, saxkaebing, sejroe (BRENNER, et al., 1999).

O diagnóstico clínico da leptospirose é baseado no histórico epidemiológico, no quadro clínico de caráter sistêmico, incluindo anorexia, prostração, desidratação, icterícia e, nas alterações laboratoriais indicativas de comprometimento renal e hepático. Atualmente, na rotina clínica, a confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico se dá pela pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), ELISA ou teste de aglutinação macroscópica em lâmina (LEVETT, 2001). Dentre os métodos sorológicos, a soroaglutinação microscópica é o mais comumente utilizado, sendo designado como teste de referência pela OMS (WHO, 2003) e, para sua realização, utiliza-se uma bateria de antígenos com os sorovares representantes de cada sorogrupo. As reações cruzadas e paradoxais entre sorovares podem dificultar o diagnóstico, especialmente durante a fase aguda da infecção (LEVETT, 2003; WHO, 2003) impedindo a identificação do sorovar infectante e, por isso, pode ser considerado

como um teste específico de sorogrupo (FAINE, 1999). Na bateria de antígenos deve se incluir sorovares representativos da região a ser estudada.

O isolamento positivo de leptospira do cultivo de amostras clínicas confere o diagnóstico definitivo de leptospirose. Os isolados devem ser identificadas, por meio de técnicas sorológicas, como a reação com anticorpos policlonais para identificação do sorogrupo (FAINE, 1982; WHO, 2003) e, por absorção cruzada de aglutininas (KMETY, et al., 1970) ou anticorpos monoclonais (TERPSTRA, et al., 1985), ou por métodos moleculares baseados na técnica de PCR, tais como o VNTR, para a determinação do sorovar infectante.

Contudo, devido ao crescimento fastidioso das leptospirosas, os resultados da cultura são demorados e muitas vezes ocorre contaminação por outros organismos que impedem crescimento das leptospirosas (SCHONBERG, 1981). O rápido diagnóstico da leptospirose é de extrema importância, pois quanto mais cedo iniciado o tratamento com antibióticos, maiores são as chances de cura. Técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) têm sido introduzidas para identificar material genético de leptospirosas na urina (LEVETT, 2001). A leptospirose pode ocorrer já nos primeiros dias de infecção, antes mesmo dos anticorpos serem detectáveis no soro (BAL, et al., 1994), sendo a leptospira passível de detecção pela PCR na urina logo no início da doença, podendo ser um método de diagnóstico precoce da leptospirose.

No Brasil, a inclusão do sorovar copenhageni na bateria de antígenos, ao lado do sorovar icterohaemorrhagiae, tem demonstrado a alta frequência de reação para o sorovar copenhageni, não só em cães (YASUDA, et al., 1980), mas também em animais de produção (OLIVEIRA, et al., 2001), silvestres (GIRIO, et al., 2004) e na espécie humana (PEREIRA, et al., 2000) de diversas regiões, já tendo sido isolado de cães (YASUDA, et al., 1980; CORDEIRO; SULZER, 1983). O sorovar copenhageni predomina em humanos com a forma pulmonar da leptospirose, caracterizada por hemorragias intersticiais e alveolares, resultando em hemoptise fulminante, imprevisível e incontrolável, levando à morte súbita por asfixia (SILVA, et al., 2002b; CARVALHO, et al., 2004). É possível, portanto, que o sorovar copenhageni seja responsável também pelo desenvolvimento de leptospirose clinicamente detectável em cães.

A imunidade desenvolvida contra a leptospira é específica de sorovar (FAINE, 1999). Assim, as vacinas produzidas contra sorovares do sorogrupo

icterohaemorrhagiae não protegem contra a infecção pelo sorovar canicola (BRUNNER; MEYER, 1950), justificando a inclusão de ambos os sorovares nas vacinas caninas. Contudo presença de reações cruzadas entre os diferentes sorovares, como é revelada pela reação de soroaglutinação microscópica, em que são detectados anticorpos aglutinantes contra vários sorovares, sugere a possível existência de proteção cruzada entre sorovares do mesmo sorogrupo (SONRIER, et al., 2000), como os sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991) ou, até mesmo, entre sorovares de diferentes sorogrupos (TABATA, et al., 2002). As vacinas que atualmente possuem o sorovar icterohaemorrhagiae em sua formulação conferem boa imunidade contra a infecção pelo sorovar homólogo. Entretanto pouco se conhece sobre a proteção conferida ao sorovar heterólogo copenhageni, embora do mesmo sorogrupo, o que necessita elucidação.

2 OBJETIVOS

- Tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. em amostras de urina de cães com suspeita clínica de leptospirose e a caracterização dos isolados por meio da técnica molecular VNTR e pela reação com anticorpos monoclonais.
- Comparar os resultados da leptospira na urina de cães por PCR com os obtidos na reação de soroaglutinação microscópica (SAM), avaliando a utilidade da PCR na urina para o diagnóstico da leptospirose canina, isoladamente ou em conjunto com a SAM.
- Avaliar, de forma indireta por meio do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro*, a proteção conferida pela vacina contendo sorovar icterohaemorrhagiae contra o sorovar copenhageni.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

Adolf Weil¹ (1886 apud ENRIETTI, 2001 , p. 312) foi o primeiro a descrever minuciosamente a enfermidade, caracterizada por icterícia, esplenomegalia e nefrite, após observar 4 casos clínicos em seres humanos em Heidelberg. Em 1892, Fielder² (apud ENRIETTI, 2001 , p. 312) emprestou à síndrome descrita por Weil as características de uma doença infecciosa, passando a denominá-la de “Doença de Weil”. Contudo, a nomenclatura *Leptospira interrogans* surgiu quando Stimson (1907) demonstrou, através da impregnação por prata, aglomerados de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente cuja morte foi atribuída à febre amarela. As espiroquetas tinham terminais em gancho e Stimson as chamou de *Spirochaetas interrogans* devido a sua semelhança com um ponto de interrogação. A partir da primeira Grande Guerra o estudo da leptospirose teve grande desenvolvimento e diversos cientistas passaram a pesquisar sobre o agente etiológico da “icterícia infecciosa” (ENRIETTI, 2001). O primeiro microrganismo do gênero *Leptospira* foi isolado de em água de poço por Wolbach e Binger (1914), a qual é atualmente conhecida como *Leptospira biflexa* e não patogênica. Miyajima³ (1915 apud ENRIETTI, 2001 , p. 313) foi o primeiro a identificar espiroquetas nos rins de ratos do campo, mas o papel do rato como fonte de infecção só foi comprovado por Ido et al. (1916). Nogushi, em (1917), propôs a criação do gênero *Leptospira* : “*It calls for a new genus, and on account of its fine and minute windings, the name Leptospira is suggested.*”. Em (1918), Ido et al. isolaram um microrganismo semelhante ao da doença de Weil, denominado *Spirochaeta hebdomadis*, o qual puderam separar sorologicamente da *L. Icterohaemorrhagiae*, introduzindo assim, os testes imunológicos para a diferenciação de leptospiros patogênicas. A partir disso,

¹ WEIL, A., 'Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit'. **Deutsches Archiv für klinische Medizin**, v. 39, p. 209-232, 1886.

² FIEDLER, A., Weitere Mittheilungen tiber die Weil'sche Krankheit, **Deutsches Archiv für Klinische Medizin**, v. 1, p. 232, 1892.

³ MIYAJIMA, M., **Boletim da Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo**, v. 2, p. 5, 1915.

numerosos outros sorotipos envolvendo humanos e animais foram descobertos por todo o mundo (GSELL, 1984).

A doença no cão, contudo, foi descrita antes que em humanos, por Hofer⁴ (1852 apud (GSELL, 1984), p. 476), que a denominou tifo canino. Mais tarde, em 1898, passou ser denominada como doença de Stuttgart (GSELL, 1984; ENRIETTI, 2001). Lucet⁵, em 1910 (apud ENRIETTI, 2001, p.316), foi aparentemente o primeiro a detectar espiroquetas em coágulos de sangue no tubo digestivo de cães doentes. Desde então diversos pesquisadores encontraram espiroquetas em amostras clínicas de cães (ENRIETTI, 2001). Krumbein e Frieling (1916), na Alemanha, admitiram, com base em observações epidemiológicas, a possibilidade de o cão ser portador de leptospira patogênica para o homem. Lukes e Derbeck⁶ (1923, apud ENRIETTI, 2001, p. 316) denominaram esse microrganismo como *Spirochaeta melanogenes canis*. Em (1934), Schüffner propôs o nome *Leptospira canicola*.

No Brasil a leptospirose foi descrita pela primeira vez em (1917), por Henrique Beaurepaire de Aragão, que demonstrou a presença do organismo em ratos. Infecções com *Leptospira interrogans* em humanos foram reconhecidas pela primeira vez por McDowel (1917), no Paraná. Na cidade do Rio de Janeiro, Dacorso Filho⁷ (1940 apud BROD, et al., 2005, p. 295) analisou 11 cães com manifestações clínicas compatíveis com leptospirose, demonstrando após a necrópsia, a presença do agente causador. O primeiro isolamento de leptospira de cão no Brasil, tipificado (sorovar Ictarohaemorrhagiae), foi feito por Guida (1948). Por ser uma doença de alta incidência em regiões tropicais, causar prejuízos econômicos e ter importante caráter zoonótico, ao longo do tempo, as pesquisas a respeito da leptospirose no Brasil se intensificaram e atualmente diversos grupos de pesquisadores, em colaboração entre si e com grupos internacionais, desenvolvem avançados estudos a respeito da leptospirose humana e animal.

⁴ HOFER. Typhoid of the Dog. **Repertorium der Tierheilkunde**, v. 13, p. 201-211, 1852.

⁵ LUCET, M. Sur la presence de Spirochètes dans un cas de gastro-entèrite hémorragique chez le chien. **Compt. Rend. Acad. Sci**, v. 151, p. 260-262, 1910.

⁶ LUKES; DERBECK, M. **Arch. Tierärztl**, p. 25, 1923.

⁷ DACORSO FILHO, P. Leptospirose canina. **O Hospital**, v. 18, p. 797-809, 1940.

3.2 ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO AGENTE

A leptospirose é causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. As leptospirosas são bactérias espiroquetas, espiraladas, flexíveis e móveis, compostas de um cilindro protoplasmático que se enrola ao redor de um filamento axial central. O envelope externo é composto por lipopolissacarídeos (LPS) e mucopeptídeos antigênicos (GREENE, et al., 2006).

Até 1989, o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que compreende todas as estirpes patogênicas; e *Leptospira biflexa*, compreendendo leptospirosas saprófitas isoladas do ambiente. A *Leptospira biflexa* se diferencia da *L. interrogans* por crescer a 13°C e na presença de 8-azaguanina e também por não formar células esféricas em solução de NaCl a 1M (FAINE; STALLMAN, 1982). Essas duas espécies são divididas em numerosos sorovares definidos pela aglutinação após a absorção cruzada com antígeno homólogo (KMETY, et al., 1970). A partir de então, o gênero *Leptospira* passou a ser classificado em mais de 16 novas espécies com base em sua correlação genética. Contudo, a classificação genética é problemática para o microbiologista clínico, pois é incompatível com o sistema de sorogrupo, utilizado há anos por clínicos e epidemiologistas, o qual necessita ser mantido, até que um sistema de identificação mais simples com base no DNA seja desenvolvido e validado (LEVETT, 2001).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

As leptospirosas podem ser transmitidas por contato direto entre indivíduos ou contato indireto com urina de um animal infectado ou água contaminada. Os animais, incluindo o Homem, podem ser divididos em hospedeiros de manutenção e acidentais. A doença se mantém na natureza por infecção crônica dos túbulos renais dos hospedeiros de manutenção, sendo o Homem um hospedeiro acidental. Alguns animais podem ser considerados hospedeiros de manutenção de alguns sorovares e hospedeiros acidentais de outros, cuja infecção pode causar doença grave ou fatal (LEVETT, 2001). Roedores de diferentes espécies, especialmente o *Rattus*

norvergicus em centros urbanos, são os mais importantes hospedeiros de manutenção, podendo ser reservatório de diversos sorovares (IDO, et al., 1917). Os animais domésticos também podem ser hospedeiros de manutenção, como o cão, considerado reservatório do sorovar canicola (BOLIN, 1996). Há grande variação entre cada região do mundo em relação aos hospedeiros e aos sorovares que carregam, sendo de extrema importância o conhecimento dos sorovares prevalentes e de seus hospedeiros de manutenção em cada uma dessas regiões (LEVETT, 2001).

Ao redor do mundo a infecção humana por leptospira está ligada a atividades ocupacionais, recreacionais ou avocacionais (MICHNA, 1970). Nos cães, a infecção leptospírica ocorre em cenários semelhantes aos do homem (GREENE, et al., 2006). A incidência é significativamente maior em países de clima tropical, onde sua ocorrência está intimamente ligada às épocas de chuva. A porta de entrada usual é através de abrasões ou cortes na pele ou via conjuntiva, podendo ainda a infecção se estabelecer pelo prolongado contato da pele intacta com a água contaminada (LEVETT, 2001). Para os cães urbanos, assim como para o homem, a grande fonte de infecção é o contato direto com ratos ou indireto com sua urina contaminada. Nas áreas rurais ou de mata, as fontes de infecção estão relacionadas a roedores e outros animais silvestres (GREENE, et al., 2006).

3.4 PATOGENIA

A leptospira se multiplica rapidamente após entrar no sistema vascular, espalhando-se por muitos órgãos e tecidos, incluindo rins, fígado, baço, sistema nervoso central, olhos e trato genital (GREENE, et al., 2006). Esta fase, a leptospiremia, pode persistir por diversos dias a até uma semana após a exposição ao agente, e pode estar associada a febre, depressão e mialgia (WOHL, 1996). Durante a fase aguda, diversos sistemas do organismo podem sofrer danos, tais como o vascular e o respiratório. A extensão dos danos aos órgãos depende da virulência do organismo (vinculada à produção de toxinas, aderência e formação de imunocomplexos) e da susceptibilidade do hospedeiro (GREENE, et al., 2006). A leptospiremia termina como resultado do surgimento de anticorpos específicos e

subseqüente fagocitose e clareamento das leptospiplas da circulação, que passam a se albergar nos túbulos renais, iniciando a fase de leptospirúria (MICHNA, 1970). A colonização renal pelas leptospiplas leva ao comprometimento agudo da função renal que pode resultar da diminuída filtração glomerular devido ao edema renal que compromete a perfusão sanguínea do órgão.

A imunidade à leptospirose é predominantemente humoral e fortemente restrita ao sorovar homólogo ou sorovares intimamente relacionados (SONRIER, et al., 2000). A especificidade de sorovar é conferida por antígenos do LPS (GAMBERINI, et al., 2005).

3.5 SINAIS CLÍNICOS

O espectro de sintomas na leptospirose é extremamente amplo e a descrição da clássica doença de Weil é apenas a apresentação mais grave da doença. Como já citado, a apresentação clínica da leptospirose é bifásica, uma fase aguda ou septicêmica (leptospiemia) que dura cerca de uma semana, seguida de uma fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de leptospiplas na urina (leptospirúria). No homem as formas principais de leptospirose são a anictérica e ictérica, sendo a primeira de baixa mortalidade caracterizada por infecção subclínica ou de grau leve, podendo haver febre de início súbito, mialgia, dores de cabeça, dor abdominal, entre outros sintomas. A forma ictérica é muito mais grave, com alta mortalidade e complicações multi-sistêmicas, como vasculite, alteração da função hepática, insuficiência renal aguda e freqüente envolvimento pulmonar.

No cão, embora a maioria dos sorovares possa causar leptospiemia e vasculite, o envolvimento dos órgãos está relacionado ao sorovar infectante (GEISEN, et al., 2007). A infecção clássica pelo sorovar icterohaemorrhagiae é caracterizada por doença hemorrágica aguda, insuficiência hepática e renal. O cão se torna ictérico, febril e apresenta sinais de dores musculares. Na infecção pelo sorovar canicola, os cães apresentam nefrite intersticial aguda com menor comprometimento hepático (WOHL, 1996).

3.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico inicial da leptospirose é feito com base nos sintomas e sinais clínicos, avaliação do histórico e contexto epidemiológico e pelos resultados de exames laboratoriais, tais como elevação de atividade de enzimas hepáticas, bilirrubina, uréia e creatinina séricas. A natureza não específica dessas alterações pode apenas sugerir um diagnóstico de leptospirose, o qual deve ser confirmado por testes microbiológicos, sorológicos e moleculares (LEVETT, 2001).

As leptospiras podem ser visualizadas em material clínico em microscópio de campo escuro (Turner⁸, 1970 apud LEVETT, 2001, p. 308). Contudo, esse método não é atualmente recomendado como procedimento de rotina por ser pouco sensível, além de artefatos de técnica e outras estruturas presentes na amostra poderem ser confundidos com leptospiras (WHO, 2003). Métodos de coloração foram aplicados para aumentar a sensibilidade do exame microscópico direto e incluem a impregnação por prata (STIMSON, 1907) imunofluorescência (HODGES; EKDAHL, 1973), imunoperoxidase (TERPSTRA, et al., 1983) e, mais recentemente, métodos de imunohistoquímica (UIP, et al., 1992; HAAKE, et al., 2000; GIRIO, et al., 2004)

Na rotina clínica, a confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico se dá pela pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), ELISA ou teste de aglutinação macroscópica em lâmina (LEVETT, 2001). Dentre os métodos sorológicos, a soroaglutinação microscópica (COLE JR., et al., 1973) é o mais comumente utilizado, sendo designado como teste de referência pela OMS (WHO, 2003), no qual o soro do paciente reage com suspensões de antígenos vivos de sorovares de leptospira e, para sua realização, utiliza-se uma bateria de antígenos com os sorovares representantes de cada sorogrupo. Os soros de indivíduos com títulos positivos geralmente apresentam reações cruzadas a uma variedade de sorovares, dificultando a identificação do sorovar infectante (WHO, 1967) e, por isso, a soroaglutinação microscópica pode ser considerada um teste específico de sorogrupo (FAINE, 1999). Ainda podem ocorrer reações paradoxais (um animal

⁸ TURNER, L. H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 623–646, 1970.

infectado por um sorovar apresenta títulos de anticorpos para outros que não o sorovar infectante) (GALTON, et al., 1965; LEVETT, 2003; WHO, 2003), só sendo possível afirmar o sorovar infectante a partir do isolamento e identificação da amostra isolada. Na bateria de antígenos deve se incluir sorovares representativos da região a ser estudada. Para a confirmação sorológica da leptospirose em um indivíduo, recomenda-se a demonstração de incremento ou diminuição de 4 vezes o título de anticorpos aglutinantes entre a fase aguda e a convalescença (GALTON, et al., 1965). Em áreas endêmicas, uma única amostra com título igual ou maior a 800 pode ser considerada diagnóstica, mas recomenda-se a utilização iguais ou maiores que 1.600 para essa decisão (WHO, 2003). A soroaglutinação microscópica também é apropriada para inquéritos soropidemiológicos e pode fornecer informações a respeito de quais sorogrupos estão presentes em uma população. Outros métodos sorológicos, tais como o ELISA, têm sido utilizados principalmente para a distinção entre anticorpos IgM e IgG (HARTMAN, et al., 1984) e diversas modificações têm sido aplicadas (LEVETT, 2001). Ainda, métodos como a aglutinação macroscópica em lâmina (BRANDÃO, et al., 1998), radioimunoensaio (KAWAOKA, et al., 1979) e hemaglutinação indireta (SULZER; JONES, 1973) têm sido utilizados, mas são mais apropriados para o diagnóstico da leptospirose humana.

O isolamento do agente pode ser feito a partir de amostras clínicas de animais suspeitos e doentes e mesmo de material coletado *post-mortem* (tecidos e órgãos). Devido à leptospiremia ocorrer nos estágios precoces da doença, o sangue para cultivo deve ser coletado o mais breve possível após o indivíduo se apresentar em consulta. Outras amostras também podem ser submetidas ao cultivo durante a primeira semana da doença, como líquido cefalorraquidiano. Geralmente a urina é cultivada a partir do início da segunda semana de doença sintomática (LEVETT, 2001). Contudo, a partir de 2 dias de infecção, leptospiras já podem ser vistas no túbulo proximal, o que coincide com o início da eliminação de leptospiras na urina e, então, deve ser cultivada desde o mais cedo possível, sendo o fluido ideal para cultura (GREENE, et al., 2006). A sobrevivência das leptospiras na urina e mesmo em outras amostras clínicas é limitada e, tais amostras, devem ser processadas o quanto antes em meio de cultura confiável com antibiótico seletivo (THIERMANN, 1984). A contaminação das amostras por outros microrganismos que podem inibir o crescimento da leptospira (SCHONBERG, 1981) é o principal problema envolvido no isolamento desse agente (ADLER, et al., 1986; GULLAND, et al., 1996). Os meios

de cultivo das leptospirosas são líquido, semi-sólido ou sólido. Os meios mais utilizados são o Ellinghausen, McCullough, Johnson, Harris (EMJH) e o meio de Fletcher (ambos semi-sólidos). Outros meios como o de Korthof e de Stuart também podem ser utilizados (FAINE, 1982). As culturas são incubadas a uma temperatura entre 28 e 30°C e examinadas semanalmente por microscopia de campo escuro durante pelo menos 2 meses. Amostras com possível contaminação podem ser inoculadas em meios de cultura seletivos contendo antibióticos. A identificação dos isolados pode ser feita por meio de métodos sorológicos, tais como a absorção cruzada de aglutininas (KMETZ, et al., 1970) e reação com painel de anticorpos monoclonais (KOBAYASHI, et al., 1985) e, mais recentemente, técnicas moleculares, tais como PCR por endonucleases de restrição (REA) (MARSHALL, et al., 1984), polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP) (ZUERNER, et al., 1993), eletroforese em gel em campo de impulso (PFGE) (TAYLOR, et al., 1991) e análise de número variável de seqüências repetidas (VNTR) (MAJED, et al., 2005; SALAUN, et al., 2006).

O diagnóstico molecular da leptospirose pela detecção direta de material genético de leptospirosas em amostras clínicas tem sido amplamente estudado (LEVETT, 2001) e diversos pares de primers foram desenvolvidos (MERIEN, et al., 1992; BAL, et al., 1994; HARKIN, et al., 2003a) com base em diferentes alvos, mais frequentemente o gene 16S rRNA. A limitação do diagnóstico com base no PCR é a inabilidade da maioria desses testes em identificar o sorovar infectante, mas métodos foram desenvolvidos para diferenciar leptospirosas patogênicas de não patogênicas (BRANGER, et al., 2005). A PCR, porém apresenta vantagens, pois é um método rápido e de baixo custo podendo ser aplicado ao diagnóstico clínico (HARKIN, et al., 2003a).

3.7 TRATAMENTO

A terapia de suporte para animais com leptospirose depende dos sinais clínicos, da presença de disfunção renal e/ou hepática e outros fatores complicantes. Deve-se promover a hidratação com fluidoterapia intravenosa (IV), a qual pode reverter quadros de oligúria e anúria, devendo ser usados diuréticos em casos mais

dramáticos, podendo ser necessário, até mesmo, diálise peritoneal. Também podem ser utilizados anti-eméticos quando da ocorrência de vômito e a alimentação deve ser suspensa até que não haja mais episódios eméticos. Em alguns casos da leptospirose hemorrágica, pode ser necessária a transfusão de plaquetas ou sangue total. A terapia com antibióticos deve começar tão breve possível e a penicilina e seus derivados são os antibióticos de escolha para o tratamento da leptospiremia, embora não eliminem o estado de portador. A doxiciclina pode ser usada para a terapia inicial ou para a eliminação do estado de portador (GREENE, et al., 2006).

3.8 IMPORTÂNCIA COMO ZOONOSE E PREVENÇÃO

A leptospirose é uma zoonose importante no Brasil e o cão, por seu íntimo contato com o homem, pode se tornar uma fonte de infecção (LOBO, et al., 2004; BROD, et al., 2005). Nos Estados Unidos, cerca de 30% dos casos de leptospirose humana estão ligados ao contato direto ou indireto com ratos e outros 30% relacionados ao contato com cães (HEATH JR., et al., 1965). A urina contaminada é a fonte mais importante de infecção e proprietários de cães, veterinários e profissionais que tratam de animais podem se infectar (WOHL, 1996).

Para a prevenção da leptospirose, tanto humana quanto canina, é preciso a implementação de uma série de medidas de controle, como o controle da população de roedores, a manutenção de um ambiente desfavorável à sobrevivência das leptospirosas e isolamento e tratamento dos animais infectados, além de se evitar o contato com água de enchente para que não ocorra a disseminação da doença. Medidas de saneamento básico são importantes no controle da leptospirose. Pessoas que trabalham na limpeza de lama, entulhos e desentupimento de esgoto devem usar botas e luvas de borracha. Veterinários e outros profissionais que trabalham com animais domésticos e silvestres susceptíveis à leptospirose devem se prevenir quando em contato com um animal com suspeita da doença.

Além dessas medidas, a vacinação dos animais domésticos é de extrema importância. As vacinas atualmente existentes contra a leptospirose canina contêm bacterinas inativadas, na maioria das vezes, os sorovares icterohaemorrhagiae e canicola, conhecidos mundialmente como os mais prevalentes em cães. Outros

sorovares, tais como grippotypbosa e pomona, nos Estados Unidos, têm sido adicionados às vacinas, pois cães vacinados apenas contra canicola e icterohaemorrhagiae são susceptíveis à infecção pelos sorovares pomona e grippotypbosa (BIRNBAUM, et al., 1998). No Brasil, apesar da baixa ocorrência desses dois últimos sorovares, essas vacinas têm sido largamente utilizadas. Contudo, as vacinas utilizadas em uma dada região devem conter bacterinas dos sorovares ali prevalentes. No caso do Brasil, o sorovar copenhageni tem sido detectado como o mais prevalente em cães, já existindo aqui vacinas que incluem esse sorovar em sua formulação. A imunização em cães é efetiva em reduzir a prevalência e a gravidade da leptospirose canina e atualmente algumas vacinas previnem o estado de portador, o qual está associado com o risco zoonótico.

**CAPÍTULO 1 ISOLAMENTOS DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS*, SOROVARES
COPENHAGENI E CANICOLA, DA URINA DE CÃES COM
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEPTOSPIROSE EM SÃO PAULO
(BRASIL)**

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a inclusão do sorovar copenhageni na bateria de antígenos, ao lado do sorovar icterohaemorrhagiae, tem demonstrado sua alta frequência, tanto em cães (YASUDA, et al., 1980), como em animais de produção (OLIVEIRA, et al., 2001), silvestres (GIRIO, et al., 2004) e humanos (PEREIRA, et al., 2000) de diversas regiões. Este sorovar já foi isolado de cães de rua (YASUDA, et al., 1980), de um cão clinicamente doente (CORDEIRO; SULZER, 1983), de humanos (SAKATA, et al., 1992; KO, et al., 1999; SILVA, et al., 2002b; ROMERO; YASUDA, 2006), de ratos e animais silvestres (GIORGI, et al., 1984; CORRÊA, et al., 2004). O sorovar copenhageni predomina em humanos com a forma pulmonar da leptospirose, caracterizada por hemorragias intersticiais e alveolares, resultando em hemoptise fulminante, imprevisível e incontrollável, levando à morte súbita por asfixia (SILVA, et al., 2002b; CARVALHO, et al., 2004). Um estudo reproduziu os mesmos sinais clínicos desta forma da leptospirose em porcos da guiné (NALLY, et al., 2004). O sorovar copenhageni, portanto, pode ser responsável também pelo desenvolvimento de leptospirose clinicamente detectável em cães.

O isolamento de leptospira de amostras clínicas, como a urina, confere o diagnóstico definitivo de leptospirose. Os isolados devem ser identificados por meio de técnicas sorológicas, como a reação com anticorpos policlonais para identificar o sorogrupo (FAINE, 1982; WHO, 2003) e, por absorção cruzada de aglutininas (KMETY, et al., 1970) ou anticorpos monoclonais (TERPSTRA, et al., 1985), ou métodos moleculares com base na PCR, como o VNTR, para determinar o sorovar infectante.

Neste trabalho realizou-se a tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. em amostras de urina de cães com suspeita clínica de leptospirose e a caracterização dos isolados pela técnica molecular de VNTR e pela reação com anticorpos monoclonais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram incluídos, nesse estudo, 29 cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período entre março de 2006 e maio de 2007, para os quais se estabeleceu diagnóstico clínico de leptospirose com base no histórico e contexto epidemiológico (presença ou contato com ratos), nas manifestações clínicas (anorexia, febre, prostração, dores musculares, perda de peso e/ou icterícia) e alterações bioquímicas (aumento das concentrações séricas de uréia, creatinina, bilirrubinas e proteínas séricas totais e albumina, aumento da atividade de enzimas hepáticas – ALT e FA). As análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado Lyasis[®] utilizado na rotina do hospital.

Coletou-se amostras de soro de todos os animais no momento da primeira consulta e, para alguns animais, foi possível coletar mais amostras de soro (entre 2 e 4) com intervalo mínimo de 10 dias entre coletas, para a realização da soroaglutinação microscópica. Também coletou-se urina desses animais no momento da primeira consulta, por cistocentese, antes que fosse instituído qualquer tratamento com antibióticos.

2.2 TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)

Para a detecção de anticorpos aglutinantes anti-leptospíricos, as amostras de soro foram submetidas à reação de soroaglutinação microscópica descrita por Cole Jr. et al. (1973). Foram incluídos na bateria de antígenos 24 sorovares (pertencentes a 14 sorogrupos) patogênicos e/ou de interesse regional e 3 sorovares saprófitos, de acordo com a técnica utilizada rotineiramente no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP (Quadro 1).

Sorogrupo	Variante sorológica	Sorogrupo	Variante sorológica
Australis	australis	Javanica	javanica
	bratislava	Panama	panama
Autumnalis	autumnalis	Pomona	pomona
	butembo		fronn
Ballum	castellonis	Pyrogenes	pyrogenes
Batavia	bateviae	Sejroe	hardjo (<i>hardjoprajitno</i>)
Canicola	canicola		wolffi
Celledoni	whitcombi		hardjo (<i>hardjobovis</i>)
Cynopteri	cynopteri	Shermani	shermani
Grippotyphosa	grippotyphosa	Tarassovi	tarassovi
Hebdomadis	hebdomadis	Andamana	andamana
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	Seramanga	patoc*
	icterohaemorrhagiae	Djasiman	sentot*
		Mini	mini*

Quadro 1 - Variantes sorológicas de leptospiros patogênicas e saprófitas (*) incluídas na bateria de antígenos utilizada na reação de soroaglutinação microscópica – São Paulo – 2008

Ambos os sorovares *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae*, pertencentes ao sorogrupo *icterohaemorrhagiae*, foram incluídos na bateria de antígenos. As leptospiros de cada sorovar foram cultivadas em meio EMJH suplementado com 10% de soro de coelho inativado. Foram utilizados apenas cultivos puros, isentos de contaminação, livres de auto-aglutinação, com 7 a 10 dias de crescimento e, por estimativa de densidade (escala de McFarland), contendo cerca de 100 a 200 leptospiros por campo microscópico (200 vezes). As amostras de soro foram diluídas em solução tamponada de Sorënsen, inicialmente na diluição 1:100 para triagem e, quando reagentes, diluídas sucessivamente em razão dois. Em cada poço da microplaca de aglutinação foram colocados 50µL da diluição do soro a ser testada e 50 µL da cultura de leptospira. Foram consideradas positivas as reações em que se observou aglutinação de pelo menos 50% das leptospiros. O título foi dado como a recíproca da maior diluição em que houve 50% aglutinação.

2.3 ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTIVO DE FLETCHER

Cada amostra de urina foi diluída em solução salina em diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em tubo contendo 50 ml meio de Fletcher comum e em outro com meio de Fletcher acrescido de 5-fluorouracil na concentração final de 100 µg/ml (SANTA ROSA, 1970; MYERS, 1985), os quais foram incubados entre 28-30°C, e observados semanalmente por cerca de dois meses (FAVERO, et al., 1997) para verificação de anel de crescimento superficial (zona de Dinger) de leptospiros no meio (MYERS, 1985) e confirmação da presença leptospiros por visualização de uma gota da amostra em microscópio dotado de campo escuro (Olympus® - modelo Bx40) com magnificação de 200 vezes.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

A caracterização dos isolados se deu por métodos sorológicos (reação com anticorpos policlonais e monoclonais) e molecular (VNTR), para determinação do sorogrupo e sorovar infectante.

2.4.1 Reação dos isolados com anti-soro policlonal de coelho para sorogrupagem

As amostras isoladas de leptospira foram submetidas à reação com anti-soro policlonal de coelho, no qual os isolados foram utilizados como antígenos, na SAM, e testados contra anti-soros policlonais de coelho (BgVV - Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin - Berlin - Germany), para identificação do sorogrupo mais provável (FAINE, 1982; WHO, 2003). Foram utilizados anti-soros policlonais de coelho contra os sorovares australis, bratislava,

autumnalis, castellonis, bataviae, canicola, cynopteri, grippotyphosa, hebdomadis, copenhageni, javanica, panama, pomona, pyrogenes, hardjoprajitno, wolfi e patoc.

2.4.2 Caracterização molecular pela técnica de VNTR-PCR

A caracterização molecular das amostras isoladas foi realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – BA, da Fundação Oswaldo Cruz, de acordo com a técnica desenvolvida por Silva (2006) em sua dissertação de mestrado, adaptada de técnicas utilizadas no Instituto Pasteur (Paris – França) (MAJED, et al., 2005; SALAUN, et al., 2006), para onde uma alíquota de cada uma das mesmas amostras isoladas também foi enviada para caracterização por VNTR.

2.4.2.1 Purificação de DNA genômico total dos isolados

Para cada um dos isolados analisados, foram obtidos cerca de 20 ml de cultura em meio líquido EMJH sob temperatura de 29°C. Todo o volume foi centrifugado por 20 minutos a uma rotação de 25.000 g (Beckman J-25I). Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi re-suspendido com 1 ml de PBS 0,15M pH 7,2 e todo o conteúdo transferido para um tubo de 1,5 ml e centrifugado sob as condições mencionadas acima. A partir do sedimento obtido, o DNA genômico total foi purificado usando o Kit de purificação de DNA *QIAamp DNA Mini Kit* (Quiagen). Para o controle positivo, efetuou-se o mesmo procedimento com uma cultura da cepa de referência L1 130 (FIOCRUZ) de *Leptospira interrogans*, sorovar copenhageni e, para o controle negativo, esse procedimento foi realizado com meio de cultivo puro. O DNA purificado foi usado para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Na técnica de VNTR utilizada no Instituto Pasteur (Paris – França) a cepa de referência de *Leptospira interrogans* utilizada foi a RGA sorovar icterohaemorrhagiae (WHO/FAO Leptospiracid Reference Laboratory).

2.4.2.2 Amplificação de VNTR por PCR

2.4.2.2.1 Primers (oligonucleotídeos iniciadores)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar os loci de VNTR 4, 7, 10, e avaliar os polimorfismos genotípicos entre isolados e a cepa de referência L1 130 de *Leptospira interrogans*, sorovar copenhageni (FIOCRUZ). Para tanto foram desenhados os primers (oligonucleotídeos iniciadores) VNTR 4bis (4a bis – 5' – AAG TAA AAG CGC TCC CAA GA – 3' e 4b bis – 5'- ATA AAG GAA GCT CGG CGT TT – 3'), VNTR 7bis (7a bis 5' – GAT GAT CCC AGA GAG TAC CG – 3' e 7b – 5' – TCC CTC CAC AGG TTG TCT TG – 3') e VNTR 10bis (10a bis – 5' – GAG TTC AGA AGA GAC AAA AGC – 3' e 10b bis – 5' – ACG TAT CTT CAT ATT CTT TGC G – 3'), com base nas regiões flangeadoras dos loci que contêm a região *Variable-Number Tandem-Repeats* no genoma da *Leptospira* (SALAUN, et al., 2006).

2.4.2.2.2 Condições de amplificação

A mistura dos reagentes foi preparada em tubos de 1,5 ml, contendo para cada reação: 5 µl de tampão 10x (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl - Invitrogen); 3,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen); 1,6 µl de dNTP Mix 25 mM (*GE Healthcare*); 0,5 µl de cada primer 100 µM (VNTR 10bis, ou VNTR 7bis, ou VNTR 10bis) (*Operon*); 0,2 µl de *Taq DNA polymerase, recombinant*, 500 U (Invitrogen); 37,7 µl de água ultra pura para PCR (Gibco BBL) completando o volume do Mix para 49 µl ao qual se adicionou 1 µl do DNA purificado. A amplificação do DNA seguiu as condições sugeridas (MAJED, et al., 2005) que seguem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e, então, uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

2.4.2.3 Eletroforese

Os produtos amplificados e um marcador (Invitrogen) de 100 pares de bases (pb) (para estimar o tamanho do produto amplificado) foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, e submetidos a uma corrente constante de 5 volts / cm por 2 horas, empregando tampão TBE 1x (Tris-Base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Após a eletroforese, corou-se o gel com brometo de etídio para aquisição de imagem em aparelho transiluminador Quantity One (BioRad) com luz ultra violeta.

2.4.2.4 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados das cepas de referência serviram de padrão para a análise dos resultados dos isolados testados. O número de repetições em cada um dos três loci (VNTR 4, VNTR 7 e VNTR 10) foi estimado, através do tamanho dos produtos amplificados por cada primer, tamanho da região flanqueadora (seqüência de nucleotídeos não transcritos localizados antes do ponto em que se inicia transcrição [região flanqueadora 5'] e após o ponto onde termina a transcrição [região flanqueadora 3']) e tamanho da repetição, a partir da fórmula a seguir, com base nos valores da tabela 1 (SALAUN, et al., 2006):

$$\text{Número de repetições} = \frac{\text{tamanho do produto amplificado (pb)} - \text{tamanho da região flanqueadora (pb)}}{\text{tamanho da repetição (pb)}}$$

Tabela 1 - Tamanho em pares de bases (pb) da região flanqueadora e da repetição para os loci VNTR 4, 7 e 10 de *Leptospira interrogans* – São Paulo - 2008

Locus	Região Flanqueadora	Repetição
VNTR 4	425	34
VNTR 7	299	46
VNTR 10	420	46

Adaptado de Salaün, et al (2006)

Silva (2006) produziu, a partir desses dados, uma tabela com os tamanhos dos produtos amplificados por cada primer, de acordo com o número de repetições para cada loci VNTR 4, 7 e 10 (Tabela 2).

Tabela 2 - Tamanho dos fragmentos em pares de bases para cada número de repetições dos loci VNTR 4 (4 bis), 7 (7 bis) e 10 (10 bis), de *Leptospira interrogans* – São Paulo - 2008

Número de repetições	Tamanho dos produtos amplificados (pares de base)		
	4 bis	7 bis	10 bis
1	459	345	466
2	496	391	512
3	527	437	558
4	561	483	604
5	595	529	650
6	629	575	696
7	663	621	742
8	697	667	788
9	731	713	834
10	765	759	880
11	799	805	926
12	833	851	972
13	867	897	1018
14	901	943	1064
15	935	989	1110

Adaptado de Silva (2006).

2.4.3 Determinação do sorovar de isolados de leptospira do sorogrupo Icterohaemorrhagiae por meio de anticorpos monoclonais (AcM)

A determinação do sorovar de isolados de leptospira pertencentes ao sorogrupo icterohaemorrhagiae foi realizada a partir da reação destes com anticorpos monoclonais específicos anti-leptospira segundo o recomendado (FAINE, 1982; WHO, 2003), no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Bahia, da Fundação Oswaldo Cruz.

2.4.3.1 Descrição da técnica

Foram utilizados os anticorpos monoclonais específicos para a determinação do sorovar do isolado do sorogrupo icterohaemorrhagiae, expostos no quadro 2.

Anticorpo Monoclonal	Descrição
F70 C24	Reconhece especificamente o sorovar copenhageni
F70 C14-10	Reconhece especificamente o sorovar icterohaemorrhagiae
F12 C3-11	Reconhece os sorovares icterohaemorrhagiae e Copenhageni e mais nenhum outro sorovar pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae
F89 C12	Reconhece todos os sorovares pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae menos o sorovar icterohaemorrhagiae

Quadro 2 - Anticorpos monoclonais utilizados na identificação do sorovar de isolados pertencentes ao sorogrupo icterohaemorrhagiae – São Paulo – 2008.

Os anticorpos monoclonais foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C para sedimentação de eventuais impurezas. Após isso, diluiu-se 10µL de cada soro com 0,49 ml de PBS 1X, resultando em uma diluição inicial de 1:50. O soro foi titulado em placas Falcon com 96 poços de fundo chato em diluições de razão 2, até uma diluição final de 1:51.200. Cada diluição dos anticorpos monoclonais (50µL) foi confrontada com 50 µL da cultura da amostra isolada. Como controle positivo, incluiu-se a cepa de referência L1 130 de *Leptospira interrogans*, sorovar copenhageni e a cepa de referência RGA de *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae para serem confrontadas com os anticorpos monoclonais. Como controle negativo interno, foram utilizadas as mesmas cepas de referência às quais, em vez de soro, adicionou-se PBS 1X. As placas foram agitadas com movimentos circulares por aproximadamente 15 segundos e então incubadas por 2 horas em estufa bacteriológica BOD à 28 a 30°C. Foram consideradas positivas as reações em que houve pelo menos 50% de aglutinação das leptospiros.

2.4.3.2 Interpretação dos resultados

Para que um isolado seja identificado como sorovar icterohaemorrhagiae, este deve reagir com o AcM F12 C3-11 e com o AcM F70 C14-10 em altos títulos (>12.800) e não reagir com o AcM F70 C24 ou F89 C12. Da mesma forma, para que um isolado seja identificado como sorovar copenhageni, deve reagir com o AcM F70 C24, AcM F12 C3-11 e AcM F89 C12 em altos títulos (>12.800) e não reagir com o AcM F70 C14-10.

3 RESULTADOS

Dos cães incluídos nesse estudo, 14 não tinham raça definida e 15 eram de raças variadas (Cocker Spaniel, Rottweiler, Poodle, Pit Bull, Pastor Alemão, São Bernardo, Boxer, Pinscher e Tekel), sendo 10 fêmeas e 19 machos, com ampla faixa etária entre 3 meses e 11 anos de idade. Apenas um dos cães estava com vacina atualizada aplicada por médico veterinário. Os demais cães apresentavam vacinação desatualizada (18), ou a vacina foi aplicada pelo proprietário (5) ou nunca haviam recebido vacina (5). A maioria dos cães apresentava sinais como apatia, disorexia, emese, diarréia e desidratação e icterícia (Quadro 3). À exceção de um cão (creatinina = 1,0 mg/dl; uréia = 33,4 mg/dl), os demais apresentaram alteração da função renal na primeira consulta, com valores de creatinina variando entre 2,8 e 12,7 mg/dl (média = 6,83 mg/dl) e de uréia entre 135 e 777,3 mg/dl (média = 406,40 mg/dl). Nos cães em que se realizou a avaliação da função hepática na primeira consulta (20), obteve-se os valores médios de proteína total = 6,78 g/dl, albumina = 2,61 g/dl, fosfatase alcalina = 1346,93 U/l e alaninamainotransferase = 220,33 U/l. A bioquímica sérica não foi realizada para os animais de nº 10 e 12, provenientes de Clínica Veterinária Santa Maria – Vila Nova Cachoeirinha – São Paulo – SP, com sinais clínicos histórico muito sugestivos de leptospirose e dos quais foram enviadas amostras de soro e urina insuficientes para todos os testes desse experimento, sendo as amostras reservadas preferencialmente para os testes diagnósticos específicos de leptospirose (SAM, Isolamento e PCR) (Quadro 4).

Cão	Raça	Sexo	Idade	Sinais clínicos
1 ^{at}	SRD	M	5a	apatia, anorexia, diarreia, desidratação, icterícia
2 ^a	SRD	F	2a 7m	prostração, anorexia, diarreia, desidratação, icterícia
3 ^{bt}	SRD	M	6a	apatia, anorexia, hematoquesia, emese, oligodipsia, desidratação
4 ^{at}	SRD	M	3a	apatia, emese, fezes pastosas, icterícia
5 ^{at}	Cocker Spaniel	M	1a 8m	prostração, anorexia, emese, diarreia, desidratação
6 ^{at}	SRD	M	4m	prostração, emese, anorexia, icterícia, desidratação
7 ^{bt}	SRD	M	2a 8m	prostração, anorexia, hematemese, diarreia, fezes escuras, oligodipsia, dispnéia, oligúria, desidratação
8 ^{ct}	Rottweiler	F	7a	apatia, anorexia, emese
9 ^{at}	Poodle	F	8a	diarreia, melena, emese, apatia, anorexia, oligodipsia, anúria, icterícia, desidratação
10 ^{dt}	SRD	M	5a	prostração, anorexia, emese, diarreia, icterícia, desidratação
11 ^{d#}	SRD	F	5m	apatia, emese, icterícia
12 ^{dt}	Pit bull	M	7m	prostração, anorexia, emese, diarreia, icterícia, desidratação
13 ^{at}	Pastor alemão	F	11a	apatia, anorexia, poliúria e polidipsia e depois oligúria e oligodipsia, desidratação, mucosas congestas
14 ^{at}	SRD	M	8a	apatia anorexia, emese, icterícia, adipisia
15 ^{d±}	São Bernardo	M	3m	anorexia, emese, icterícia, petéquias, fezes pastosas e escuras, desidratação
16 ^d	Boxer	F	1a 7m	apatia, diarreia, anorexia, emese, icterícia
17 ^{at}	Poodle	M	3a	prostração, anorexia, emese, fezes escuras, estertores, oligodipsia, poliúria, icterícia intensa, desidratação
18 ^{at}	SRD	M	7a	anorexia, emese, icterícia desidratação
19 ^{at}	Poodle	M	5a	hiporexia, diarreia, emese, anúria, polidipsia, icterícia, desidratação, apatia
20 ^{dt}	Cocker Spaniel	F	10a	prostração, anorexia, oligúria, emese, desidratação, icterícia, fígado aumentado
21 ^a	Pinscher	F	5a 3 m	anorexia, icterícia, melena, apatia, desidratação, mucosas normocoradas, anúria
22 ^{at}	SRD	M	8a	perda de peso, anorexia, apatia, emese, aquecia, icterícia, desidratação
23 ^{at}	Poodle	M	12a	apatia, anorexia, emese, hematoquesia, oligúria, polidipsia, icterícia, desidratação
24 ^{dt}	SRD	F	5m	prostração, anorexia, oligúria, emese, hematoquesia, ictrícia, desidratação
25 ^{bt}	Rottweiler	M	5a	emese, oligodipsia, urina de coloração escura, icterícia discreta, desidratação
26 ^{at}	SRD	M	9a	anorexia, diarreia, emese, fezes pastosas, urina escura, taquipnéia, icterícia intensa
27 ^{at}	Teckel	M	8a	apatia, anorexia, diarreia, desidratação, icterícia discreta
28 ^{at#}	SRD	M	11a	anorexia, oligodipsia, fezes amolecidas e escuras, icterícia
29 ^a	Boxer	F	10m	prostração, emese, anorexia, diarreia, fezes escuras, icterícia, desidratação

^a vacinação desatualizada; ^b nunca vacinado; ^c vacina atualizada aplicada em consultório veterinário; ^d vacina atualizada aplicada pelo proprietário; ⁺ alta; [†] óbito; [‡] não retornou mais às consultas mas sobreviveu; [#] não retornou mais às consultas e foi impossível contato com proprietário para elucidação do desfecho do caso; **SRD**, sem raça definida; **M**, macho; **F**, fêmea; **a**, ano(s); **m**, meses.

Quadro 3 - Cães incluídos no estudo: Raça, sexo, idade e sinais clínicos apresentados na primeira consulta – São Paulo – 2008

Animal	Produtos azotados séricos		Proteínas séricas		Atividade sérica de enzimas hepáticas		Bilirrubina sérica		
Nº	C (mg/dl)	U (mg/dl)	PT (g/dl)	Alb (g/dl)	ALT (U/l)	FA (U/l)	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	BI (mg/dl)
1	6,90	645,0	7,3	2,5	310,0	1543,9	30,21	17,07	13,14
2	5,10	516,8	9,0	3,2	126,0	1691,6	30,94	8,61	12,33
3	8,20	403,9	-	-	-	-	-	-	-
4	8,70	431,5	7,8	2,8	149,4	2701,5	25,20	16,60	8,60
5	12,70	777,3	8,7	3,4	79,0	90,0	-	-	-
6	8,10	471,3	-	-	-	-	-	-	-
7	1,00	33,4	-	-	-	-	-	-	-
8	4,70	202,0	7,9	2,4	17,4	1051,0	-	-	-
9	3,60	135,0	3,8	1,6	48,0	506,7	10,37	6,03	4,34
10*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	2,80	240,0	-	-	-	-	-	-	-
12*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	4,40	194,0	-	-	-	-	-	-	-
14	4,92	312,0	6,8	3,1	117,0	3261,0	3,85	2,62	1,23
15	5,20	332,4	5,7	2,2	61,6	901,8	7,30	5,30	2,00
16	5,10	273,0	7,3	2,9	226,3	1609,3	21,50	14,95	6,55
17	9,10	523,8	8,8	2,9	81,3	1421,2	55,40	37,40	18,00
18	12,30	377,2	7,3	2,6	59,0	1012,6	15,85	5,70	10,15
19	9,70	604,7	6,1	2,4	110,0	1004,0	21,10	15,8	5,30
20	5,20	492,4	7,9	3,1	2210,0	1079,0	10,20	6,20	4,00
21	5,10	552,0	7,4	2,7	44,0	299,0	-	-	-
22	6,60	404,9	-	-	-	-	-	-	-
23	8,30	645,0	4,4	1,9	29,5	430,0	1,17	0,17	1,00
24	8,20	358,7	5,8	2,7	31,6	721,0	24,20	7,75	16,65
25	3,80	122,4	5,1	2,0	461,6	4972,9	7,37	3,50	3,87
26	10,30	413,8	5,9	2,6	63,0	427,0	46,00	26,90	29,10
27	5,40	342,9	6,1	2,3	88,6	950,8	5,09	1,69	3,30
28	8,30	492,4	-	-	-	-	-	-	-
29	4,90	302,0	6,5	2,9	93,2	1264,3	14,00	3,25	10,75

C = creatinina; **U** = uréia; **PT** = proteína total; **Alb** = albumina; **ALT** = alanina aminotransferase; **FA** = fosfatase alcalina; **BT** = bilirrubina total; **BD** = bilirrubina direta; **BI** = bilirrubina indireta. (*) amostras insuficientes para os testes de bioquímica sérica. (-) Exames não solicitados

Quadro 4 - Resultados dos exames laboratoriais para determinação de produtos azotados séricos, proteínas séricas, atividade sérica de enzimas hepáticas, bilirrubinas séricas, no momento do primeiro atendimento – São Paulo – 2008.

Dos 29 cães estudados, no momento da primeira consulta, mesmo momento em que também se coletou urina para cultivo de leptospira, 6 (21%) animais foram negativos à SAM e 23 (79%) animais apresentaram reação positiva. Desses 23 animais, apenas 7 cães (24% do total de cães e 30% dos cães positivos) reagiram para apenas um sorovar, enquanto para os outros 22 cães (76% do total de cães e

96% dos cães positivos) houve reação cruzada entre dois a 11 sorovares, com títulos variando entre 100 e 32.000 (Tabela 3). Em relação aos animais com SAM positiva, houve reação para os seguintes sorovares: copenhageni (65%), icterohaemorrhagiae (57%), autumnalis e hardjobovis (43%), bratislava (39%), butembo (26%), pyrogenes, hardjoprajitno e wolffi (22%), patoc (17%), canicola (13%), grippotyphosa (9%), castelonis, cynopteri, pomona e sentot (4%) (Gráfico 1).

Tabela 3 - Distribuição dos títulos para cada sorovar na primeira reação de soroaglutinação microscópica (SAM) de cada animal e resultados do isolamento – São Paulo – 2008

Animal	Sorovar (sv)															
	bratislava	autumnalis	butembo	castelonis	canicola	cynopteri	grippyphosa	copenhageni	icterohaemorrhagiae	pomona	pyrogenes	hardjoprajitno	wolffi	hardjobovis	patoc	sentot
1	-	-	-	-	-	-	-	400	200	-	-	200	200	-	-	-
2	400	200	-	-	-	-	-	400	400	-	-	200	100	400	400	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	-	-
5	-	400	400	-	100	-	-	200	200	-	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-
7	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
8	-	1.600	200	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
10	400	-	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	800	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	800	400	-	-	-	-	200	400	400
12	-	-	-	-	-	-	-	200	200	-	-	200	100	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	200	100	400	-	-	-	-	1.600	800	-	200	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	-	100	-	-	-	-	-	100	400	-	200	-	-	200	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	100	200	-	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	400	-	-	400	-	1.600	400	200	400	-	-	-	200	-
22	400	800	400	-	200	-	-	400	200	-	400	200	100	800	200	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
24	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	400	100	-	-	-	-	-	400	200	-	200	-	-	1.600	-	-
26	100	200	-	-	-	-	-	3.200	3.200	-	-	-	-	200	-	-
27	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	400	-	-	400	400	-	-	400	200	-	-	400	400	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de positivos	9	10	6	1	3	1	2	15	13	1	5	5	5	10	4	1

- = resultado negativo; + = resultado positivo; nr = não realizado. Não houve reação positiva para os outros sorovares inclusos na bateria de antígenos não mostrados nessa tabela.

Gráfico 1 - Porcentagem de animais (dos 23 positivos à SAM) reagentes para cada sorovar da bateria de antígenos utilizada na reação de soroaglutinação microscópica, na primeira SAM realizada. Não houve reação positiva para os outros sorovares incluídos na bateria de antígenos não mostrados nesse gráfico – São Paulo – 2008

Com relação aos cães dos quais se avaliou amostras pareadas de soro à SAM (com intervalo de pelo menos 10 dias entre cada coleta de soro), 4 foram considerados negativos na primeira SAM (cães 12, 13, 15 e 24), tornando-se positivos já à segunda SAM com títulos máximos entre 200 e 1.600 para diferentes sorovares. O cão 23, com título 100 no primeiro teste de soroglutinação, não apresentou título de anticorpos na segunda reação. Quatro cães apresentaram diminuição nos títulos de anticorpos para um mesmo sorovar, sendo que para três deles (cães 8, 14 e 21) essa diminuição foi de pelo menos 4 vezes o título inicial e, para os cães 1 e 28, essa diminuição foi de apenas uma diluição (duas vezes o título) em relação ao título inicial. Os cães 12 e 21 apresentaram aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos aglutinantes para um mesmo sorovar em relação à primeira SAM. Foi possível coletar quatro amostras de soro do cão 18, o qual na terceira reação de soroaglutinação microscópica reagiu para os sorovares butembo (3.200), copenhageni (400), icterohaemorrhagiae (200), pyrogenes (800) e hardjobovis (400) e, na quarta SAM, para os sorovares australis (200), butembo (800), castellanis (400), grippotyphosa (100), copenhageni (400), e hardjobovis (400).

Coletou-se uma terceira amostra do cão 16, negativa à SAM (Tabela 4). Dos 10 cães positivos à segunda SAM, apenas o cão 2 foi reagiu a 1 único sorovar (hardjobovis [200]). Os demais reagiram para 2 a 10 sorovares com títulos entre 100 e 1.600: 50% copenhageni, 40% icterohaemorrhagiae, pyrogenes e hardjobovis, 30% bratislava, butembo e grippotyphosa, 20% canicola, hardjoprajitno, wolffi e sentot, 10% australis, autumnalis, castelonis, cynopteri, hebdomadis e patoc (Gráfico 2).

Tabela 4 - Resultados das reações de soroaglutinação microscópica para os cães de que coletou-se mais de uma amostra de soro em diferentes momentos, com intervalo mínimo de 10 dias entre coletas – São Paulo – 2008

com intervalo mínimo de 10 dias entre coletas – São Paulo – 2000																			
		Sorovar (sv)																	
Animal	SAM	australis	bratislava	autumnalis	butembo	castelonis	canicola	cynopteri	grippytyphosa	hebdomadis	copenhagani	icterohaemorrhagiae	pomona	pyrogenes	hardjoprajitno	wolffi	hardjobovis	patoc	sentot
2	a	-	400	200	-	-	-	-	-	-	400	400	-	-	200	100	400	400	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	a	-	-	1.600	200	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	400	-	-	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	200	-	-	200	100	-	-	-
	b	-	200	-	200	-	-	-	-	-	400	400	-	-	800	200	400	-	100
14	a	-	200	100	400	-	-	-	-	-	1.600	800	-	200	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	200	-	-	-	-	-	-	-
15	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	200	-	-	-	-	-	200	-	400	200	-	400	-	-	400	-	-
16	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	400	-	-	200	-	-	-	200	-	-	-	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	100	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	a	-	-	-	400	-	-	400	-	-	1.600	400	200	400	-	-	-	200	-
	b	100	-	-	800	-	-	200	400	-	400	-	-	1.600	-	-	-	-	-
	c	-	-	3.200	-	-	-	-	-	-	400	200	-	800	-	-	400	-	-
	d	-	-	200	800	400	-	-	100	-	400	-	-	-	-	-	400	-	-
23	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	a	-	400	-	-	400	400	-	-	-	400	200	-	-	400	400	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	400	400	-	-	-
29	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	1.600	-	400	-	-	-	-	-	1.600	1.600	-	400	200	200	1.600	200	100

a, b, c, e d = primeira, segunda, terceira e quarta SAM. - = reação negativa. Não houve reação positiva para os outros sorovares inclusos na bateria de antígenos não mostrados nessa tabela.

Gráfico 2 - Porcentagem de animais reagentes para cada sorovar da bateria de antígenos utilizada na segunda reação de soroaglutinação microscópica realizada. Não houve reação positiva para os outros sorovares inclusos na bateria de antígenos não mostrados nesse gráfico - São Paulo - 2008

Obteve-se êxito no isolamento de leptospira em 4 das 29 amostras de urina cultivadas, coletadas no momento da primeira consulta, com um percentual de êxito de 14%. Os isolados, obtidos da urina dos cães 2, 3, 5 e 16, foram denominados A, B, C e D. No momento da primeira consulta, o cão 2 apresentou títulos de anticorpos aglutinantes anti-leptospíricos contra os sorogrupos Australis (sv bratislava [400]), Autumnalis (sv autumnalis [200]), Icterohaemorrhagiae (sv copenhageni [400]; sv icterohaemorrhagiae [200]), sorogrupo Sejroe (sv hardjoprajitno [200], wolffi [100], hardjobovis [400]) e sorogrupo Seramanga (sv patoc [400]). O cão 5 apresentou anticorpos aglutinantes contra o sorogrupo Autumnalis (sv autumnalis [400]; sv butembo [400]), Canicola (sv canicola [100]) e Icterohaemorrhagiae (sv copenhageni [200]; sv icterohaemorrhagiae [200]). Os cães 3 e 16 foram negativos à SAM no momento da primeira consulta. Os isolados A, B e C foram titulados pela reação de SAM com anti-soros policlonais de coelho e os títulos mais altos obtidos foram considerados como correspondentes ao sorogrupo infectante, representado por esse sorovar. Assim, caracterizou-se o isolado A como sorogrupo icterohaemorrhagiae, e

os isolados B e C como sorogrupo canicola. O isolado D não foi submetido à reação com anti-soros policlonais (Quadro 5).

Isolado A / Cão 2	SAM ^a (soro dos cães x antígeno)	Sorovar	Sorogrupo	Isolado obtidos x anti-soro
	-	australis	Australis	1.600
	400	bratislava		-
	200	autumnalis	Autumnalis	400
	-	butembo		400
	-	canicola	Canicola	400
	-	cynopteri	Cynopteri	800
	400	copenhageni	Icterohaemorrhagiae*	51.200
	200	icterohaemorrhagiae		nr
	-	javanica	Javanica	200
	200	hardjoprajitno	Sejroe	-
	100	wolffi		-
	400	hardjobovis		nr
	400	patoc	Seramanga	-
Isolado B / Cão 3	SAM ^a (soro dos cães x antígeno)	Sorovar	Sorogrupo	Isolado obtidos x anti-soro
	negativo	castellonis	Ballum	400
		canicola	Canicola*	3.200
		cynopteri	Cynopteri	800
		copenhageni	Icterohaemorrhagiae	800
		icterohaemorrhagiae		nr
Isolado C / Cão 5	SAM ^a (soro dos cães x antígeno)	Sorovar	Sorogrupo	Isolado obtidos x anti-soro
	-	australis	Australis	-
	400	bratislava		-
	-	autumnalis	Autumnalis	-
	400	butembo		-
	-	castellonis	Ballum	400
	100	canicola	Canicola*	3.200
	200	copenhageni	Icterohaemorrhagiae	1.600
	200	icterohaemorrhagiae		nr
	-	pyrogenes	Pyrogenes	200
Isolado D / Cão 16	SAM ^b (soro dos cães x antígeno)	Sorovar	Sorogrupo	Isolado obtidos x anti-soro
	400	canicola	Canicola	nr
	200	hebdomadis	Hebdomadis	
	200	pyrogenes	Pyrogenes	

*sorogrupo infectante mais provável determinado pela reação dos isolados com anti-soros policlonais; ^a primeira reação de SAM; ^b segunda reação de SAM; – = reações negativas; nr = não realizado

Quadro 5 - Títulos de anticorpos aglutinantes no soro coletado na primeira consulta ou em momento subsequente, dos cães 2, 3, 5 e 16, à SAM, e títulos obtidos pela reação dos isolados A, B e C (D não realizado) com anti-soros policlonais de coelho para determinar o provável sorogrupo infectante – São Paulo - 2008

Na caracterização molecular por VNTR realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – BA e no Instituto Pasteur (Paris – França), a amostra isolada A apresentou perfil idêntico aos das cepas de referência pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, respectivamente, FIOCRUZ L1-130 (sorovar copenhageni) isolada de um paciente humano durante um surto de leptospirose em Salvador (BA) entre 1996 e 1998 (KO, et al., 1999), e RGA (sorovar icterohaemorrhagiae) (WHO/FAO Leptospirosis Reference Laboratory), ambas as quais possuem o padrão (número de repetições dos loci VNTR) 2, 1, 7 para os VNTR 4, 7 e 10. Os isolados B, C e D, nos dois laboratórios, apresentaram padrão 1, 10, 3 para os VNTR 4, 7 e 10, respectivamente, idêntico à cepa Hond Utrecht IV (sorovar canicola) (SALAUN, et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1 - VNTR das amostras isoladas A, B, C e D, realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – BA. M, Marcador de 100 pares de bases (pb); C+, controle positivo (Fiocruz L1-130); C-, controle negativo. Amostra A e controle positivo → Padrão 2,1,7. Amostras B, C e D → Padrão 1,10,3 – São Paulo – 2008

Na reação com anticorpos monoclonais anti-leptospira, o isolado A (cão 2) foi identificado como sorovar copenhageni, apresentando os mesmos resultados que as cepas copenhageni L1 130, sorovar copenhageni (FIOCRUZ). O quadro 6 resume os resultados da soroaglutinação microscópica realizada para os cães 2, 3, 5 e 16 e dos testes para caracterização dos isolados A, B, C e D correspondentes.

Cão	Soroaglutinação microscópica	Isolado	Reação com anti-soro policlonal	VNTR	Anticorpos Monoclonais
2	copenhageni 400 bratislava 400 hardjobovis 400 patoc 400 icterohaemorrhagiae 200 hardjoprajitno 200 autumnalis 200 wolffi 100	A	copenhageni 51.200 australis 1.600 cynopteri 800 autumnalis 400 butembo 400 canicola 400 javanica 200	sorogrupo icterohaemorrhagiae	sorovar copenhageni
3	negativo	B	canicola 3.200 copenhageni 800 castellonis 400	sorovar canicola	sorovar canicola
5	autumnalis 400 butembo 400 copenhageni 200 icterohaemorrhagiae 200 canicola 100	C	canicola 3.200 copenhageni 1.600 castellonis 400 pyrogenes 200	sorovar canicola	sorovar canicola
16	canicola 400 hebdomadis 200 pyrogenes 200	D	não realizado	sorovar canicola	sorovar canicola

Quadro 6 - Resultados da soroaglutinação microscópica para os cães 2, 3, 5 e 16 e resumo dos testes realizados para caracterização dos respectivos isolados A, B, C e D: reação dos isolados com anti-soro policlonal de coelho, VNTR e reação com anticorpos monoclonais – São Paulo – 2008

4 DISCUSSÃO

A reatividade cruzada entre diferentes sorovares de leptospiros, como ocorreu na maioria dos cães, não permitiu a identificação do sorovar infectante, em amostras séricas únicas ou nas amostras pareadas. Na maioria das reações de soroaglutinação, um mesmo soro foi capaz de produzir aglutinação de leptospiros de mais de um sorovar e os baixos títulos de anticorpos (100 e 400) para alguns sorovares nessas reações é uma evidência de reação cruzada. A reatividade cruzada entre sorovares é muito comum (LANG; MORSE, 1959; WHO, 1967; SURUJBALLI, et al., 1997; LEVETT, 2003). O sorovar copenhageni foi o mais evidenciado na reação de SAM. Isto condiz com os resultados estudos de soroprevalência no Brasil, que apontam o sorovar copenhageni como o mais freqüente, em detrimento até mesmo dos sorovares icterohaemorrhagiae e canicola e, esses mesmos levantamentos, assim como o presente estudo para os cães avaliados, revelam uma baixa freqüência para os sorovares grippityphosa e pomona em cães no Brasil (AVILA, et al., 1998; JOUGLARD; BROD, 2000; FAVERO, et al., 2002; MASCOLLI, et al., 2002; SILVA, et al., 2002a). Apenas 5 animais nesse estudo reagiram positivamente na SAM com o sorovar canicola.

Em nosso estudo, as dificuldades de isolamento se deveram principalmente à leptospiúria intermitente e à necessidade de se tratar o animal o mais brevemente possível com os antibióticos adequados, o que diminui em muito o número de leptospiros liberadas na urina, inviabilizando isolamentos de amostras coletadas após o início do tratamento. Muitos animais apresentavam a urina visualmente muito alterada, indicando presença de substâncias que provavelmente inibem o crescimento da bactéria. Dentre os diversos problemas envolvidos no isolamento de leptospira de amostras clínicas estão a necessidade de um longo período de incubação, presença de contaminantes e tempo entre coleta e processamento das amostras. A contaminação das amostras por outros microrganismos que podem inibir o crescimento da leptospira (SCHONBERG, 1981) é o principal problema envolvido no isolamento desse agente (ADLER, et al., 1986; GULLAND, et al., 1996). O isolamento da leptospira em amostras clínicas representa o diagnóstico definitivo de leptospirose e é o único método que permite a identificação do sorovar infectante. Da mesma maneira como ocorreu no estudo de Freitas, et al (2004), no

qual foram obtidos 11 isolamentos de 14 amostras de urina de cães, a urina coletada assepticamente (cistocentese) e o rápido processamento das amostras em meio de cultura confiável com antibiótico seletivo (THIERMANN, 1984) foram essenciais para o sucesso dos 4 isolamentos obtidos no presente estudo.

Na reação com anticorpos policlonais de coelho, para determinação do sorogrupo infectante em 3 dos isolados obtidos, a amostra isolada A do cão 2 (que apresentava anticorpos séricos para os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni, em igual título) reagiu com anti-soro anti-copenhageni (sorogrupo icterohaemorrhagiae), em título extremamente elevado (51.200), não tendo sido testado com o anti-soro anti-icterohaemorrhagiae. Contudo, pelo teste molecular de VNTR, não foi possível obter a identificação do sorovar deste isolado, pois sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae, ambos pertencentes ao sorogrupo icterohaemorrhagiae, são morfológica e geneticamente semelhantes, sendo difícil sua diferenciação por esta técnica (MAJED, et al., 2005). Desse modo, a reação com anticorpos monoclonais específicos foi fundamental para a caracterização definitiva como sorovar copenhageni deste isolado, assim como demonstrado por outros pesquisadores (KOBAYASHI, et al., 1984; KOBAYASHI, et al., 1985; KOBAYASHI, et al., 1987; KORVER, et al., 1988; TAKASE; YANAGAWA, 1988; ZHANG, et al., 1989; HOOKEY; PALMER, 1991)

Apesar de apenas 5 cães terem apresentado reação positiva ao sorovar canicola em títulos baixos (entre 100 e 400) no teste de soroaglutinação, obteve-se 3 isolados caracterizados como sendo desse sorovar, inclusive um de um cão negativo à SAM (isolado B, cão 3). Yasuda et al. (1980) também obtiveram a maior frequência de isolamento do sorovar canicola de amostras clínicas de cães, sendo que em seu estudo não houve isolamento do sorovar icterohaemorrhagiae. O cão é considerado reservatório do sorovar canicola (BOLIN, 1996) e, em geral, a imunidade desenvolvida é baixa, com baixos títulos de anticorpos aglutinantes (GEISEN, et al., 2007) e a infecção não aparente, bem como o estado de portador, são freqüentemente observados (YASUDA, et al., 1980). Com relação sorovar copenhageni, este já foi isolado de cães no Brasil por Yasuda et al. (1980) e Cordeiro e Sulzer (1983), não havendo outros isolamentos desse sorovar a partir de amostras clínicas de cães no Brasil até o presente estudo.

5 CONCLUSÕES

O teste de SAM não possibilitou a identificação do sorovar infectante em função de reatividade cruzada entre diferentes sorovares, permitindo apenas confirmar o diagnóstico clínico de leptospirose, na maioria dos casos suspeitos.

O isolamento do agente é o único meio, até o momento, que permite a identificação do sorovar infectante e a caracterização do isolado deve basear-se em testes específicos, como a reação dos isolados com anticorpos policlonais específicos, técnicas de biologia molecular e caracterização sorológica com a utilização de anticorpos monoclonais.

Neste estudo, a colheita asséptica da urina e seu processamento imediato em meio adequado foi fundamental para a obtenção de quatro isolamentos das 29 culturas de urina realizadas. Três desses isolados foram caracterizados como sorovar canicola e um como sorovar copenhageni, aparentemente o terceiro isolamento desse sorovar de cão no Brasil.

**CAPÍTULO 2 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) NA URINA
ALIADA À SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA NO
DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE CANINA**

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, na rotina clínica, a confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico se dá pela pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), ELISA ou teste de aglutinação macroscópica em lâmina (LEVETT, 2001). Dentre os métodos sorológicos, a soroaglutinação microscópica é o mais comumente utilizado, sendo designado como teste de referência pela OMS (WHO, 2003). Entretanto, os anticorpos anti-leptospíricos são detectáveis no soro apenas a partir do 7º a 14º dia de infecção, diminuindo a sensibilidade da SAM no estágio precoce da doença, tornando-o inapropriado para fins de decisões clínicas (ABREU FONSECA, et al., 2006). As reações cruzadas e paradoxais entre sorovares podem dificultar o diagnóstico, especialmente durante a fase aguda da infecção (LEVETT, 2003). Quando o quadro clínico é compatível com a doença e não há histórico de vacinação recente, de modo geral, considera-se o título mais alto (geralmente igual ou maior que 800) como o indicativo do sorogrupo infectante, com as devidas ressalvas. Contudo, para a confirmação sorológica da leptospirose, recomenda-se a demonstração de incremento ou diminuição de 4 vezes o título de anticorpos aglutinantes entre a fase aguda e a convalescença (GALTON, et al., 1965).

A leptospirúria não está relacionada aos resultados da SAM, podendo ocorrer já nos primeiros dias de infecção, antes mesmo dos anticorpos serem detectáveis no soro (BAL, et al., 1994). A identificação do microrganismo por meio de exame de urina em microscópio de campo escuro, o isolamento da leptospira em cultivo de urina ou resultados positivos na PCR da urina podem se somar aos resultados positivos dos testes sorológicos para confirmar o diagnóstico clínico da leptospirose. Desses, o primeiro não é atualmente recomendado como procedimento de rotina por ser pouco sensível, além de artefatos de técnica e outras estruturas presentes na amostra poderem ser confundidos com leptospiras (WHO, 2003). O isolamento da leptospira em meios de cultura semeados com amostras de sangue ou urina constitui-se no método de excelência para o diagnóstico definitivo da leptospirose (FAINE, 1982). Contudo, devido ao crescimento fastidioso das leptospiras, os resultados da cultura são demorados e muitas vezes ocorre contaminação da cultura

por outros organismos que impedem crescimento das leptospiiras (SCHONBERG, 1981).

O rápido diagnóstico da leptospirose é de extrema importância, pois quanto mais cedo iniciado o tratamento com antibióticos, maiores são as chances de cura. Técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) têm sido introduzidas para identificar material genético de leptospiiras na urina (LEVETT, 2001). A PCR tem se mostrado útil na rápida detecção de material genético de leptospira em amostras clínicas, inclusive na urina (BAL, et al., 1994; ÇETİNKAYA, et al., 2000). Os resultados de PCR na urina podem ser mais sensíveis em fornecer resultados positivos do que o teste de SAM do soro na avaliação de cães com infecção leptospírica presumida. O objetivo deste trabalho foi comparar os resultados da PCR para detecção de leptospira na urina de cães com aqueles obtidos na reação de soroaglutinação microscópica a partir dos soros desses animais, para avaliar a utilidade da PCR na urina no diagnóstico da leptospirose canina, isoladamente ou em conjunto com a SAM.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Estudou-se 24 dos 29 cães avaliados no Capítulo 1, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de março de 2006 a maio de 2007, para os quais se estabeleceu diagnóstico clínico de leptospirose como descrito no item 2.1 do Capítulo 1.

A coleta de soro e urina se deu como descrito no item 2.1 do Capítulo 1. A quantidade de urina coletada não foi suficiente para a realização da PCR em cinco dos 29 cães do estudo descrito no Capítulo 1 (cães 1, 5, 6, 24 e 28), restando 24 cães para experimento deste Capítulo 2, para os quais se manteve a mesma numeração utilizada no capítulo anterior.

2.2 REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA

Para a detecção de anticorpos aglutinantes anti-leptospíricos, as amostras de soro foram submetidas à reação de soroaglutinação microscópica (COLE JR., et al., 1973). Na bateria de antígenos incluiu-se 24 sorovares (pertencentes a 14 sorogrupos) patogênicos e/ou de interesse regional e 3 sorovares saprófitos, de acordo com a técnica utilizada rotineiramente no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP (Quadro 1 do Capítulo 1).

Ambos os sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae, pertencentes ao sorogrupo icterohaemorrhagiae, foram incluídos na bateria de antígenos. As leptospiras de cada sorovar foram cultivadas em meio EMJH suplementado com 10% de soro de coelho inativado. Foram utilizados apenas cultivos puros, isentos de contaminação, livres de auto-aglutinação, com 7 a 10 dias de crescimento e, por estimativa de densidade (escala de McFarland), contendo cerca de 100 a 200

leptospiras por campo microscópico (200 vezes). As amostras de soro foram diluídas em solução tamponada de Sorënsen, inicialmente na diluição 1:100 para triagem e, quando reagentes, diluídas sucessivamente em razão dois. Em cada poço da microplaca de aglutinação foram colocados 50µL da diluição do soro a ser testada e 50 µL da cultura de leptospira. Foram consideradas positivas as reações em que se observou aglutinação de pelo menos 50% das leptospiras. O título foi dado como a recíproca da maior diluição em que houve 50% aglutinação.

2.3 ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTIVO DE FLETCHER

Cada amostra de urina foi diluída em solução salina em diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em tubo contendo 50 ml meio de Fletcher comum e em outro com meio de Fletcher acrescido de 5-fluorouracil na concentração final de 100 µg/ml (SANTA ROSA, 1970; MYERS, 1985), os quais foram incubados entre 28-30°C, e observados semanalmente por cerca de dois meses (FAVERO, et al., 1997) para verificação de anel de crescimento superficial (zona de Dinger) de leptospiras no meio (MYERS, 1985) e confirmação da presença leptospiras por visualização de uma gota da amostra em microscópio de campo escuro (Olympus[®] Bx40) com magnificação de 200 vezes.

2.4 DETECÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO DE *Leptospira* ssp. NA URINA POR MEIO DA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras de urina foram mantidas em tubo eppendorf[®] a -20° C até o momento da realização da PCR que teve como alvo o lócus 16S rRNA segundo Lilenbaum (LILENBAUM, et al., 2008) a partir do protocolo descrito por Richtzenhain (2002).

2.4.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo descrito por Chomczynski (1993) com pequenas modificações. Resumidamente, adicionou-se 600 µL de isotiocianato de guanidina e 200 µL da amostra em um tubo de 1500µL, que foi homogeneizado por 15 segundos e então mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. Para o controle negativo das amostra, foi realizado o mesmo procedimento, colocando, no lugar da amostra, 200 µL de água milique. Como controle positivo utilizou-se, no lugar da amostra, 200 µL de cultura de leptospira em meio EMJH com 10% de soro de coelho inativado. Adicionou-se então 100 µL de clorofórmio ao tubo ,que foi novamente homogeneizando por 15 segundos e mantido em repouso por 10 minutos. Após, o tubo foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante (fase incolor do conteúdo bifásico) foram transferidos para um novo tubo de 1500 µL com 500 µL de propanol, o qual foi homogeneizado apenas por inversão e deixado em repouso por 2 horas a -20°C e então centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo, tendo-se adicionado a seguir 500 µL de etanol a 70%. O tubo foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o tubo permaneceu aberto por 5 a 10 minutos para secar em temperatura ambiente. O material sedimentado foi re-suspendido em 20 µL de Tris-EDTA pH 8,0 (10mM Tris / 1mM EDTA) (TE) e o tubo foi então fechado e mantido a 56°C por 20 minutos. Após a extração, cada tubo foi mantido a -20°C até o momento da realização da PCR.

2.4.2 Amplificação do DNA por PCR

A técnica utilizada foi a descrita por Mérien (1992) para a amplificação de fragmento de 331pb correspondente ao gene 16s rRNA.

2.4.2.1 PRIMERS (OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES)

Os primers selecionados para a detecção de material genético de *Leptospira* spp. nas amostras de urina foram o Lep 1: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' e o Lep 2: 3' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5', desenvolvidos por (MERIEN, et al., 1992).

2.4.2.2 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Para cada amostra, preparou-se uma mistura de reagentes (Mix) em um microtubo de 500 μ L, consistindo de 16 μ L de água pura, 2,5 μ L tampão 10X PCR (200mM Tris-HCL, pH 8,0; 500mM KCl), 0,5 μ L de dNTPs (10pcM), 1,25 μ L de oligonucleotídeo iniciador Lep1, 1,25 μ L de oligonucleotídeo iniciador Lep2, 0,75 μ L de MgCl₂ (50mM) e 0,25 μ L de taqui DNA polimerase, compondo um volume total de 22,5 μ L de Mix ao qual se adicionou 2,5 μ L de DNA, totalizando um volume de 25 μ L por amostra. Os microtubos foram então submetidos a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (60°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundo) e por fim, uma extensão final (72°C por 5 minutos), após a qual os microtubos foram armazenados a -20°C até o momento da eletroforese em gel de agarose.

2.4.3 Eletroforese

A eletroforese dos produtos da amplificação foi realizada em gel de agarose 1,5% em TBE pH 8.4 (TRIS 50 mM, ácido bórico 67mM, EDTA 1mM), em cuba eletrolítica com amperagem entre 38 e 50A. Adicionou-se 3 μ L de corante azul de bromofenol em cada microtubo e então 10 μ L de cada amostra com corante foi

aplicada no gel, reservando-se o primeiro poço do gel para a aplicação de 3 µL de marcador padrão de peso molecular (lader) de 100 pares de bases. Após o período necessário dependendo da amperagem utilizada, o gel foi retirado do tampão e mergulhado em brometo de etídeo e homogeneizado por 15 minutos. O gel então foi retirado do brometo de etídeo e colocado em aparelho transiluminador Alphamager® para visualização sob luz ultra violeta e aquisição de imagem a qual foi arquivada no formato JPEG para posterior análise digital do gel.

2.4.4 Análise dos produtos amplificados

Foram consideradas positivas as reações em que se observou uma banda de DNA correspondente a 331 pares de base (pb).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi primordialmente descritiva. Para a comparação entre os resultados da SAM e da PCR utilizou-se o teste exato de Fisher, com significância de 5%.

3 RESULTADOS

Dos cães incluídos nesse estudo, 10 não tinham raça definida e 14 eram de raças variadas (Cocker Spaniel, Rottweiler, Poodle, Pit Bull, Pastor Alemão, São Bernardo, Boxer, Pinscher e Tekel), sendo 9 fêmeas e 15 machos, com ampla faixa etária entre 3 meses e 11 anos de idade. Com relação a imunização contra leptospirose, desses animais, 4 nunca receberam vacina, 14 estavam com a vacina desatualizada, 5 estavam com vacina atualizada, porém aplicada em casa pelo proprietário e apenas 1 animal tinha imunização em dia realizada em consultório veterinário.

Na primeira consulta 6 dos 24 cães foram considerados negativos à reação de soroaglutinação microscópica, e dos 18 cães positivos, 5 reagiram para apenas 1 sorovar (2 copenhageni [ambos com título igual a 100] e 2 hardjobovis [títulos iguais a 100 e 400] e 1 bratislava [título igual a 100]) e os 13 restantes para entre 2 e 11 sorovares com títulos variando entre 100 e 3.200: 67% copenhageni, 56% hardjobovis, 50% icterohaemorrhagiae, 44% bratislava e autumnalis, 28% butembo e pyrogenes, 22% patoc, 17% hardjoprajitno e wolffi, 11% grippotyphosa e 6% canicola, cynopteri, pomona e sentot. Foi possível coletar mais de uma amostra de soro (entre 2 e 4) de 10 dos cães do estudo. Dos 14 cães para os quais só foi possível executar uma SAM, 2 não apresentavam títulos de anticorpos aglutinantes (cães 3 e 13), 7 apresentavam títulos entre 100 e 400 (cães 4, 7, 9, 17, 19, 20, 27) e 5 apresentavam títulos de anticorpos iguais ou maiores que 800 para diferentes sorovares (cães 10, 11, 22, 25 e 26) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da reação de soraglutinação microscópica (SAM) realizada com soro coletado no momento da primeira consulta – São Paulo – 2008

Sorovar (sv)															
Animal	bratislava	autumnalis	butembo	canicola	cynopteri	grippityphosa	copenhageni	icterohaemorrhagiae	pomona	pyrogenes	hardjoprajitno	wolfi	hardjobovis	patoc	sentot
2	400	200	-	-	-	-	400	400	-	-	200	100	400	400	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	-	-
7	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
8	-	1.600	200	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
10	400	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	800	-	-
11	-	-	-	-	-	-	800	400	-	-	-	-	200	400	400
12	-	-	-	-	-	-	200	200	-	-	200	100	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	200	100	400	-	-	-	1.600	800	-	200	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	100	-	-	-	-	100	400	-	200	-	-	200	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	100	200	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	400	-	400	-	1.600	400	200	400	-	-	-	200	-
22	400	800	400	200	-	-	400	200	-	400	200	100	800	200	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
25	400	100	-	-	-	-	400	200	-	200	-	-	1.600	-	-
26	100	200	-	-	-	-	3.200	3.200	-	-	-	-	200	-	-
27	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de positivos	8	8	5	1	1	2	12	9	1	5	3	3	10	4	1

Com relação aos cães dos quais se avaliou amostras pareadas de soro, 4 foram considerados negativos na primeira SAM (cães 15, 16, 18 e 29), tornando-se positivos já à segunda SAM com títulos máximos entre 200 e 1.600 para diferentes sorovares. O cão 23, com título 100 na primeira SAM, foi negativo na segunda reação. Quatro cães apresentaram diminuição nos títulos de anticorpos para um mesmo sorovar, sendo que para três deles (cães 8, 14 e 21) essa diminuição foi de pelo menos 4 vezes e, para o cão 2, essa diminuição foi de apenas duas vezes o título (uma diluição) em relação ao título inicial. Os cães 12 e 21 apresentaram aumento de pelo menos 4 vezes nos títulos de anticorpos aglutinantes para um mesmo sorovar em relação à primeira SAM. Dos 9 cães positivos à segunda SAM, um reagiu a 1 sorovar (hardjobovis [200]) e, os demais, para 2 a 10 sorovares com

títulos entre 100 e 1.600: 56% copenhageni, 44% icterohaemorrhagiae, pyrogenes e hardjobovis, 33% bratislava, butembo e grippotyphosa, 22% canicola, hardjoprajitno, wolffi e sentot, 11% australis, autumnalis, castelonis, cynopteri, hebdomadis e patoc (Tabela 1). Coletou-se quatro amostras de soro do cão 21, o qual reagiu, na terceira SAM, aos sorovares butembo (3.200), copenhageni (400), icterohaemorrhagiae (200), pyrogenes (800) e hardjobovis (400) e, na quarta SAM, aos sorovares australis (200), butembo (800) castelonis (400) grippotyphosa (100) copenhageni (400) e hardjobovis (400). Também coletou-se uma terceira amostra de soro do cão 16, a qual não apresentava anticorpos aglutinantes à SAM (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das reações de soroaglutinação microscópica para os cães dos quais se pôde coletar mais de uma amostra de soro em diferentes momentos, com intervalo de coleta mínimo entre amostras de 10 dias – São Paulo – 2008

		Sorovar (sv)																	
Animal	SAM	australis	bratislava	autumnalis	butembo	castelonis	canicola	cynopteri	grippotyphosa	hebdomadis	copenhageni	icterohaemorrhagiae	pomona	pyrogenes	hardjoprajitno	wolffi	hardjobovis	patoc	sentot
2	a	-	400	200	-	-	-	-	-	-	400	400	-	-	200	100	400	400	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	a	-	-	1.600	200	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	400	-	-	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	200	-	-	200	100	-	-	-
	b	-	200	-	200	-	-	-	-	-	400	400	-	-	800	200	400	-	100
14	a	-	200	100	400	-	-	-	-	-	1.600	800	-	200	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	200	-	-	-	-	-	-	-
15	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	200	-	-	-	-	-	200	-	400	200	-	400	-	-	400	-	-
16	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	400	-	-	200	-	-	-	200	-	-	-	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	100	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	a	-	-	-	400	-	-	400	-	-	1.600	400	200	400	-	-	-	200	-
	b	100	-	-	800	-	-	200	400	-	400	-	-	1.600	-	-	-	-	-
	c	-	-	3.200	-	-	-	-	-	-	400	200	-	800	-	-	400	-	-
	d	-	-	200	800	400	-	-	100	-	400	-	-	-	-	-	400	-	-
23	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	1.600	-	400	-	-	-	-	-	1.600	1.600	-	400	200	200	1.600	200	100

a, b, c, e d = primeira, segunda, terceira e quarta SAM. - = reação negativa. Não houve reação positiva para os outros sorovares inclusos na bateria de antígenos não mostrados nessa tabela.

Considerando-se como diagnóstico, na soroaglutinação microscópica, título igual ou maior que 800 em amostras únicas, ou a soroconversão com aumento ou diminuição de pelo menos 4 vezes no título em relação ao título inicial em amostras pareadas (GALTON, et al., 1965), pudemos confirmar, pela a SAM, 9 dos 24 casos suspeitos de leptospirose (cães 8, 10, 11, 12, 14, 21, 22, 25 e 26) (Tabela 3), com percentual de êxito de (37,5%). Das amostras de urina submetidas ao cultivo (n=24), obteve-se êxito no isolamento de três amostras de leptospira (3/24) com percentual de êxito de 1,5%, sendo as amostras correspondentes aos animais 2, 3 e 16 (Tabela 3). Detectou-se material genético de *Leptospira* spp. em 11 das 24 amostras de urina submetidas à reação de PCR (cães 2, 3, 7, 8, 11, 12, 16, 19, 21, 23 e 25) com um percentual de êxito de 45,8%, com visualização de bandas de 331 pb no gel de eletroforese correspondentes ao gene 16S rRNA (Figura 1 e Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da(s) soroaglutinação(ões) microscópica(s), PCR e cultura de urina dos 24 cães incluídos no estudo – São Paulo – 2008

Cão	1ª SAM Título (svs)	2ª SAM Título (svs)	3ª SAM Título (svs)	4ª SAM Título (svs)	PCR	Cultura
2 ^a	100 – 400 (8)	200 (1)	Neg		+	+
3 ^b	Neg				+	+
4 ^a	400 (1)				-	-
7 ^b	200 (2)				+	-
8 ^{c#}	200 – 1.600 (3)	400 (2)			+	-
9 ^a	100 (1)				-	-
10 ^b	200 – 800 (3)				-	-
11 ^d	200 – 800 (5)				+	-
12 ^{d*}	100 – 200 (4)	100 – 800 (8)			+	-
13 ^a	Neg				-	-
14 ^{a#}	100 – 1.600 (6)	200 (2)			-	-
15 ^d	Neg	200 – 400 (6)			-	-
16 ^d	Neg	200 – 400 (3)	Neg		+	+
17 ^a	100 – 400 (5)				-	-
18 ^a	Neg	100 – 200 (2)			-	-
19 ^a	100 (1)				+	-
20 ^a	100 – 400 (3)				-	-
21 ^{a*#}	200 – 1.600 (7)	100 – 1.600 (6)	200 – 3.200 (5)	100 – 800 (6)	+	-
22 ^a	100 – 800 (11)				-	-
23 ^a	100 (1)	Neg			+	-
25 ^b	100 – 1.600 (6)				+	-
26 ^a	100 – 3.200 (5)				-	-
27 ^a	100 (1)				-	-
29 ^a	Neg	100 – 1.600 (10)			-	-

^a vacinação desatualizada; ^b nunca vacinado; ^c vacina atualizada aplicada em consultório veterinário; ^d vacina atualizada aplicada pelo proprietário; [#] diminuição de pelo menos 4 vezes no título para um mesmo sorovar; * aumento de pelo menos 4 vezes no título para um mesmo sorovar; svs = sorovares

Figura 1 - Visualização dos produtos da PCR para o gene 16S rRNA de *Leptospira* spp. em gel de agarose (bandas de 331pb) nas amostras de urina dos 24 cães incluídos neste estudo. L, Lader (marcador de 100 pb); C-, controle negativo, C+, controle positivo – São Paulo – 2008

A soroaglutinação microscópica e a PCR, juntas, foram capazes de confirmar o diagnóstico em 15 dos casos, com um percentual de êxito de 62,5%, sendo 4 casos confirmados apenas pela SAM (cães 10, 14, 22 e 26), 6 casos confirmados apenas pelo PCR na urina (cães 2, 3, 7, 16, 19 e 23) e 5 casos confirmados por

ambos os testes (cães 8, 11, 12, 21 e 25) (Tabela 4 e Gráfico 1). Pelo teste exato de Fisher não foi encontrada correlação entre os resultados desses dois métodos diagnósticos.

Tabela 4 - Total de animais positivos e negativos para cada um dos testes de soroprecipitação microscópica (SAM) e reação em cadeia de polimerase (PCR) na urina, para o diagnóstico da leptospirose dos cães incluídos nesse estudo – São Paulo - 2008

SAM \ PCR	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5 (20,8%)	4 (16,7%)	9 (37,5%)
Negativo	6 (25,0%)	9 (37,5%)	15 (62,5%)
Total	11 (45,8%)	13 (54,2%)	24 (100%)

Gráfico 1 - Porcentagens de diagnósticos confirmados pela soroprecipitação microscópica (SAM) e pela reação em cadeia de polimerase (PCR) isoladamente e em conjunto – São Paulo – 2008

4 DISCUSSÃO

Se considerarmos como diagnóstico sorológico da leptospirose o título igual ou maior que 800 em amostras únicas e a soroconversão como aumento ou diminuição de pelo menos 4 vezes no título em relação ao título inicial em amostras pareadas (GALTON, et al., 1965), a SAM, isoladamente, confirmou a suspeita de leptospirose baseada quadro clínico e epidemiológico, nesse experimento, em 9 (37,5%) dos casos aqui estudados. Já a PCR, por si só, confirmou a suspeita clínica e epidemiológica em 11 (45,8%) dos casos estudados. Além disso, os resultados da PCR não estão relacionados aos da soroaglutinação microscópica, o que é evidenciado pela detecção de material genético de *Leptospira* spp. em amostras de urina de cães cujos soros não continham ou apresentavam baixos títulos de anticorpos aglutinantes como no caso do cão 3 que não reagiu a nenhum dos sorovares à SAM e dos os soros correspondentes aos cães 7, 19 e 23 apresentaram títulos baixos (100 a 200) para um (cães 19 e 23) ou 2 sorovares (cão 7).

Todas as amostras de urina submetidas à PCR nesse estudo foram coletadas no primeiro dia de atendimento do animal e, a PCR portanto, poderia ser considerada um meio de detecção precoce da leptospirose, visto que os anticorpos aglutinantes anti-leptospiras, na maioria das vezes, não são detectáveis ou são detectáveis apenas em baixos títulos até 7 a 10 dias após a infecção. Este pode ser o caso de cães negativos ou com baixos títulos de anticorpos à SAM, e positivos na PCR, no presente estudo. Além disso, embora se diga que a leptospirúria se inicia após duas semanas de infecção, um trabalho em humanos detectou material genético de leptospira em 90% das amostras de urina testadas, coletadas antes de 8 dias de infecção (BAL, et al., 1994) e em outros estudos com cães (HARKIN, et al., 2003a; HARKIN, et al., 2003b) foi possível detectar o material genético de leptospira na urina antes mesmo da soroconversão, como ocorreu para alguns animais no presente estudo. Além disso, quando se fez a análise dos resultados da SAM e da PCR em conjunto, o número de confirmações de diagnóstico clínico e epidemiológico utilizando-se apenas a SAM (9 [37,5%]) ou apenas a PCR (11 [45,8%]) aumentou para 15 (62,5%) casos por meio da utilização das duas técnicas aliadas, o que confere um aumento de 66,7% nos casos confirmados apenas por SAM e um aumento de 36,36% nos casos confirmados apenas por PCR. Dessa

forma, devemos ver a PCR na urina como uma ferramenta que pode e deve ser utilizada para melhorar o diagnóstico da leptospirose canina em conjunto com a SAM, assim como já havia sido constatado por Abreu Fonseca et al. (2006) quando compararam a PCR no soro e a soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose em humanos.

Com relação ao animal 8, com diagnóstico de leptospirose confirmado por SAM (primeira SAM – autumnalis [1.600], butembo [200], grippotyphosa [200]; segunda SAM – autumnalis [400]) e PCR, e que apresentava vacina atualizada contra leptospirose, realizada em consultório veterinário, algumas possibilidades podem ser aventadas: engano do proprietário ao informar os dados sobre vacinação, falha vacinal (por problemas relacionados à vacina e/ou ao hospedeiro), baixa duração da imunidade ou, ainda, o fato de o animal ter se infectado com um outro sorovar que não o contido na vacina. Não foi possível o isolamento de leptospira no cultivo da urina desse cão, o que impossibilita a identificação definitiva do sorovar infectante. Apesar de a soroaglutinação microscópica apontar para o sorovar autumnalis, esta afirmação não pode ser categórica, devido à existência de reações cruzadas entre sorvares e paradoxais (um animal infectado por um sorovar apresenta títulos de anticorpos para outros que não o sorovar infectante) (GALTON, et al., 1965; LEVETT, 2003; WHO, 2003). Outros dois cães (11 e 12) com diagnóstico clínico de leptospirose confirmado tanto pela soroaglutinação microscópica (apenas uma SAM realizada para cada animal) como por PCR apresentavam vacina atualizada, porém esta vacina foi aplicada pelo proprietário do animal, pessoa não habilitada para tal, fator que pode ser somado aos já citados anteriormente para justificar essa infecção leptospírica. Neste estudo, os outros cães com PCR de urina negativo para *Leptospira* spp. e que não apresentavam anticorpos aglutinantes anti-leptospíricos ou apresentavam em baixos títulos tiveram o diagnóstico da leptospirose baseado na sintomatologia clínica, histórico epidemiológico e exclusão de outras causas de quadro semelhante, recebendo o devido tratamento.

O resultado negativo na PCR para 13 amostras de urina não exclui o diagnóstico clínico (com base no histórico compatível, sinais clínicos e alteração da função renal) e sorológico (reação de soroaglutinação microscópica) da leptospirose, pois além da leptospirúria intermitente, a presença de interferentes (células, sangue, etc) na urina dificulta a detecção de material genético em algumas amostras, pois

inibe a reação de PCR. Por outro lado, apesar dessas dificuldades, foi possível detectar mais frequentemente, neste estudo, o material genético da leptospira na urina por PCR do que isolá-la a partir do mesmo material (três isolamentos). A principal dificuldade na comparação da eficiência do PCR com a cultura para o diagnóstico da leptospirose é a baixa sensibilidade da cultura devido ao crescimento fastidioso das leptospirosas (MERIEN, et al., 1995). O isolamento da leptospira de qualquer amostra clínica é muito difícil e os resultados do isolamento são demorados (cerca de 2 meses), o que não contribui para o rápido diagnóstico da leptospirose. Além disso, a contaminação das amostras por outros microrganismos que podem inibir o crescimento da leptospira (SCHONBERG, 1981) é o principal problema envolvido no isolamento desse agente (ADLER, et al., 1986; GULLAND, et al., 1996) e para evitá-lo, é preciso a coleta asséptica da urina por cistocentese e o rápido processamento das amostras em meio de cultura confiável com antibiótico seletivo (THIERMANN, 1984). A reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido usada para detectar uma variedade de microrganismos, incluindo aqueles de significância clínica. É preciso lembrar que a PCR detecta apenas material genético de *Leptospira* spp., não necessitando do agente vivo, como ocorre no cultivo, o que pode justificar uma provável superioridade em sensibilidade da PCR em relação ao isolamento (BAL, et al., 1994). A sensibilidade da PCR muitas vezes exclui a necessidade de isolamento, tornando assim um método para a rápida detecção de organismos envolvidos em infecções agudas (OOTEMAN, et al., 2006). A PCR poderia, portanto, fornecer resultados mais rápidos. O isolamento do agente é o único meio, até o momento, que permite a identificação do sorovar infectante e a caracterização do isolado deve basear-se em testes específicos imunológicos e moleculares (LEVETT, 2001). Contudo, em se tratando de animais doentes com quadro clínico e histórico compatíveis com leptospirose, a PCR pode ser útil em demonstrar leptospiúria e servir como meio de diagnóstico precoce da leptospirose, aliado à soroaglutinação microscópica.

5 CONCLUSÕES

A reação de PCR na urina se mostrou útil como ferramenta de diagnóstico precoce da leptospirose em cães com histórico e manifestações clínicas compatíveis com a doença, havendo detecção de material genético de *Leptospira* spp. por PCR na urina antes que fosse possível detectar anticorpos aglutinantes no soro à SAM.

O número de confirmações de diagnóstico clínico e epidemiológico utilizando-se apenas a SAM (9 [37,5%]) ou apenas a PCR (11 [45,8%]) aumentou para 15 (62,5%) casos por meio da utilização das duas técnicas aliadas, o que confere um aumento de 66,7% nos casos confirmados apenas por SAM e um aumento de 36,36% nos casos confirmados apenas por PCR. Dessa forma, a PCR na urina deve ser usada como uma ferramenta para melhorar o diagnóstico da leptospirose canina, em conjunto com a SAM.

**CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CRUZADA ENTRE OS
SOROVARES ICTEROHAEMORRHAGIAE E COPENHAGENI DE
Leptospira interrogans POR MEIO DO TESTE DE INIBIÇÃO DE
CRESCIMENTO *IN VITRO* (TIC)**

1 INTRODUÇÃO

O isolamento do sorovar *copenhageni*, outro organismo incluído no sorogrupo *icterohaemorrhagiae*, ao lado do sorovar *icterohaemorrhagiae*, de cães de rua (YASUDA, et al., 1980), de um cão com infecção clinicamente detectável (CORDEIRO; SULZER, 1983), de humanos (SAKATA, et al., 1992; KO, et al., 1999; SILVA, et al., 2002b; ROMERO; YASUDA, 2006), de ratos e animais silvestres (GIORGI, et al., 1984; CORRÊA, et al., 2004), permite supor a alta prevalência da infecção por esse sorovar no Brasil, inclusive entre os cães. Em um dos estudos executados paralelamente a este (Capítulo 1), dos 29 cães com diagnóstico clínico de leptospirose, obteve-se êxito no isolamento de quatro amostras de leptospirosas, das quais três foram caracterizadas por VNTR-PCR como sorovar *canicola* e uma por aglutinação cruzada com anticorpos monoclonais como sorovar *copenhageni*. O paciente canino do qual se isolou esse sorovar *copenhageni* apresentou quadro clínico indistinguível dos apresentados pelos cães infectados pelo sorovar *icterohaemorrhagiae* (GEISEN, et al., 2007).

A imunidade desenvolvida contra a leptospirose é específica de sorovar (FAINE, 1999). Assim, as vacinas produzidas contra sorovares do sorogrupo *icterohaemorrhagiae* não protegem contra a infecção pelo sorovar *canicola* (BRUNNER; MEYER, 1950), justificando a inclusão de ambos os sorovares nas vacinas caninas. Da mesma forma, a crescente identificação da infecção canina pelos sorovares *grippothyphosa* e *pomona* nos Estados Unidos justificou a formulação e comercialização de vacinas contendo antígenos desses quatro sorovares (BIRNBAUM, et al., 1998; BARR, et al., 2005). A presença de reações cruzadas entre os diferentes sorovares, como é revelada pela reação de soroaglutinação microscópica, em que são detectados anticorpos aglutinantes contra vários sorovares, sugere a possível existência de proteção cruzada entre sorovares do mesmo sorogrupo (SONRIER, et al., 2000), como os sorovares *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae* (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991) ou, até mesmo, entre sorovares de diferentes sorogrupos (TABATA, et al., 2002). Apesar disso, as vacinas atualmente existentes para cães não conferem proteção cruzada contra outros sorogrupos (GUERREIRO, et al., 2001). Os antígenos LPS são responsáveis pela proteção homóloga, enquanto os antígenos protéicos eliciam a proteção homóloga e

algum grau de proteção heteróloga (SONRIER, et al., 2000), mas as diferenças entre sorovares têm sido bem demonstradas, inclusive em relação às proteínas antigênicas, o que confere a especificidade ao sorovar (GAMBERINI, et al., 2005). As diferenças antigênicas entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni permitem diferenciá-los pelo perfil de reatividade com anticorpos monoclonais (KORVER, et al., 1988; HOOKEY; PALMER, 1991), como visto no trabalho paralelo executado (Capítulo 1).

As vacinas que atualmente possuem o sorovar icterohaemorrhagiae em sua formulação conferem boa imunidade contra a infecção pelo sorovar homólogo. Entretanto pouco se conhece sobre a proteção conferida ao sorovar heterólogo copenhageni, embora sejam do mesmo sorogrupo. No estudo realizado paralelamente a este (Capítulo 1), a alta frequência de cães reagentes ao sorovar copenhageni, muitas vezes com títulos mais altos que em relação ao sorovar icterohaemorrhagiae, e o isolado do sorovar copenhageni de material clínico de um cão com leptospirose clínica indicam a necessidade de se avaliar a proteção dada pelas vacinas usualmente empregadas, contra a infecção pelo sorovar copenhageni.

A eficácia e duração da imunidade, conferidas por uma vacina e importantes para estabelecer os momentos de reforço vacinal e os intervalos de re-vacinação (GREENE; SCHULTZ, 2006), devem ser idealmente avaliadas por estudos de desafio, em que o animal vacinado é colocado frente ao agente infectante (USDA, 2002). Entretanto, trata-se de ensaio de extrema complexidade, inclusive do ponto de vista ético (GONÇALVES, 2007). O título de anticorpos aglutinantes tem sido considerado como uma medida da proteção contra as infecções. A reação de soroaglutinação microscópica, que é método de referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose recomendado pela OMS, tem sido utilizado para monitorar a resposta imune humoral pós-vacinal (KLAASEN, et al., 2003). Contudo, este método detecta primordialmente imunoglobulinas da classe IgM, não relacionadas com o grau de proteção (COYNE, et al., 2001) e, portanto, títulos não detectáveis ou baixos de anticorpos aglutinantes não significam ausência de proteção. Além disso, a proteção contra as leptospirose envolve anticorpos leptospiricidas ou neutralizantes contra as proteínas ou carboidratos de membrana externa da superfície do organismo (GREENE; SCHULTZ, 2006), os quais são predominantemente da classe IgG (HANSON, 1976). As variações na composição de carbono do LPS são responsáveis pela variedade de sorovares (KOIZUMI; WATANABE, 2004) e pela

incompleta proteção heteróloga. A proteção completa contra um antígeno em particular requer antígeno vacinal homólogo.

A técnica de inibição de crescimento descrita por Tripathy et al. (1971 ; 1973) constitui-se em um teste “*in vitro*” para a avaliação da proteção cruzada entre diferentes sorovares e se baseia na detecção de anticorpos leptospiricidas ou neutralizantes capazes de interromper ou diminuir expressivamente o crescimento bacteriano exponencial em meios de cultivo. Constitui-se, como objetivo deste trabalho, a avaliação, de forma indireta por meio desse teste, da proteção conferida pela vacina contendo sorovar icterohaemorrhagiae contra o sorovar copenhageni.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 24 cães adultos, machos e fêmeas, de criação comercial, entre 1 e 7 anos de idade, das raças Pastor Alemão, Rottweiler, e Labrador, em boas condições de saúde. Todos os animais haviam sido vacinados na primovacinação (três doses de vacinais) e depois anualmente, com vacina comercial contendo antígenos contra cinomose, parvovirose, adenovirose 1 e 2, coronavirose, parainfluenza e leptospirose (sorovares canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa e pomona). Por ocasião da última re-vacinação (a última dose vacinal tendo sido aplicada há 12 meses), previamente à aplicação do imunógeno, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais para obtenção de soro. Trinta dias após a aplicação da vacina, foi coletada uma nova amostra de soro de todos os animais, para a realização da prova de soroaglutinação microscópica e do teste inibição de crescimento *in vitro*.

2.2 TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)

Para a detecção de anticorpos aglutinantes anti-leptospíricos, as amostras de soro foram submetidas à reação de soroaglutinação microscópica descrita por Cole Jr. et al. (1973). Foram incluídos na bateria de antígenos 24 sorovares (pertencentes a 18 sorogrupos) considerados patogênicos e/ou de interesse regional e 3 sorovares saprófitos, de acordo com a técnica utilizada rotineiramente no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP (Quadro 1 do Capítulo 1).

Ambos os sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae, pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, foram incluídos na bateria de antígenos. As leptospiros de cada sorovar foram cultivadas em meio EMJH suplementado com 10% de soro de coelho inativado. Foram utilizados apenas cultivos puros, isentos de

contaminação, livres de auto-aglutinação, com 7 a 10 dias de crescimento e, por estimativa de densidade (escala de McFarland), contendo cerca de 100 a 200 leptospiras por campo microscópico (200 vezes). As amostras de soro foram diluídas em solução tamponada de Sorënsen, inicialmente na diluição 1:100 para triagem e, quando reagentes, diluídas sucessivamente em razão dois. Em cada poço da microplaca de aglutinação foram colocados 50µL da diluição do soro a ser testada e 50 µL da cultura de leptospira. Foram consideradas positivas as reações em que se observou aglutinação de pelo menos 50% das leptospiras. O título foi dado como a recíproca da maior diluição em que houve 50% aglutinação.

2.3 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO *IN VITRO* (TIC)

O teste de inibição de crescimento *in vitro* foi realizado conforme a técnica descrita por de Tripathy et al. (1971 ; 1973), utilizando-se os sorovares icterohaemorrhagiae (cepa RGA), copenhageni (cepa M20) e canicola (cepa Hond Utrecht IV). O sorovar canicola foi incluído no experimento para avaliar a resposta pré- e pós- vacinal, tendo-se conhecimento prévio de que não há proteção cruzada entre esse sorovar do sorogrupo Canicola e os sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (BRUNNER; MEYER, 1950). Os sorovares grippotyphosa e pomona não foram introduzidos nesse experimento. Foram utilizadas culturas vivas de leptospiras de 7 a 10 dias de crescimento em meio de cultivo EMJH suplementado com soro de coelho inativado, tempo de crescimento ótimo na escala de McFarland.

As amostras de soro pré e pós-vacinais foram diluídas em escala geométrica de razão dois (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) em solução tamponada de Sorënsen pH 7,5 (Fosfato dissódico anidro 8,33g, Fosfato monopotássico 1,09g, Água destilada 1.000mL). Uma parte do soro permaneceu sem diluição. Foi preparada uma bateria tubos com tampa baquelite, contendo 2,5 ml de meio líquido EMJH suplementado com 10% de soro de coelho inativado, a cada um dos quais adicionou-se 200µL de cada diluição do soro e 100 µL de cultura viva de uma das variantes sorológicas (copenhageni, icterohaemorrhagiae e copenhageni). Para cada uma das 5 diluições de soro com cada uma das 3 variantes sorológica de leptospira foram preparados 5

tubos, resultando num total 75 tubos por amostra de soro (25 tubos para cada sorovar testado com cada soro). Os tubos foram incubados a 28-30°C por 10 dias.

Após o período de incubação os tubos foram examinados quanto à existência de turvação comparando-se com a escala de McFarland, graduando de 1 a 4, na qual 1 e 2 foram considerados como ausência de crescimento (-) e 3 e 4 como presença de crescimento (+). Calculou-se, pelo método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938; MANCUSO, 1974), o maior título anticorpos neutralizantes em que houve inibição do crescimento das leptospiplas em 50% dos tubos trabalhados (TL50), dos soros de cada animal, contra cada variante sorológica, expresso como o logaritmo na base 10 ($\log_{10}$) da recíproca da respectiva diluição. Para cada uma das diluições calculou-se a frequência acumulada de tubos com crescimento negativo (FCneg) e com crescimento positivo (FCpos), calculando-se a porcentagem cumulativa de crescimento negativo (%Cneg), como ilustrado na tabela 1, de acordo com a fórmula:

$$\%Cneg = \frac{FCneg}{FCneg + FCpos}$$

Tabela 1 - Cálculo das frequências acumuladas de tubos com crescimento positivo e negativo e porcentagens cumulativas de crescimento negativo para cada diluição do soro (expressa em logaritmo de base 10) para uma amostra de soro testada contra um sorovar. – São Paulo – 2008

Diluição	Título ($\log_{10}$)	Tubos por diluição	Cneg	Cpos	Frequências Acumuladas		%Cneg (FCneg/FCneg+FCpos)
					FCneg	FCpos	
1:2	0,301	5	2 ↗	3 ↘	11	3	79%
1:4	0,602	5	4 ↗	1 ↘	9	4	69%
1:8	0,903	5	0 ↗	5 ↘	5	9	36%
1:16	1,204	5	4 ↗	1 ↘	5	10	33%
1:32	1,505	5	1 ↗	4 ↘	1	14	7%

Título ($\log_{10}$) = título expresso como o logaritmo de base 10 da recíproca da diluição; **Cneg** = tubos com crescimento negativo por diluição; **Cpos** = tubos com crescimento positivo por diluição; ↗ e ↘ = direção em que deve se somar os tubos com **Cneg** e **Cpos** para o cálculo das frequências acumuladas. **FCneg** = frequência acumulada de tubos com crescimento negativo; **FCpos** = frequência acumulada de tubos com crescimento positivo; **%Cneg** = porcentagem cumulativa de crescimento negativo.

O TL₅₀ foi então calculado de acordo com a fórmula:

$$TL_{50} = \text{Log}_{10}T>50\% + \frac{\%Cneg>50 - 50}{\%Cneg>50 - \%Cneg<50} \times (\text{Log}_{10}T>50\% - \text{Log}_{10}T<50\%)$$

Onde:

Log₁₀T>50% = Título expresso em log₁₀ imediatamente superior a %Cneg de valor 50

Log₁₀T<50% = Título expresso em log₁₀ imediatamente inferior a %Cneg de valor 50

%Cneg>50% = Valor de %Cneg imediatamente superior a %Cneg de valor 50

%Cneg<50% = Valor de %Cneg imediatamente inferior a %Cneg de valor 50

Efetuuou-se cálculo equivalente ao citado para a determinação do TL₂₅ e TL₇₅. A partir disso, calculou-se a médias geométricas (MG) das TL₅₀, TL₂₅ e TL₇₅ (MG TL₅₀, MG TL₂₅ e MG TL₇₅) de todos os animais para cada sorovar, nos momentos pré e pós-vacinais, as quais foram utilizada para o cálculo do erro padrão (EP) das médias geométricas de TL₅₀ de acordo com a seguinte fórmula:

$$EP (MG TL_{50}) = \sqrt{\frac{(0,97) (h) (r)}{n}}$$

Onde:

h = intervalo comum entre títulos (0,301)

r = amplitude interquartil (MG TL₇₅ — MG TL₂₅)

n = número de tubos por diluição

O erro padrão, por sua vez, foi utilizado para o cálculo do intervalo de confiança de 95% das médias geométricas de TL_{50} segundo a fórmula de Pizzi (1950):

$$\text{Int.Conf. 95\% (MG } TL_{50}) = (\text{MG } TL_{50} \text{ estimado}) \pm (1,96) (\text{EP estimado})$$

A proteção cruzada entre o sorovar *icterohaemorrhagiae* e sorovar *copenhageni* foi avaliada através da sobreposição dos intervalos de confiança das médias geométricas de TL_{50} de ambos os sorovares. Considerou-se o título mínimo de anticorpos neutralizantes, expresso em $\log_{10}$, capaz de conferir proteção contra a infecção, como sendo igual a 1 (GONÇALVES, 2007).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos títulos de anticorpos aglutinantes resultantes da reação de soroaglutinação foi meramente descritiva. A comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes (ou leptospiricidas) entre os sorovares em cada momento foi realizada através da análise de variância utilizando-se o método não paramétrico de Kruskal Wallis e a comparação entre os momentos de um mesmo soro foi realizada por meio do teste t (método não paramétrico de Mann Whitney).

3 RESULTADOS

Nenhum dos cães apresentava anticorpos anti-leptospira para os sorovares incluídos na bateria dos antígenos utilizados, em títulos iguais ou maiores que 100, no momento pré-vacinal. Após a aplicação da vacina, 10 (42%) dos cães tornaram-se reagentes a 1 ou mais dos sorovares grippotyphosa (sorogrupo Grippotyphosa), copenhageni e icterohaemorrhagiae (sorogrupo Icterohaemorrhagiae), butembo (sorogrupo Autumnalis), pomona (sorogrupo Pomona) e hardjobovis (sorogrupo Sejroe). Não houve reagentes ao sorovar canicola. Na tabela 2 encontram-se a frequência de reações positivas e os títulos de anticorpos para os sorovares.

Tabela 2 - Resultados das reações de soroaglutinação microscópica, realizadas 30 dias após a vacinação com vacina comercial contendo bacterinas contra os sorovares canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa e pomona – São Paulo – 2008.

Cão	sorovar						
	canicola	grippotyphosa	pomona	icterohaemorrhagiae	copenhageni	butembo	hardjobovis
1	-	200	800	-	-	200	-
2	-	400	-	-	-	-	-
3	-	200	200	-	-	100	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	400	200	-	-	400	-
6	-	200	400	-	-	100	-
7	-	-	-	-	200	200	-
8	-	800	100	-	200	200	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	200	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	-	400	800	800	800	400	800
19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-
24	-	200	-	200	400	-	-

Previamente à imunização, os títulos de anticorpos neutralizantes (TL_{50} expresso em logaritmo da base 10) contra o sorovar icterohaemorrhagiae (mediana = 1,625) foram maiores em relação ao título de anticorpos contra o sorovar canicola (mediana = 0,864; $p < 0,001$) e sorovar copenhageni (mediana = 0,602; $p < 0,001$). Após a imunização, houve um aumento do título de anticorpos neutralizantes para o sorovar canicola em relação ao momento pré-vacinal (mediana = 1,656; $p = 0,001$). Os títulos pós-vacinais contra os sorovares icterohaemorrhagiae (mediana = 1,625; $p = 0,783$) e copenhageni (mediana = 0,489; $p = 0,621$) não foram significativamente alterados quando comparados aos seus respectivos títulos pré-vacinais (Tabela 3).

Tabela 3 - Medianas e interquartis de 25% e 75% das TL_{50} (expressos em logaritmo de base 10) dos soros para cada sorovar utilizado no teste de inibição de crescimento *in vitro*, nos momentos pré- e pós-vacinais – São Paulo – 2008

Sorovar	Pré-vacinal			Pós-vacinal		
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%
copenhageni	0,602	0,256	1,159	0,489	0,220	1,246
icterohaemorrhagiae	1,625*	1,545	1,656	1,625	1,538	1,656
canicola	0,825	0,477	1,617	1,656 [#]	1,537	1,656

* diferença significativa dos anticorpos neutralizantes pré-vacinais contra o sorovar icterohaemorrhagiae em relação aos outros sorovares no mesmo momento; [#] diferença significativa entre os títulos de anticorpos neutralizantes para o sorovar canicola antes e após a vacinação.

No gráfico 1, encontram-se apresentados a mediana, primeiro e terceiro quartis (25% e 75%), valores máximos e mínimos dos títulos de anticorpos neutralizantes TL_{50} (expressos em $\log_{10}$) pré- (**A**) e pós-vacinais (**B**), contra os sorovares canicola, icterohaemorrhagiae e copenhageni.

Gráfico 1 - BoxPlot dos TL₅₀ (expressos em logaritmo de base 10) contra os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola, obtidos no teste de inibição de crescimento *in vitro*, nos momentos pré- (A) e pós vacinais (B): valores de mediana, interquartis de 25% e 75%, valores mínimos e máximos, **cop** = sorovar copenhageni; **ict** = sorovar icterohaemorrhagiae; **can** = sorovar canicola, * diferença significativa dos anticorpos neutralizantes pré-vacinais contra o sorovar icterohaemorrhagiae em relação aos outros sorovares no mesmo momento; # diferença significativa entre os títulos de anticorpos neutralizantes para o sorovar canicola antes e após a vacinação – São Paulo – 2008

Na tabela 4 estão expostos as médias geométricas de TL_{50} (expresso em $\log_{10}$) de anticorpos neutralizantes de todos os cães para os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola, antes e após a vacinação, e os respectivos intervalos de confiança (95%). Observou-se aumento do título de anticorpos neutralizantes anti-canicola, evidenciando resposta imune ao estímulo antigênico.

Tabela 4 - Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% de TL_{50} (expressos em logaritmo de base 10) contra os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola nos momentos pré- e pós-vacinais, após teste de inibição do crescimento *in vitro*. – São Paulo – 2008

Sorovar	Pré-vacinal	Pós-vacinal
copenhageni	$0,583 \pm 0,322$	$0,510 \pm 0,304$
icterohaemorrhagiae	$1,444 \pm 0,278$	$1,455 \pm 0,287$
canicola	$0,725 \pm 0,317$	$1,475 \pm 0,270$

Transformando-se os valores da MG TL_{50} expressos em logaritmo de base 10 para valores expressos em antilogaritmo de base 10, obteve-se a média geométrica do título de anticorpos neutralizantes capaz de inibir o crescimento em 50% dos tubos (MG TL_{50}), expresso como a recíproca da respectiva diluição (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias geométricas e intervalos de confiança (95%) dos TL_{50} (expressos como a recíproca das respectivas diluições) pré- e pós-vacinais contra os sorovares copenhageni, icterohaemorrhagiae e canicola, após teste de inibição do crescimento *in vitro* – São Paulo – 2008

Sorovar	Pré-vacinal	Pós-vacinal
copenhageni	$3,829 \pm 2,097$	$3,232 \pm 2,014$
icterohaemorrhagiae	$27,793 \pm 1,898$	$28,485 \pm 1,936$
canicola	$5,312 \pm 2,074$	$29,863 \pm 1,863$

No gráfico 2 estão apresentados os valores das médias geométricas de TL_{50} e os respectivos intervalos de confiança de 95% (expressos em logaritmo de base 10), para os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni, nos momentos pré- (A) e pós-vacinais (B). Após a vacinação não houve alteração do título de anticorpos contra o sorovar icterohaemorrhagiae ou copenhageni, não havendo sobreposição dos títulos de anticorpos, no intervalo de confiança de 95%, entre esses sorovares.

Gráfico 2 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes (MG TL₅₀) e respectivos intervalos de confiança (95%), expressos em valores logaritmos de base 10, dos soros dos cães, antes da vacinação (A) e trinta dias após a vacinação (B), obtidos no teste de inibição de crescimento *in vitro* contra os sorovares copenhageni (○), icterohaemorrhagiae (●) – São Paulo – 2008

4 DISCUSSÃO

Como esperado, no momento pré-vacinal, os cães não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis para os sorovares incluídos na vacina utilizada, ou para outros sorovares, que pudessem indicar a persistência de anticorpos aglutinantes ou infecção recente. Cães que se recuperam da infecção apresentam altos títulos de anticorpos aglutinantes (ANDRE-FONTAINE, et al., 2003). Assim, após a imunização era de se esperar que os cães desenvolvessem anticorpos em títulos detectáveis na reação de SAM, especificamente para os antígenos vacinais. Entretanto, os anticorpos específicos contra os sorovares incluídos na vacina foram observados em menos de 50% dos cães (grippytyphosa – 33%, pomona – 25%, icterohaemorrhagiae – 8% e canicola – 0%) em títulos que variaram de 100 a 800. Paradoxalmente, foram observadas reações cruzadas com outros sorovares não presentes na vacina, em títulos iguais ou maiores, como no caso dos sorovares copenhageni (sorogrupo Icterohaemorrhagiae) e hardjobovis (sorogrupo Sejroe) e butembo (sorogrupo Autumnalis). As reações cruzadas entre sorovares de um mesmo sorogrupo ou de sorogrupos diferentes são comuns nas infecções naturais ou nos momentos pós-vacinais (WHO, 1967; GREENE, et al., 2006). Quando múltiplos sorovares de um mesmo sorogrupo são incluídos na reação de soroaglutinação microscópica, a reatividade cruzada torna-se uma regra, em vez de exceção (LEVETT, 2003). Os resultados obtidos aqui são semelhantes aos de Stokes et al. (2007). Isto ocorre, pois algumas das proteínas antigênicas se conservam entre diferentes sorovares (GAMBERINI, et al., 2005).

Apesar da ausência de anticorpos aglutinantes no momento pré-vacinal, quando se realizou o TIC, a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (expressos em logaritmo de base 10) (MG TL_{50}), em relação ao sorovar icterohaemorrhagiae, foi maior do que 1,0 (inclusive o menor valor do intervalo de confiança, que foi de 1,166). Para o sorovar canicola, o limite superior do intervalo de confiança foi discretamente maior que 1,0 (1,042) e, considerando-se que título de anticorpos neutralizantes igual ou maior que 1,0 é indicativo de proteção (GONÇALVES, 2007), é possível afirmar que, os cães não estavam protegidos contra o sorovar canicola, com exceção de alguns animais. O estímulo antigênico incitado pela vacina não alterou consideravelmente o título de anticorpos

neutralizantes para o sorovar icterohaemorrhagiae, o que pode significar que a imunidade residual era suficiente para promover nenhuma ou pouca resposta imune adicional. Isto justificaria, inclusive, a baixa resposta humoral em relação aos anticorpos aglutinantes. Apenas 42% dos cães apresentaram títulos de anticorpos aglutinantes pós-vacinais. Outra hipótese seria que a vacina tivesse pouco potencial imunogênico, incapaz de estimular uma resposta imune. Entretanto, os cães foram vacinados com a mesma vacina anteriormente utilizada e, após isso, apresentaram anticorpos neutralizantes em títulos capazes de inibir o crescimento da bactéria, o que significa que os animais estavam protegidos contra a infecção pelo sorovar icterohaemorrhagiae. Portanto, se o teste de inibição de crescimento *in vitro* (TIC) for considerado um teste válido para indicar a duração da imunidade, pode-se afirmar que esta, para o sorovar icterohaemorrhagiae, é de pelo menos um ano.

Andre-Fontaine et al. (2003), em estudo de desafio em hamsters (USDA, 2002), determinou que as vacinas contra leptospirose conferem uma imunidade de curta duração, de cerca de 6 meses, sendo inclusive recomendada, para os cães expostos ao alto risco de infecção por leptospira, a vacinação semestral (PAUL, et al., 2006). Entretanto, Bey e Johnson (1978), realizaram um estudo no qual os cães receberam uma dose de vacina nas semanas zero e 4, e 48 semanas após a segunda dose (1 ano após a primeira) os títulos de anticorpos detectados à soroaglutinação microscópica para os sorovares icterohaemorrhagiae, canicola, pomona e grippotyphosa, eram menores que 10. Entretanto, nesse mesmo trabalho se avaliou a atividade leptospiricida dos soros testados e, na 52ª semana a atividade leptospiricida contra o sorovar icterohaemorrhagiae superou a dos outros sorovares (título de 1.280 contra 640, 160 e 80, respectivamente). Hartman et al. (1984) constataram que, os anticorpos IgG persistiram por 19 a 52 semanas após uma vacinação inicial e por mais de 52 semanas após uma segunda vacinação, o que poderia explicar os resultados pré-vacinais para o teste de inibição do crescimento *in vitro* no presente trabalho em relação ao sorovare icterohaemorrhagiae. Nesses últimos dois estudos citados não foi realizado o teste de desafio.

Quanto ao sorovar canicola, o cão é considerado reservatório desse sorovar (BOLIN, 1996). Em geral, a imunidade desenvolvida é baixa, com baixos títulos de anticorpos aglutinantes (GEISEN, et al., 2007). A infecção não aparente, bem como o estado de portador, são freqüentemente observados (YASUDA, et al., 1980). A ausência de anticorpos aglutinantes pré e pós-vacinais pode ser explicada pela

pouca patogenicidade desse sorovar para o cão, pelo baixo estímulo antigênico incitado pela vacina. A vacina, no entanto, foi considerada capaz de proteger os cães em momento imediatamente posterior (30 dias) à vacinação, se houvesse exposição, contra a infecção natural pelo sorovar canicola. Essa imunidade deve ser de curta duração, já que no momento pré-vacinal, ou cerca de 12 meses após a vacinação anterior, o título de anticorpos neutralizantes não era suficiente para proteger contra a infecção natural.

Após a vacinação, os títulos de anticorpos neutralizantes contra o sorovar copenhageni não apresentaram diferença significativa em relação aos títulos pré-vacinais contra esse sorovar ($p=0,621$), podendo-se concluir, diferentemente do sorovar canicola, para o qual houve um significativo aumento nos títulos de anticorpos neutralizantes ($p<0,001$) após a vacinação, que os baixos títulos de anticorpos neutralizantes pré-vacinais contra o sorovar copenhageni não se devem apenas a diminuição desses títulos desde a última vacinação (há 1 ano), mas sim ao fato de que a vacina utilizada normalmente para vacinar esses cães, a qual não contém bactéria do sorovar copenhageni em sua formulação, não é capaz de eliciar a produção desses anticorpos, não podendo haver, portanto, um aumento de títulos de anticorpos neutralizantes, após a vacinação neste experimento, em função de memória imunológica (BEY; JOHNSON, 1978) para o sorovar copenhageni como houve com o sorovar canicola. Além disso, e principalmente, a não sobreposição dos valores entre os intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o sorovar copenhageni em relação ao sorovar icterohaemorrhagiae (Gráfico 2) mostra a inexistência de proteção cruzada entre eles e há uma grande distância entre os valores de TL_{50} desses dois sorovares.

Ainda, poderia ser questionado se os títulos de inibição do crescimento do sorovar copenhageni obtidos seriam suficientes para conferir proteção contra infecção por esse sorovar, apesar da não existência de proteção cruzada do sorovar icterohaemorrhagiae contra o copenhageni. Entretanto, nos momentos pré- e pós vacinal, as médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes (expressos em logaritmo de base 10) ($MG TL_{50}$) contra o sorovar copenhageni, somada aos respectivos intervalos de confiança de 95%, foram menores do que 1, respectivamente de 0,905 e 0,814, não sendo portanto, suficientes para conferir proteção contra a infecção por esse sorovar. As médias geométricas dos títulos de

anticorpos neutralizantes (expressos em logaritmo de base 10) ($MG\ TL_{50}$) contra o sorovar canicola, somada aos respectivos intervalos de confiança de 95% no momento pré-vacinal (expresso em $\log_{10}$) foi de 1,042.

Isso confirma a imunidade sorovar específica conferida pelo sorovar icterohaemorrhagiae. Apesar de os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni apresentarem entre si proteínas antigênicas conservadas, nem todas as proteínas se conservam (GAMBERINI, et al., 2005). Os lipídios de membrana do sorovar icterohaemorrhagiae mostram uma especificidade exclusiva (CHO, et al., 1992). Já o sorovar copenhageni apresenta componentes antigênicos ausentes no sorovar icterohaemorrhagiae (ARIMITSU, et al., 1980). Estes sorovares também são diferenciados com sucesso pela técnica de reação com anticorpos monoclonais (KOBAYASHI, et al., 1984; 1985, 1987). Os sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae são identificados respectivamente pelos anticorpos monoclonais F70 C24 e F70 C14-10 (KORVER, et al., 1988; HOOKEY; PALMER, 1991), como demonstrado no capítulo 1. É com base nessas diferenças entre estes sorovares e na imunidade predominantemente humoral e sorovar específica (SHINAGAWA; YANAGAWA, 1972; ADACHI; YANAGAWA, 1977), que já há vacinas que incluem o sorovar copenhageni em sua formulação no Japão (Takeda Chemical Industries, Ltd., e Denka-Seiken Co., Japão), Nova Zelândia (Lepto 3 - CSL Limited) e até mesmo no Brasil (Leptovacin – Biovet; Tissuvax Max[®] - Coopers Brasil Ltda), pois cães vacinados com vacinas que não contenham o sorovar copenhageni em sua formulação podem se infectar por esse sorovar.

Os sorovares grippotyphosa e pomona não foram incluídos nesse estudo, pois não há evidência alguma de proteção cruzada desses sorovares com o sorovar copenhageni na literatura, ao contrário do que se encontrou para os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). Além disso, animais vacinados contra icterohaemorrhagiae e canicola são susceptíveis à infecção pelos sorovares grippotyphosa e pomona (BIRNBAUM, et al., 1998; BARR, et al., 2005).

Desde o início desse experimento houve a tentativa de se utilizar duas vacinas monvalentes contendo cada uma, respectivamente, bacterinas do sorovar copenhageni e icterohaemorrhagiae. Seriam formados três grupos de animais, um vacinado contra copenhageni, outro contra icterohaemorrhagiae e um grupo seria mantido controle, sem vacinação. Os soros desses animais seriam confrontados

com culturas tanto de sorovar copenhageni como de icterohaemorrhagiae, determinando mais objetivamente, por meio do teste de inibição do crescimento *in vitro*, a presença ou não de reação cruzada entre esses dois sorovares, não só a proteção do icterohaemorrhagiae contra o copenhageni, mas também do copenhageni contra o icterohaemorrhagiae. Devido a problemas técnicos, não foi possível desenvolver as vacinas monovalentes a tempo da conclusão deste trabalho no prazo estipulado, o que forçou a realização do experimento como foi exposto aqui. Os resultados foram satisfatórios, mas para a obtenção de dados mais exatos, faz-se necessário um experimento com maior número de animais e vacinas monovalentes contra cada sorovar (incluindo o sorovar copenhageni), uma para cada grupo experimental, além de um grupo controle.

5 CONCLUSÕES

Nem todos os animais apresentaram títulos de anticorpos aglutinantes após a vacinação. Os que o fizeram, exibiram títulos relativamente baixos (até 800) e sugerindo algum grau de reatividade cruzada entre os sorovares vacinais e outros não contidos na vacina, demonstrando que a reação de soroaglutinação microscópica não é consistente na avaliação da imunidade pós-vacinal.

No teste de inibição de crescimento *in vitro*, os resultados pré-vacinais para o sorovar icterohaemorrhagiae sugerem que a imunidade contra esse sorovar teria duração mais longa (pelo menos 1 ano) que a imunidade contra o sorovar canicola.

Os resultados pós-vacinais do teste de inibição de crescimento *in vitro* mostraram claramente que não houve inibição satisfatória do crescimento *in vitro* do sorovar copenhageni e que a vacina usada nesse experimento, contendo bacterina do sorovar icterohaemorrhagiae não confere proteção contra a infecção por esse sorovar.

Para a obtenção de dados mais exatos a cerca da proteção cruzada entre os sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae, faz-se necessário um experimento com maior número de animais divididos em três grupos, sendo um grupo vacinado com vacina monovalente contendo bacterina do sorovar icterohaemorrhagiae, o segundo grupo vacinado com vacina monovalente contendo bacterina do sorovar copenhageni e, outro grupo, mantido como controle, sem vacinação. Os soros desses animais devem ser confrontados com culturas tanto de sorovar copenhageni como de icterohaemorrhagiae, por meio do teste de inibição do crescimento *in vitro*, determinando mais objetivamente a presença ou não de reação cruzada entre esses dois sorovares.

REFERÊNCIAS

- ABREU FONSECA, C.; TEIXEIRA DE FREITAS, V. L.; CALO ROMERO, E.; SPINOSA, C.; ARROYO SANCHES, M. C.; SILVA, M. V.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 11, p. 1699-1707, 2006.
- ADACHI, Y.; YANAGAWA, R. Inhibition of leptospiral agglutination by the type-specific main antigens of leptospiras. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 2, p. 466-467, 1977.
- ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W. L.; CHAPPEL, R. J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 377-381, 1986.
- ANDRE-FONTAINE, G.; BRANGER, C.; GRAY, A. W.; KLAASEN, H. L. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. **Veterinary Record**, v. 153, n. 6, p. 165-169, 2003.
- ARAGÃO, H. B. Sobre a presença de espirochoeta icterohemorrhagiae nos ratos no Rio de Janeiro. **Brazil-Médico**, v. 31, n. 39, p. 329-330, 1917.
- ARIMITSU, Y.; MORI, M.; AKAMA, K. Cross antigenicities of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni Shibaura strain for preparing biological products in Japan. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 33, n. 4, p. 223-229, 1980.
- AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. D. S.; BROD, C. S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.
- BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BARR, S. C.; MCDONOUGH, P. L.; SCIPIONI-BALL, R. L.; STARR, J. K. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 10, p. 1780-1784, 2005.

BEY, R. F.; JOHNSON, R. C. Humoral immune response of dogs vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 831-836, 1978.

BIRNBAUM, N.; BARR, S. C.; CENTER, S. A.; SCHERMERHORN, T.; RANDOLPH, J. F.; SIMPSON, K. W. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, n. 5, p. 231-236, 1998.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.

BRANDÃO, A. P.; CAMARGO, E. D.; SILVA, E. D.; SILVA, M. V.; ABRAO, R. V. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3138-3142, 1998.

BRANGER, C.; BLANCHARD, B.; FILLONNEAU, C.; SUARD, I.; AVIAT, F.; CHEVALLIER, B.; ANDRE-FONTAINE, G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 2, p. 437-445, 2005.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n., p. 839-858, 1999. Pt 2.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A.; JOUGLARD, S. D.; FERNANDES, C. P.; TEIXEIRA, J. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.

BRUNNER, K. T.; MEYER, K. F. Immunization of hamsters and dogs against experimental leptospirosis. **The Journal of Immunology**, v. 64, n. 5, p. 365-372, 1950.

CARVALHO, J. E. M.; MORAES, I. N.; FERREIRA, A. S.; GOMES, R. L. C.; DALSTON, M. O.; SILVA, J. J. P. Study of bronchoalveolar lavage in leptospirosis

patients with pulmonary involvement. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 2, p. 134-139, 2004.

ÇETİNKAYA, B.; ERTAŞ, H. B.; ÖNGÖR, H.; MUZ, A. Detection of *Leptospira* Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Urine of Cattle. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** v. 24, n. 2, p. 123-130, 2000.

CHO, S. N.; UHM, J. R.; KIM, J. D. Comparative analysis of lipopolysaccharide and lipid antigens of *Leptospira interrogans* serovars. **Yonsei Medical Journal**, v. 33, n. 1, p. 24-31, 1992.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-534, 536-537, 1993.

COLE JR., J. R.; SULZER, C. R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.

CORDEIRO, F.; SULZER, C. R. *Leptospira interrogans*, serovar copenhageni, isolated from a dog in Belo Horizonte, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 14, n. 1, p. 38-41, 1983.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. D. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. D. B. V.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F. Epidemiology of the Leptospirosis in wild animals at the Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 189-193, 2004.

COYNE, M. J.; BURR, J. H.; YULE, T. D.; HARDING, M. J.; TRESNAN, D. B.; MCGAVIN, D. Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. **Veterinary Record**, v. 149, n. 17, p. 509-515, 2001.

ENRIETTI, M. A. Contribuição ao conhecimento da incidência de *Leptospiras* em murédeos, caninos e suínos no Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Thecnology**, v. jubilee, n., p. 311 - 342, 2001.

FAINE, S. **Guidelines for the control of Leptospirosis**. Geneva: World Health Organization. , v. 1982. (Offset Publication n.67)

_____. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne, Australia: MediSci, v. 1999. 272 p.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918 **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n., p. 461-463 1982.

FAVERO, A. C. M.; MANGERONA, A. C. S.; ALESSI, L. J.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; VASCONCELLOS, S. A. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose. Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 64, n. 12, p. 44-55, 1997.

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAES, Z. M. D.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F. Sorovares de leptospira predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FREITAS, J. C. D.; SILVA, F. G. D.; OLIVEIRA, R. C. D.; DELBEM, Á. C. B.; MULLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolamento de *Leptospira* spp de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.

FREUDENSTEIN, H.; HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** v. 14, n. 3, p. 229-234, 1991.

GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTAROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a Microtechnique to the Agglutination Test for Leptospiral Antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, n., p. 81-85, 1965.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 2, p. 305-313, 2005.

GEISEN, V.; STENGEL, C.; BREM, S.; MULLER, W.; GREENE, C.; HARTMANN, K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 324-328, 2007.

GIORGI, W.; GENOVEZ, M. E.; TERUYA, J.; SILVA, A. S. *Leptospira interrogans*, sorotipo wolffi, isolada de camundongo capturado no porto de Santos, SP. **Biológico**, São Paulo. v. 50, n. 12, p. 295-297, 1984.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. D. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. **Ciencia Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.

GONÇALVES, A. P. **Avaliação das vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* e o teste de desafio em hamsters**. 2007. 96 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GREENE, C. E.; SCHULTZ, R. D. Immunoprophylaxis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Elsevier, v., 2006. p. 1069-1119

GREENE, C. E.; SYKES, J. E.; BROWN, C. A.; HARTMAN, K. Leptospirosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. St. Louis: Elsevier, v., 2006. p. 402-417

GSELL, O. The history of leptospirosis: 100 years. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A**, v. 257, n. 4, p. 473-478, 1984.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO REIS, M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.

GUIDA, V. O. Estudo sobre a leptospirose canina II. Isolamento e identificação de amostras de leptospiros. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 8, n. 4, p. 541-543, 1948.

GULLAND, F. M.; KOSKI, M.; LOWENSTINE, L. J.; COLAGROSS, A.; MORGAN, L.; SPRAKER, T. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981-1994. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 4, p. 572-580, 1996.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HANSON, L. E. Bovine Leptospirosis. **Journal of Dairy Science** v. 59 n. 6, p. 1166-1170, 1976.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1224-1229, 2003a.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T.; PURVIS, T. J.; CHENGAPPA, M. M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1230-1233, 2003b.

HARTMAN, E. G.; VAN HOUTEN, M.; FRIK, J. F.; VAN DER DONK, J. A. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 7, n. 3-4, p. 245-254, 1984.

HEATH JR., C. W.; ALEXANDER, A. D.; GALTON, M. M. Leptospirosis in the United States. Analysis of 483 cases in man, 1949, 1961. **New England Journal of Medicine** v. 273, n. 17, p. 915-922, 1965.

HODGES, R. T.; EKDAHL, M. O. Use of a fluorescent antibody technique for the serological differentiation of leptospiral serotypes in cultures and in bovine urine. **New Zealand Veterinary Journal** v. 21, n. 6, p. 109-115, 1973.

HOOKEY, J. V.; PALMER, M. F. A comparative investigation and identification of *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae strains by monoclonal antibody and DNA fingerprint analyses. **Zentralblatt für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology**, v. 275, n. 2, p. 185-199, 1991.

IDO, Y.; HIROSHI ITO; WANI, H. Spirochaeta hebdomadis, the causative agent of seven day fever (nanukayami). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 28, n., p. 435-448, 1918.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, A. H. The prophylaxis of Weil's disease (Spirochetosis icterohaemorrhagica). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 24, n., p. 471-483, 1916.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The rat as a carrier of spirochaeta icterohaemorrhagiae, the causative agent of weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 26, n., p. 341-353, 1917.

JOUGLARD, S. D. D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do Município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico de São paulo**, v. 67, n. 2, p. 181-185, 2000.

KAWAOKA, Y.; NAIKI, M.; YANAGAWA, R. Radioimmunoassay system using a serovar-specific lipopolysaccharide antigen of Leptospira. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 313-316, 1979.

KLAASEN, H. L.; MOLKENBOER, M. J.; VRIJENHOEK, M. P.; KAASHOEK, M. J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 1-2, p. 121-132, 2003.

KMETY, E.; GALTON, M. M.; SULZER, C. R. Further standardization of the agglutinin-absorption test in the serology of leptospires. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 42, n. 5, p. 733-738, 1970.

KO, A. I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON JR., W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KOBAYASHI, Y.; TAMAI, T.; OYAMA, T.; HASEGAWA, H.; SADA, E.; KUSABA, T.; HAMAJI, M. Characterization of monoclonal antibodies against etiological agents of Weil's disease. **Microbiology and Immunology**, v. 28, n. 3, p. 359-370, 1984.

KOBAYASHI, Y.; TAMAI, T.; SADA, E. Serological analysis of serogroup icterohaemorrhagiae using monoclonal antibodies. **Microbiology and Immunology**, v. 29, n. 12, p. 1229-1235, 1985.

_____. Antigenic analysis of serogroup Icterohaemorrhagiae using monoclonal antibodies. **Israel Journal of Medical Science and Biology**, v. 43, n. 4, p. 737-738, 1987.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, 2004.

KORVER, H.; KOLK, A. H. J.; VINGERHOED, J.; VAN LEEUWEN, J.; TERPSTRA, W. J. Classification of serovars of the Icterohaemorrhagiae serogroup by monoclonal antibodies. . **Israel Journal of Medical Science and Biology**, v. 44, n. 1, p. 15-18, 1988.

KRUMBEIN, R.; FRIELING, B. Zur Weilschen Krankheit. **Deutsche medizinische wochenschrift** v. 42, n. 19, p. 564-566, 1916.

LANG, R. W.; MORSE, E. V. Serologic Cross Reactions among Leptospirae Observed with Sera from Animals Infected with Leptospira Pomona¹. **The Journal of Immunology**, v. 82, n. 5, p. 471-476, 1959.

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

_____. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 447-452, 2003.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F. Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 837-842, 2008.

LOBO, E. A.; TAUTZ, S. M.; CHARLIER, C. F.; CONCEIÇÃO, A. D.; NETO, J. A. S. P. Estudo comparativo do padrão sorológico de animais domésticos potencialmente transmissores de leptospirose no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, entre os anos 2002 e 2003. **Caderno de Pesquisa Série Biologia** v. 16, n. 2, p. 47-64, 2004.

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in Leptospira interrogans sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005.

MANCUSO, P. C. Titulagens: Kärber ou Reed-Muench? **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 2, n., p. 59-71, 1974.

MARSHALL, R. B.; WINTER, P. J.; YANAGAWA, R. Restriction endonuclease DNA analysis of *Leptospira interrogans* serovars icterohaemorrhagiae and hebdomadis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 808-810, 1984.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; MORAIS, Z. M.; PINTO, C. O.; SUCUPIRA, M. C. A.; DIAS, R. A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; SILVEIRA DA COSTA, S.; TABATA, R.; MARCONDES, A. G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 69, n. 2, p. 25-32, 2002.

MCDOWEL, A. Do icterus epidemicus. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 7, n., p. 335-345, 1917.

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**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 1, p. 281-285, 1995.

MICHNA, S. W. Leptospirosis. **Veterinary Record**, v. 86, n. 17, p. 484-496, 1970.

MYERS, D. M. **Manual de metodos para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis**. Buenos Aires: OPAS. Centro Panamericano de Zoonosis, p. 1985. (Nota Técnica nº 30).

NALLY, J. E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X. Y.; FISHBEIN, M. C.; PEREIRA, M. M.; DA SILVA, J. J.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.

NOGUCHI, H. Spirochaeta icterohaemorrhagiae in american wild rats and its relation to the japanese and european strains. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 25, n., p. 755-763, 1917.

OLIVEIRA, A. A.; MOTA, R. A.; PEREIRA, G. C.; LANGONI, H.; SOUZA, M. I.; NAVEGANTES, W. A.; SA, M. E. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research** v. 68, n. 4, p. 275-279, 2001.

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

PAUL, M. A.; CARMICHAEL, L. E.; CHILDERS, H.; COTTER, S.; DAVIDSON, A.; FORD, R.; HURLEY, K. F.; ROTH, J. A.; SCHULTZ, R. D.; THACKER, E.; WELBORN, L. 2006 AAHA canine vaccine guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, n. 2, p. 80-89, 2006.

PEREIRA, M. M.; MATSUO, M. G.; BAUAB, A. R.; VASCONCELOS, S. A.; MORAES, Z. M.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 450-452, 2000.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method. **Human Biology**, v. 22, n. 3, p. 151-190, 1950.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 139-147, 2002.

ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C.; YASUDA, P. H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 245-248, 2003.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 373-378, 2006.

SAKATA, E. E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C.; SILVA, M. V.; LOMAR, A. V. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 217-221, 1992.

SALAUN, L.; MERIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3954-3962, 2006.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Revista de Microbiologia**, v. 1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SCHONBERG, A. Studies on the effect of antibiotic substances on leptospires and their cultivation from material with a high bacterial count. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, v. 249, n. 3, p. 400-406, 1981.

SCHÜFFNER, W. Recent work on leptospirosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 28, n., p. 7-31, 1934.

SHINAGAWA, M.; YANAGAWA, R. Isolation and characterization of a leptospiral type-specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 5, n. 1, p. 12-19, 1972.

SILVA, A. Q. **Avaliação da técnica VNTR – PCR para caracterização molecular de cepas de *Leptospira* sp.** 2006. 88 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina e Saúde.) – Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SILVA, A. V.; LIMA, V. Y.; PEZERICO, S. B.; AL., E. Estudo retrospectivo (1996-2001) dos exames sorológicos para leptospirose humana, ovina, suína, caprina, canina e bovina, realizados no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses/FMVZ/UNESP/Botucatu. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n., p. 146, 2002a. Suplemento 1.

SILVA, J. J. P.; DALSTON, M. O.; CARVALHO, J. E. M.; SETÚBAL, S.; OLIVEIRA, J. M. C.; PEREIRA, M. M. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4 p. 395-399, 2002b.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOEN-CLOUET, N.; GANIERE, J. P.; ANDRE-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, v. 19, n. 1, p. 86-94, 2000.

STIMSON, A. M. Note on an organism found in yellow-fever tissue. **Public Health Reports**, v. 22, n., p. 451, 1907.

STOKES, J. E.; KANEENE, J. B.; SCHALL, W. D.; KRUGER, J. M.; MILLER, R.; KAISER, L.; BOLIN, C. A. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 11, p. 1657-1664, 2007.

SULZER, C. R.; JONES, W. L. Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 655-657, 1973.

SURUJBALLI, O. P.; MARENGER, R. M.; EAGLESOME, M. D.; SUGDEN, E. A. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar hardjo antibodies in bovine sera. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 260-266, 1997.

TABATA, R.; NETO, H. S.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M. D.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 265-268, 2002.

TAKASE, H.; YANAGAWA, R. Opsonic effect of monoclonal antibodies against *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Veterinary Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 167-180, 1988.

TAYLOR, K. A.; BARBOUR, A. G.; THOMAS, D. D. Pulsed-field gel electrophoretic analysis of leptospiral DNA. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 323-329, 1991.

TERPSTRA, W. J.; JABBOURY-POSTEMA, J.; KORVER, H. Immunoperoxidase staining of leptospires in blood and urine. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie** v. 254, n. 4, p. 534-539, 1983.

TERPSTRA, W. J.; KORVER, H.; VAN LEEUWEN, J.; KLATSER, P. R.; KOLK, A. H. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A**, v. 259, n. 4, p. 498-506, 1985.

THIERMANN, A. B. Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Practice**, v. 65, n. 10, p. 758-759, 1984.

TRIPATHY, D. N.; HANSON, L. E.; KRUMREY, W. A. An *in vitro* growth inhibition test for leptospiral neutralization. ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 75.1971. St. Louis. **[Proceedings...]** St. Louis: Animal Health Association.1971. p. 138-143.

TRIPATHY, D. N.; HANSON, L. E.; MANSFIELD, M. E. Growth inhibition test for measurement of immune response of animals vaccinated with leptospiral bacterins. ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 77.1973 St. Louis. **[Proceedings...]** St. Louis: Animal Health Association.1973. p. 113-118.

UIP, D. E.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M. S. Diagnóstico precoce da leptopirose por demonstração de antígenos através de exame imuno-histoquímico em músculo da panturrilha. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 375-381, 1992.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE. **General licensing considerations:** study practices and documentation. Veterinary Services Memorandum 800.200. 2002. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/memos/800_202.pdf>. Acessado em: 19 mar. 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Current problems in leptospirosis research: Report of a WHO expert group.** Geneva: World Health Organization. 1967. (Technical Report Series of the World Health Organization nº 380).

_____. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis:** guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acessado em: 21 mar. 2008.

WOHL, J. S. Canine leptospirosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian (Small animal - Canine medicine)**, v. 18, n. 11, p. 1215–1224, 1996.

WOLBACH, S. B.; BINGER, C. A. L. Notes on a filtrable spirochete from fresh water *Spirocheta Biflexa* (new species). **The Journal of Medical Research**, v. 30, n. 1, p. 23–26, 1914.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C. A.; MYERS, D. M.; YANAGUITA, R. M. The isolation of leptospires from stray dogs in the city of Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, n. 2, p. 131-134, 1980.

ZHANG, W. H.; BAI, X. F.; NIE, D. K.; DENG, Q. D. An application of monoclonal antibodies to identification of leptospires of serogroup icterohaemorrhagiae found in China. **Microbiology and Immunology**, v. 33, n. 12, p. 1039-1043, 1989.

ZUERNER, R. L.; ELLIS, W. A.; BOLIN, C. A.; MONTGOMERY, J. M. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 578-583, 1993.