

IRINA NASTASSJA RIEDIGER

**COMPARAÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS SOROLÓGICO E
MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE HUMANA NA REGIÃO
METROPOLITANA DE CURITIBA, PARANÁ.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2007

A minha mãe, Eliana, por incansavelmente me ensinar que aquilo que se sabe nunca se perde.

Ao meu amor, Carlos Caetano, por me mostrar que a felicidade está nas pequenas coisas.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo. Tenho certeza de que a colaboração de cada um foi imprescindível para a elaboração e execução bem sucedidas deste trabalho. Agradeço em especial:

A Deus, por me conceder a oportunidade de aprofundar meus estudos e me presentear com um projeto tão bonito. Por me fortalecer e estar ao meu lado, iluminando meu caminho, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, orientador desse trabalho, meu mais sincero respeito e admiração. Agradeço por confiar a mim esse projeto e por proporcionar, além de inestimável crescimento técnico e científico, uma visão social e integrativa da pesquisa e da Ciência.

A Equipe do Serviço de Epidemiologia do Hospital das Clínicas da UFPR, em especial a Dr^a. Suzana Dal Ri Moreira, pela confiança e preciosa colaboração na seleção de pacientes desde o princípio deste estudo.

Minha gratidão a Cláudia Helena Zen, Déborah Munhoz Buba e Helena Leiko Misugi, da Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, pela amizade e apoio irrestrito. A minha colega e amiga Sueli Massumi Nakatani pelo incentivo, pelas discussões técnico-científicas e pela generosidade em partilhar sua experiência.

A Irene Skraba e Didiane Tscha, da Seção de Virologia do LACEN-PR, minha gratidão pela doação das cepas, pelo acesso aos resultados dos testes ELISA e pelo espírito de cooperação sempre que precisei.

Meus agradecimentos à direção do Laboratório Central do Estado do Paraná, em especial a Dr^a. Célia Fagundes da Cruz e ao Dr. Marcelo Pilonetto, que viabilizaram a execução prática deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Helio Langoni (UNESP – Botucatu) e sua equipe, em especial a Leila Ullmann e Juliano Hoffmann, pela colaboração e pelo processamento dos testes de microaglutinação.

A Juliana, Jackeline, Ane, Catherine, Carolini e Elis pelo auxílio fundamental no processamento das amostras. A Fernanda Fortes, pelo esforço conjunto no levantamento de dados. A Marina Gonçalves, pela amizade, dedicação e ajuda providencial na organização e execução prática do estudo.

Ao Prof. Dr. Albert Ko e sua equipe (CPqGM – FIOCRUZ/BA), pelas sugestões e pela gentileza e prontidão no empréstimo da câmara de Petroff-Hausser.

A Yatiyo Moriya, da Seção de Imunologia do LACEN-PR, e a Anacleto Felini, da Seção de Virologia do LACEN-PR, pela seleção criteriosa das amostras positivas para controle patológico de hepatite A aguda e dengue.

A Celina de Oliveira Poersch, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), pela doação das amostras para controle patológico de dengue e acesso aos respectivos resultados de PCR.

A Prof^a. Dr^a. Claudia Nunes dos Santos, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP-FIOCRUZ/PR), e a Dr^a. Jaqueline Mendes de Oliveira, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ/RJ), pela cessão dos *primers* e acesso aos protocolos de

amplificação, o que possibilitou estudar molecularmente os grupos-controle patológicos de dengue e hepatite A.

A Maria Ângela Teixeira e Maria Luiza Gonçalves, do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pelo apoio técnico, receptividade e permissão para uso de equipamentos e instalações durante a fase inicial desse projeto.

A Dr^a. Noemi Farah Pereira, da Seção de Imunogenética do HC-UFPR, por seu exemplo, pelo estímulo e por despertar em mim a curiosidade científica.

A Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI-PR), pelo suporte financeiro.

A minha mãe, Eliana, pela dedicação, pelo incentivo para que eu retomasse os estudos e por estar sempre presente na minha vida.

Ao meu esposo, Carlos Caetano, pela compreensão nas horas de ausência, pelo apoio nas horas de cansaço, pelo incentivo nos momentos de dúvida, pela paciência nos momentos de crise e por sua admiração ao meu trabalho. Isso faz as dificuldades valerem à pena!

Aos meus amigos da Academia de Ballet Quebra-Nozes, em especial a Aline Miyazato, por me ensinar que com perseverança e paciência é possível superar os obstáculos mais difíceis.

Ao meu querido cão, Mignon, pela companhia e lealdade irrefutáveis, especialmente durante a redação desta dissertação.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco;
à medida que vamos adquirindo conhecimentos,
instala-se a dúvida.”
(Johann Goethe)

SUMÁRIO

RESUMO.....	XII
1 REVISÃO DE LITERATURA	2
1.1 BACTERIOLOGIA.....	3
1.2 PATOGÊNESE DA LEPTOSPIROSE.....	8
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS.....	15
1.4 EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE	18
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
2 OBJETIVOS.....	31
3 METODOLOGIAS	33
3.1 VALIDAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR.....	34
3.2 DEFINIÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DOS SISTEMAS DE PCR.....	37
3.3 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE PCR FRENTE À COLEÇÃO DE CEPAS	38
4 RESULTADOS.....	41
4.1 EVALUATION OF SERUM, PLASMA AND WHOLE BLOOD SPECIMENS FOR MOLECULAR DETECTION OF <i>Leptospira</i> spp.	42
4.2 USE OF A <i>secY</i> GENE FRAGMENT FOR MOLECULAR IDENTIFICATION OF <i>Leptospira</i> spp.....	55
4.3 USE OF URINE AND BLOOD SAMPLES FOR PCR DIAGNOSIS OF HUMAN LEPTOSPIROSIS	68
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÕES	95
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8 ANEXOS	110

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1	- SÉRIE HISTÓRICA DE CASOS DE LEPTOSPIROSE CONFIRMADOS E NOTIFICADOS NO SINAN.....	22
MAPA 1	- ESTADO DO PARANÁ DIVIDIDO EM REGIONAIS DE SAÚDE....	23
TABELA 2	- DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE LEPTOSPIROSE POR REGIONAL DE SAÚDE, 2000 A 2007*.....	23
FIGURA 1	- COMPARAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DOS SISTEMAS A/B E G1/G2.....	37
FIGURA 2	- AMPLIFICAÇÃO DE CEPAS-PADRÃO DE <i>Leptospira</i> spp PELOS CONJUNTOS DE INICIADORES A/B E G1/G2.....	39
TABELA 3	- CEPAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NO ESTUDO.....	40

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- por cento
°C	- Graus Celsius
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
CDME	- Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti
CIC	- Cidade Industrial de Curitiba
CN	- Controle negativo
CP	- Controle positivo
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleosídeo Trifosfatado
DO	- Densidade Ótica
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	- Abreviatura da expressão latina <i>et alii</i> , para demais colaboradores
fg	- Fentograma (10^{-15} g)
G	- Giros
GLP	- Glicolipoproteínas
HC-UFPR	- Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná
IgG	- Imunoglobulina G
IL	- Interleucina
IgM	- Imunoglobulina M
IFN- γ	- Interferon γ
Kb	- Kilobase
KCl	- Cloreto de Potássio
LACEN-PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
LPS	- Lipopolissacarídeos
MAT	- <i>Microscopic Agglutination Test</i>

Mb	- Megabases
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
MP	- Marcador de Massa Molecular
NaCl	- Cloreto de Sódio
ng	- Nanograma (10 ⁻⁹ g)
NK	- <i>Natural Killer Cell</i>
nm	- Nanômetro
Pb	- Pares de Bases
PBS	- Salina tamponada com fosfatos
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pg	- Picograma (10 ⁻¹² g)
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pmol	- Picomol
rpm	- Rotações por minuto
RNA	- Ácido Ribonucléico
SESA-PR	- Secretaria de Estado da Saúde, Paraná
TBE	- Tampão Tris-Borato-EDTA
Th1	- Linfócito T auxiliar 1
Th2	- Linfócito T auxiliar 2
TLR	- <i>Toll-like receptor</i>
TNF α	- Fator de Necrose Tumoral α
Tris	- Hidroximetilaminometano
U	- Unidade
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Radiação Ultravioleta
V	- Volt

- μg - Micrograma (10^{-6} g)
- μM - Micromolar

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que apresenta sintomas clínicos não-específicos, cujo diagnóstico definitivo depende de testes laboratoriais. Amostras de sangue total, plasma e soro contaminadas *in vitro* foram submetidas à PCR em sistemas *monoplex* e *duplex*, utilizando dois conjuntos de iniciadores previamente descritos (G1/G2 e A/B). Posteriormente, amostras clínicas de sangue e urina foram amplificadas com os mesmos iniciadores para o diagnóstico da leptospirose. Amplificações com os iniciadores G1/G2 apresentaram sensibilidade de 60,7% e especificidade de 65,8%, contra 7,1% e 94,7% obtidas com os iniciadores A/B. Sensibilidade e especificidade gerais da PCR foram 53,6% e 63,2%, respectivamente. Sessenta e seis amostras clínicas foram testadas por ELISA IgM, MAT e PCR de sangue e urina, acompanhadas de 15 amostras pareadas. A detecção do DNA das leptospirosas por PCR ocorreu a partir do primeiro dia de doença, enquanto a detecção dos anticorpos pelo MAT só foi possível a partir do quinto dia. Nossos resultados sugerem que amostras de sangue são mais apropriadas para a investigação clínica da leptospirose, frente a amostras de plasma ou soro. Essas amostras apresentaram limite mínimo de detecção de 5×10^3 , 5×10^4 e 5×10^6 células/ml, respectivamente. Apesar da amplificação parcial do gene *secY* ser utilizada para a detecção de leptospirosas patogênicas, o seqüenciamento desses produtos de PCR não permitiu a genotipagem da cepa infectante. A PCR foi menos sensível (53,6%) do que o ELISA IgM (85,7%) ao longo do curso da doença. Entretanto, a PCR realizada em amostras de sangue ou urina permitiu o diagnóstico precoce em 71,4% dos pacientes cuja soroconversão foi confirmada pelo MAT. Assim, a PCR constitui uma ferramenta complementar na primeira fase da doença, especialmente quando não é possível detectar anticorpos específicos pelas técnicas sorológicas, permitindo a confirmação precoce da infecção e o diagnóstico diferencial de outras doenças febris.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonosis of nonspecific clinical symptoms, which definitive diagnosis relies on laboratorial tests. Whole blood, plasma and serum samples *in vitro* contaminated were submitted to both monoplex and duplex PCR assays using previously described protocols (G1/G2 and A/B). Next, whole blood and urine clinical specimens were amplified with the same primers for diagnosis of leptospirosis. G1/G2-primed amplifications showed sensitivity of 60.7% and specificity of 65.8%, compared to 7.1% and 94.7% of the A/B-primed reactions. Overall PCR sensitivity and specificity was 53.6% and 63.2%, respectively. Sixty-six clinical samples tested by IgM ELISA, MAT and blood and urine PCR, along with 15 paired samples. PCR detection of leptospiral DNA occurred from the first day of illness, while antibodies detection by MAT was possible from the fifth day. Our results suggest that whole blood specimens are more appropriate for clinical investigation of leptospiremia, when compared to plasma or serum samples. Those samples had minimal detection limit of 5×10^3 , 5×10^4 e 5×10^6 cells/ml, respectively. Although PCR of *secY* gene fragment has been used for diagnosis of pathogenic leptospires, sequencing of respective amplicons does not allow genotyping of the infecting strain. PCR was less sensitive (53.6%) than IgM ELISA (85.7%) throughout the course of the disease. However, PCR performed on blood or urine samples permitted early diagnosis in 71.4% of patients whose seroconversion was confirmed by MAT. Thus, PCR constitutes a complementary tool in the first phase of the illness, especially when no specific antibodies can be detected by serological techniques, allowing early confirmation of the infection and differential diagnosis from other infectious febrile diseases.

INTRODUÇÃO

A presente dissertação de mestrado faz parte de projeto intitulado “Vigilância descentralizada da leptospirose humana e animal no Estado do Paraná”, aprovado junto à Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia e Ensino Superior (SETI-PR) segundo edital CP 01/2004 e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O referido projeto objetivou: a descentralização do diagnóstico sorológico da leptospirose por ELISA (IgM) no Estado do Paraná a partir da capacitação de laboratórios em núcleos macro-regionais estratégicos; o desenvolvimento, validação e implantação no LACEN-PR de metodologias moleculares para uso complementar ao MAT e ELISA IgM no diagnóstico da leptospirose humana e animal. Ainda, o projeto teve por objetivo a consolidação do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) como laboratório de referência para o diagnóstico confirmatório da leptospirose humana na região Sul do Brasil.

O presente estudo de mestrado foi desenvolvido no Setor de Biologia Molecular do LACEN-PR e incluiu a seleção, otimização e validação de um método molecular para o diagnóstico precoce da leptospirose humana. Durante o período do estudo, foram avaliados os casos suspeitos de leptospirose atendidos pela equipe médica do Hospital de Clínicas da UFPR, mediante seleção do Serviço de Epidemiologia do mesmo hospital.

Pretende-se, com a análise, discussão e divulgação científica dos resultados dessa dissertação, o desenvolvimento de um programa de capacitação e atualização das equipes médicas e de vigilância epidemiológica das Regionais de Saúde quanto à solicitação, interpretação e limitações dos testes sorológicos e moleculares para o diagnóstico da leptospirose humana.

Os resultados obtidos estão descritos nessa dissertação em formato de publicação e enquadrados no capítulo “Resultados”. Essa iniciativa visa acelerar a divulgação científica dos dados encontrados e permitir que o Comitê de Avaliação contribua com críticas e sugestões tanto à forma quanto ao conteúdo dos trabalhos propostos.

1 REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma antropozoonose de distribuição mundial (ROMERO *et al.*, 2003), com importância epidemiológica nos contextos urbano e rural, em países de clima tropical e temperado (MERIEN *et al.*, 1992; EDWARDS *et al.*, 1986). Exibe evidente caráter sazonal, que coincide com o período chuvoso do ano (PAPPACHAN *et al.*, 2005). A ocorrência da leptospirose está intimamente relacionada à situação sócio-econômica e sanitária da população, apresentando, portanto, incidências distintas entre as diferentes classes sociais. Enquanto nos países desenvolvidos a leptospirose é considerada uma patologia reemergente (MEITES *et al.*, 2004) e ocupacional, a mesma constitui um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, como o Brasil, que carecem da estrutura sanitária básica (McBRIDE *et al.*, 2005).

1.1 BACTERIOLOGIA

1.1.1 Taxonomia

A leptospirose é causada por bactérias da ordem *Spirochetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Anteriormente a 1989, esse gênero era dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que compreendia todas as cepas patogênicas; e *Leptospira biflexa*, que compreendia as cepas saprofíticas isoladas do ambiente. As duas espécies eram diferenciadas pela capacidade de crescimento a 13°C na presença de 8-azaguanina e pela incapacidade da *L. biflexa* formar células esféricas em NaCl 1 M (LEVETT, 2001; JOHNSON & HARRIS, 1967).

L. interrogans e *L. biflexa* foram divididas em inúmeros sorovares, definidos com base em diferenças e similaridades antigênicas no teste de absorção de aglutinação cruzada. Sorovares com similaridades antigênicas foram agrupados em sorogrupos, de modo que há mais de 250 sorovares patogênicos descritos, distribuídos em 25 sorogrupos. Algumas vezes, cepas diferentes, apresentando pequenas diferenças antigênicas, são classificadas como pertencentes ao mesmo sorovar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Em virtude de estudos de variabilidade genética, a classificação fenotípica das leptospirosas tem gradativamente dado lugar à classificação genotípica, na qual

várias espécies de leptospiros, além de *L. interrogans* e *L. biflexa*, foram estabelecidas com bases moleculares (YASUDA *et al.*, 1987). Genomoespécies são definidas como um grupo de sorovares de *Leptospiraceae* cujo DNA é relacionado em 70% ou mais a uma temperatura ótima de associação de 55°C, é relacionado em 60% ou mais a uma temperatura estrigente de anelamento de 70°C, e em que o DNA relacionado contém 5% ou menos de divergência de bases (KAUFMANN *et al.*, 2006). A classificação genotípica das espécies não coincide com a classificação fenotípica, de modo que sorovares patogênicos e saprofíticos podem ser descritos na mesma genomoespécie. Portanto, a classificação fenotípica em sorogrupos e sorovares não é capaz de prever a espécie genotípica da cepa bacteriana. Além disso, as características fenotípicas usadas para diferenciar *L. interrogans sensu lato* de *L. biflexa sensu lato* não diferenciam as espécies na classificação genotípica (LEVETT, 2001).

A reclassificação das leptospiros com base no genótipo é taxonomicamente correta. Entretanto, gera confusão para os microbiologistas e clínicos, que estão habituados ao sistema fenotípico corrente de classificação em sorogrupos e sorovares. A existência de *L. interrogans* e *L. biflexa* como espécies *sensu stricto* no sistema de classificação genotípica gera ainda mais equívocos de nomenclatura. É importante que a classificação empregada esteja de acordo com a metodologia utilizada: nomenclatura fenotípica para classificação sorológica; nomenclatura genotípica para classificação molecular. Atualmente, estão descritas 16 genomoespécies de leptospiros, além de mais uma genomoespécie proposta (KAUFMANN *et al.*, 2006).

1.1.2 Microbiologia

As leptospiros são espiroquetas altamente espiraladas, medindo de 6 a 20 µm de comprimento e cerca de 0,1 µm de diâmetro. As células têm extremidades pontiagudas que, diferentemente de outros espiroquetas, apresentam forma de gancho. Dois filamentos axiais (flagelos periplásmicos) com inserções polares estão localizados no espaço periplásmico (WOLGEMUTH *et al.*, 2006; LEVETT, 2001). A forma helicóide cilíndrica e a movimentação dos dois flagelos periplásmicos permitem que as bactérias penetrem ativamente nos tecidos do hospedeiro através

do movimento de saca-rolhas (BINDER *et al.*, 1998). Todas as leptospiras patogênicas apresentam, como os demais espiroquetas, uma arquitetura de membrana distinta. Essa estrutura apresenta similaridades tanto com bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Assim como nas primeiras, a membrana interna (citoplasmática) é intimamente relacionada à parede celular de peptidoglicanos. Já a membrana externa fornece proteção para alguns antígenos, como o endoflagelo, em relação ao ambiente externo. Entretanto, a membrana externa dos espiroquetas parece ser fluida e lábil, em comparação com a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Paralelamente, a membrana externa das leptospiras e demais espiroquetas parece ter baixa densidade de proteínas transmembrana e grande quantidade de lipoproteínas (HAAKE & MATSUNAGA, 2005). Os LPS da parede celular das leptospiras possuem composição química e características tintoriais similares aos das bactérias gram-negativas, mas apresentam atividade endotóxica menor. As leptospiras são bactérias microaerofílicas e apresentam crescimento ótimo entre 28 e 30°C, produzindo catalase e oxidase. Crescem em meio simples suplementado com vitaminas (B₂ e B₁₂), ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio. Ácidos graxos são utilizados como fonte primária de carbono e metabolizados por β -oxidação (LEVETT, 2001).

1.1.3 Genômica

Até o momento, foram seqüenciados os genomas de dois agentes causadores de leptospirose: *L. interrogans* sorovar Lai cepa 56601 (REN *et al.*, 2003) e *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (NASCIMENTO *et al.*, 2004a). Os dados obtidos revelaram que o genoma das leptospiras está distribuído em dois cromossomos circulares: CI, com aproximadamente 4,3 Mb, e CII, com cerca de 350 kb (NASCIMENTO *et al.*, 2004b). Apesar da maioria dos genes relacionados ao crescimento e à viabilidade estarem localizados no cromossomo CI, muitos genes essenciais, como NADH desidrogenase e aqueles relacionados à biossíntese do heme, estão situados no cromossomo CII. Isso leva a crer que o cromossomo CII é parte integrante do genoma e que não se originou de transferência lateral (REN *et al.*, 2003).

Os genes rRNA não estão organizados em *operons*, como na maioria das bactérias, mas sim distribuídos ao longo do cromossomo CI. Ambos os genomas revelaram número muito pequeno de cópias dos genes *rrf*, *rrs* e *rrl*, que codificam as subunidades ribossômicas 5S, 16S e 23S, respectivamente (NASCIMENTO *et al.*, 2004a). Esse achado pode explicar parcialmente o crescimento fastidioso das leptospiros (REN *et al.*, 2003).

A análise comparativa dos dois genomas revelou a presença da via de β oxidação completa, bem como dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e da via glicolítica - com exceção da hexoquinase (NASCIMENTO *et al.*, 2004b; REN *et al.*, 2003). Também foi evidenciado que o mecanismo de importação de glicose envolve simporte glicose-sódio dependente de gradiente de sódio através da membrana bacteriana, ao contrário de outras bactérias que importam açúcares através de fosfotransferases de membrana. Portanto, a incapacidade em utilizar glicose como fonte de carbono pode ser em parte explicada pela dificuldade em importar essa molécula do meio (NASCIMENTO *et al.*, 2004b).

Genes relacionados à cadeia respiratória estão presentes, confirmando o caráter aeróbio obrigatório dos organismos desse gênero. A síntese de ATP é realizada por uma ATPase de membrana similar à da maioria das eubactérias, mas com organização diferente das de outros espiroquetas, como *Borrelia burgdorferi* e *Treponema pallidum* (WENHAI *et al.*, 2004). Esses fatos são compatíveis com a noção de que esses organismos geram ATP através de fosforilação oxidativa (REN *et al.*, 2003).

A habilidade em tolerar a radiação UV, à qual as leptospiros estão constantemente expostas durante o estágio de vida livre de seu ciclo de vida, é facilitada pela presença de um conjunto completo de proteínas de reparo do DNA por excisão de bases, bem como fotoliasas e enzimas relacionadas ao reparo de bases alquiladas (NASCIMENTO *et al.*, 2004b).

O ciclo de vida da *Leptospira* requer a capacidade de responder a um repertório amplo de condições ambientais. Assim, os mecanismos de transdução de sinais são mediados por ao menos 79 genes que codificam componentes de vias de transdução de sinal mediadas por fosforilação (NASCIMENTO *et al.*, 2004b).

Os mecanismos de virulência das leptospiros patogênicas, como motilidade e resposta quimiotática, permitem a penetração nos tecidos dos hospedeiros durante

a infecção. Ambos os genomas contêm ao menos 50 genes relacionados à motilidade e o aparato de quimiotaxia parece ser mais complexo do que o de outros espiroquetas (NASCIMENTO *et al.*, 2004b; REN *et al.*, 2003).

Os LPS de membrana distinguem a superfície das leptospiplas de outras bactérias da ordem *Spirochetales*. Mudanças nos genes envolvidos no aparato de biossíntese de LPS – principalmente nas cadeias laterais de carboidratos. Essa flexibilidade pode ser um mecanismo de adaptação a novas espécies de hospedeiros, além de estar envolvida na diversidade de sorovares patogênicos. Como os dois genomas seqüenciados pertencem ao mesmo sorogrupo (*Icterohaemorrhagiae*), genes relacionados à síntese da cadeia principal dos LPS mostram pequena divergência (NASCIMENTO *et al.*, 2004b).

Leptospiplas patogênicas requerem vários tipos de proteínas de superfície com o intuito de colonizar e sobreviver no mamífero hospedeiro. As proteínas de superfície podem ser classificadas como porinas não-específicas, canais específicos para aquisição de nutrientes, canais de efluxo, lipoproteínas, adesinas, glicoproteínas, proteínas periféricas e proteínas de manutenção. Com exceção das glicoproteínas e proteínas periféricas, as demais proteínas de superfície possuem domínios transmembrana. A análise do genoma de uma cepa do sorovar Copenhageni revelou 83 proteínas de membrana externa em arranjo β pregueado, distribuídas entre as classificações citadas anteriormente (NASCIMENTO *et al.*, 2004b). A colonização dos tecidos, essencial para o estabelecimento da doença, pode ser mediada por adesinas. As leptospiplas parecem expressar dois tipos de adesinas: integrinas e proteínas contendo domínios do tipo Big - *Bacterial Immunoglobulin-Like* (NASCIMENTO *et al.*, 2004b). Esses domínios estão envolvidos nos processos de adesão e invasão das células hospedeiras em *Yersinia pseudotuberculosis* e *Escherichia coli*. Uma nova família de proteínas contendo domínios Big foi descrita em leptospiplas patogênicas e chamada de Lig – *Leptospiral Immunoglobulin-Like*. A perda das proteínas Lig e da expressão de seus transcritos de RNA foi correlacionada com a perda de virulência em cepas patogênicas (MATSUNAGA *et al.*, 2003). Ao contrário do que ocorre com os LPS, acredita-se que as proteínas de membrana sejam altamente conservadas e por esse motivo há grande interesse nessas moléculas para o desenvolvimento de testes sorológicos mais precisos e vacinas mais efetivas (HAAKE & MATSUNAGA, 2005).

A disseminação pelos órgãos do hospedeiro é provavelmente o resultado da translocação rápida através das monocamadas celulares, que pode ser mediada pela secreção de enzimas capazes de destruir as membranas das células do hospedeiro. Estão presentes em ambos os genomas genes relacionados à síntese de hemolisinas (como esfingomielinase C), fosfolipase D e proteases (incluindo colagenase, metaloprotease e termolisina), que tanto podem ser transportadas para a membrana celular como lipoproteínas quanto podem ser secretadas para o meio extracelular (REN *et al.*, 2003). O sorovar Lai codifica ainda três proteínas que possuem grande homologia com proteínas animais relacionadas à homeostase, não descritas em nenhuma outra espécie bacteriana. É possível que os danos ao epitélio mediados pela colagenase durante a infecção e os efeitos subseqüentes das demais proteínas e fatores bacterianos possam levar à perda da homeostase, em adição aos efeitos propostos para os LPS. Esse modelo é consistente com as manifestações clínicas da leptospirose, principalmente o dano às membranas das células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos (REN *et al.*, 2003).

1.2 PATOGÊNESE DA LEPTOSPIROSE

A infecção por *Leptospira* spp. pode acometer diversas espécies de mamíferos, entre elas o homem. Os animais contaminados – incluindo o homem – podem ser divididos em hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais. A patologia se mantém na natureza pela infecção crônica e endêmica dos túbulos renais dos hospedeiros de manutenção, com os quais as bactérias mantêm uma relação comensal. O hospedeiro de manutenção é uma espécie em que a infecção é endêmica e normalmente transmitida entre os animais por contato direto. Espécies distintas de roedores podem ser hospedeiras de manutenção de diferentes sorovares dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum. Animais domésticos e de produção também podem ser hospedeiros de manutenção: bovinos podem alojar os sorovares Hardjo, Pomona e Grippotyphosa; suínos podem albergar os sorovares Pomona e Bratislava; ovinos podem alojar Hardjo e Pomona; e cães podem abrigar o sorovar Canicola (LEVETT, 2001).

A especificidade dos LPS de membrana em relação ao hospedeiro de manutenção pode ser uma estratégia de evasão imune que permite ao espiroqueta

persistir nos rins do animal durante toda a sua vida sem, no entanto, desencadear uma resposta inflamatória. A habilidade das leptospiras em persistir nos túbulos renais dos mamíferos reflete uma forma altamente evoluída de parasitismo e sugere uma relação ancestral entre o mamífero e a leptospira nele residente (HAAKE & MATSUNAGA, 2005). Essas infecções são normalmente assintomáticas ou subclínicas. Animais de outras espécies podem ser contaminados pelo contato com a urina do hospedeiro de manutenção, tornando-se então hospedeiros acidentais. Essas infecções são normalmente sintomáticas, visto que não há relação comensal entre a bactéria e seu hospedeiro acidental, o que estimula resposta inflamatória (LEVETT, 2001).

1.2.1 Fisiopatologia

A transmissão da leptospirose ocorre pelo contato direto ou indireto com o material biológico de um animal contaminado – especialmente de roedores. As principais formas de contaminação estão relacionadas ao contato ocupacional (BACTERIÓL *et al.*, 2005; BELMACHER *et al.*, 2004; NATARAJASEENIVASAN *et al.*, 2002; CAMPAGNOLO *et al.*, 2000; HERNANDEZ *et al.*, 1999. MOLL van CHARANTE *et al.*, 1998), recreacional (BOLAND *et al.*, 2004; GROBUSH *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2002) ou acidental (AOKI *et al.*, 2001), direto ou indireto, com a urina de animais infectados.

Através da secreção de enzimas líticas (como a colagenase) e do movimento ativo de saca-rolhas, as leptospiras penetram ativamente no organismo do hospedeiro através de cortes ou abrasões na pele, através das mucosas, inclusive conjuntiva, ou ativamente através da pele íntegra após imersão prolongada em água contaminada. Os locais invadidos propiciam uma localização segura para a multiplicação bacteriana e sua manutenção e eliminação intermitente do organismo do hospedeiro, garantindo assim a perpetuação do ciclo zoonótico na natureza (LEVETT, 2001).

A penetração ativa das leptospiras patogênicas pode ser direcionada por quimiotaxia, o que raramente acontece nas cepas saprofíticas (YURI *et al.*, 1993). Além disso, foi demonstrado que a transição das leptospiras patogênicas do ambiente para o organismo do hospedeiro é sinalizada, entre outros fatores, pela

osmolaridade fisiológica. A migração de um ambiente de baixa osmolaridade (fora do hospedeiro) para um ambiente de osmolaridade maior (dentro do organismo do hospedeiro) induz um aumento da expressão das proteínas de membrana externa LigA e LigB (MATSUNAGA *et al.*, 2007), fato diretamente relacionado a um aumento na adesão das leptospiros a proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno, laminina, fibronectina e fibrinogênio. A adesão de LigA e LigB a múltiplos ligantes presentes em diferentes tecidos sugere que essas proteínas podem estar envolvidas nos estágios de colonização inicial e disseminação da leptospirose (CHOY *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2006). As leptospiros são capazes de aderir a diferentes tipos celulares. A aderência envolve as duas extremidades celulares da bactéria, ao contrário do que ocorre com *Treponema pallidum*, que só adere às células através de uma das extremidades. Também foram encontradas bactérias localizando-se no interior do citoplasma das células hospedeiras em experimentos *in vitro* (THOMAS & HIGBIE, 1990). Apesar disso, não foram encontradas evidências de multiplicação intracitoplasmática bacteriana ou qualquer perturbação às estruturas celulares citoesqueléticas ou de membrana. Isso sugere que as leptospiros são bactérias invasivas, mas não intracelulares facultativas. O caráter invasivo é um fator de virulência importante, visto que permite às bactérias atravessar rapidamente monocamadas celulares através da translocação celular, o que as protege do ataque de células do sistema imunológico e facilita a entrada e saída da corrente sanguínea para infectar órgãos-alvo, como rins (BAROCCHI *et al.*, 2002).

A caracterização e comparação dos proteomas de membrana externa de leptospiros expressos em cultivo *in vitro* e durante o processo patológico apontam um aumento significativo na expressão das proteínas de membrana Loa22 e LipL32, contra uma diminuição na expressão das demais proteínas hidrofóbicas (NALLY *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstram que um mutante exibindo inserção do *transposon* no gene *loa22* se tornou avirulento em um modelo animal, através de estudos utilizando mutagênese randômica por *transposon*. A posterior complementação da cepa *loa22*⁻ por inserção cromossômica do gene *loa22* mostrou que a perda da virulência era decorrente da inativação do *loa22* e não de um sítio secundário de mutação. Esses resultados demonstram que a proteína Loa22 é

essencial para o processo de infecção *in vivo* por leptospiras patogênicas (RISTOW *et al.*, 2007).

As lesões tissulares encontradas na leptospirose são caracterizadas pela ocorrência de danos celulares importantes, mesmo na presença de poucos microorganismos, sugerindo o envolvimento de fatores tóxicos do hospedeiro e do espiroqueta, associada ao fenômeno de aderência das bactérias às células (DIAMENT *et al.*, 2002). Os peptidoglicanos das leptospiras patogênicas estão entre as moléculas que podem ativar diretamente as células vasculares endoteliais por aumentar sua adesão a neutrófilos, e podem estar envolvidos no mecanismo de inflamação local e sistêmica na leptospirose (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007).

Durante a infecção, a lise das leptospiras mediada pela resposta imune do hospedeiro libera GLP citoplasmáticas. Entre os vários antígenos isolados de leptospiras, a fração de ácidos graxos insaturados não-esterificados (ácidos oléico, linoléico, palmítico, palmitoléico e mirístico) das endotoxinas do tipo GLP extraídos de leptospiras patogênicas induzem ativação de células polimorfonucleadas, com liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e interleucinas (BURTH *et al.*, 2005; DORIGATTI *et al.*, 2005; DIAMENT *et al.*, 2002). Os ácidos graxos não-esterificados ligam-se à albumina para o transporte pela corrente sangüínea, o que neutraliza seus efeitos citotóxicos. Entretanto, na presença de grandes quantidades dessas moléculas os sítios de ligação da albumina são saturados. Essa saturação pode ser devida tanto ao aumento da quantidade de ácidos graxos circulantes quanto à presença de bilirrubina, que compete pelos mesmos sítios de ligação à albumina. Sabe-se que um dos mecanismos responsáveis pela citotoxicidade dos ácidos graxos não-esterificados é a alteração da fluidez de membrana e a conseqüente interferência na atividade de diversos mecanismos de transporte transmembrana, incluindo o transporte ativo de Na⁺ e K⁺. O comprometimento do transporte transmembrana desses íons em células alveolares pode ter papel crucial no desenvolvimento de edema pulmonar, através de perturbações à atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (BURTH *et al.*, 2005). Foi demonstrado que uma fração de GLP extraída de leptospiras patogênicas inibe seletivamente várias isoformas de Na⁺,K⁺-ATPase. Postulou-se que a quantidade de GLP gerada a partir das bactérias encontradas em infecções *in vivo* é suficiente para inibir completamente a isoforma renal (YOUNES-IBRAHIM *et al.*, 1997). Apesar de essa situação ser extrema, uma

inibição parcial seria suficiente para induzir alterações patológicas. A comparação interespecies mostrou que tanto isoformas de Na^+, K^+ -ATPase de espécies suscetíveis quanto de espécies resistentes à doença são sensíveis à inibição por GLP. Isso sugere que a resistência de uma espécie à doença não resulta da resistência das suas células à ação das GLP, mas sim da quantidade de toxina liberada a nível tissular, que varia com o grau de colonização dos tecidos, que por sua vez depende de respostas imunológicas espécie-específicas. A avaliação desses achados sugere que as inibições celulares induzidas pela inibição da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos infectados pode ser responsável por vários sintomas, em particular aqueles associados a desordens eletrolíticas, como distúrbios eletrolíticos renais, arritmia cardíaca e diarreia. Dependendo do grau de intensidade da inibição enzimática, os sintomas podem variar de disfunções metabólicas discretas à falência de órgãos (YOUNES-IBRAHIM *et al.*, 1997).

Acredita-se que a hemorragia pulmonar causada pelas leptospiros seja desencadeada por vasculite capilar associada a toxinas. O tecido pulmonar de pacientes com leptospirose usualmente apresenta contagem de organismos menor do que o tecido renal ou hepático, sugerindo que as anormalidades pulmonares podem ser devidas à exposição a toxinas circulantes produzidas pelo patógeno em sítios distantes como fígado (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007). O estudo do tecido pulmonar de pacientes que foram a óbito por leptospirose mostrou edema dos septos intra-alveolares; infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, linfócitos e plasmócitos; tumefação endotelial e hemorragia alveolar. Não foram encontradas evidências de formação de trombos ou de coagulação intravascular disseminada. Antígenos de leptospiros foram detectados por imunohistoquímica na superfície luminal do endotélio e no citoplasma das células endoteliais. Apesar de a quantificação não correlacionar com a intensidade das lesões, é possível que a detecção de leptospiros intactas e material antigênico granular nas células endoteliais indique que a pneumopatia seja desencadeada diretamente pelas leptospiros ou por seus produtos tóxicos (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007). A reprodução do padrão de infecção humano em primatas, utilizando cepas isoladas de pacientes com quadro pulmonar severo mostrou hemorragia intra-alveolar com infiltrado inflamatório intersticial. Esse é um achado morfológico peculiar que parece ser produzido por uma resposta inflamatória intensa com extravasamento de eritrócitos

para o exterior dos capilares. Entretanto, ressalta-se que esses dados não são encontrados em outras síndromes de fragilidade capilar que progridem para síndrome angústica respiratória aguda, como dengue hemorrágica ou síndrome pulmonar da hantavirose. A presença de material antigênico foi encontrada no parênquima pulmonar, intimamente associada com áreas de alteração histológica (PEREIRA *et al.*, 2005).

A relação entre o sorovar infectante e as manifestações clínicas ainda não está bem caracterizada, mas há evidências de que a sintomatologia e sua intensidade possam estar relacionadas ao sorovar infectante (GOLDSTEIN *et al.*, 2006).

1.2.2 Resposta imune à infecção

O sistema imune dos mamíferos consiste de imunidade inata e adaptativa. O sistema imune adaptativo é mediado por células T antígeno-específicas e por células B. O sistema imune inato é filogeneticamente conservado e é o primeiro a ser ativado na defesa do hospedeiro contra microorganismos patogênicos. Recentemente, surgiu grande interesse na imunidade inata com a descoberta de receptores de patógenos codificados por linhagens germinativas, chamados *Toll-like receptors* (SHRÖPPEL & HE, 2006). Parece que os TLR controlam a ativação da resposta imune adaptativa. Esses receptores reconhecem especificamente padrões moleculares associados a patógenos e expressos pelos agentes infecciosos, como componentes microbianos exógenos como LPS (TLR4), lipoproteínas e peptidoglicanos (TLR1, -2, -6), RNA viral (TLR3), dinucleotídeos guanosina-citosina não-metilados de origem bacteriana ou viral (TLR9) e moléculas endógenas como proteína do choque térmico e moléculas da matriz extracelular. Quando esses receptores são estimulados, a sinalização mediada pelos TLR ativa vias de transdução de sinal (fator nuclear κ B, fator nuclear p38, IL-6, fator regulatório de interferon), que induzem a expressão de citocinas, quimiocinas e proteínas celulares de membrana relacionadas à resposta inflamatória (SHRÖPPEL & HE, 2006). As leptospiros são capazes de ativar macrófagos através de interações dos LPS com CD14, receptor que reconhece vários antígenos bacterianos, e TLR2. Comprovou-se que os macrófagos ativados produzem IL-12, a citocina mais potente em induzir a

produção de IFN- γ . O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória pluripotente produzida principalmente por células T ativadas e células NK e desempenha um papel central na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares. A IL-12 liberada pelos macrófagos estimula a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ , o que sugere a indução de resposta imune celular (de FOST *et al.*, 2003). Apesar das leptospirosas serem consideradas organismos extracelulares, o IFN- γ pode contribuir para a imunidade contra essas bactérias por ativar macrófagos e promover a produção de IgG2. Enquanto IgG1 e IgG2 agem como opsoninas, aumentando potencialmente o número de leptospirosas fagocitadas, somente IgG1 é capaz de fixar complemento – o que pode ser um importante mecanismo efetor para o controle da leptospirose (NAIMAN *et al.*, 2002).

TLR são diferencialmente expressos em leucócitos e células não-imunes e parecem regular aspectos importantes da resposta imune inata e adaptativa. Células epiteliais tubulares estão entre as células não-imunes que expressam TLR, sugerindo que esses receptores podem contribuir para a ativação da resposta imune em caso de dano túbulo-intersticial. A ativação dos TLR pode ser crucial no desenvolvimento de quadros como choque séptico, síndromes com resposta inflamatória sistêmica e resposta imune local, pois induz a maturação de células dendríticas e ativação de macrófagos tissulares. A ativação dos macrófagos promove secreção local de citocinas e quimiocinas e contribui para a inflamação local e acumulação linfocitária. Já a maturação das células dendríticas leva à migração celular do sítio danificado para os linfonodos regionais para apresentar antígenos e sinais pró-inflamatórios a células T, o que é um pré-requisito para o estabelecimento da resposta imune adaptativa (ANDERS *et al.*, 2004).

Experimentos *in vitro* mostram que a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias por células epiteliais túbulo-proximais, induzida por proteínas de membrana extraídas de leptospirosas patogênicas, é mediada por TLR2. Esses resultados implicam a participação crucial da imunidade inata (via TLR2) na patogênese da nefrite túbulo-intersticial induzida por leptospirosas (HUNG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006).

A segunda fase da leptospirose aguda é chamada de fase imune, na qual o desaparecimento dos organismos da corrente sanguínea coincide com o aparecimento de anticorpos circulantes. Foi demonstrado que os principais

antígenos das leptospiras reconhecidos pela resposta imune humoral humana incluem LipL32 (principal lipoproteína de membrana), LipL41 e proteínas de choque térmico obtidas da fração citoplasmática das bactérias, como GroEL e DnaK (GUERREIRO *et al.*, 2001). Foi proposto que a imunidade protetora e a hipersensibilidade patológica sejam fatores a influenciar a gravidade dos sintomas e há indícios de que a severidade da doença de Weil possa estar associada à intensidade da resposta imune humoral contra as leptospiras (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A leptospirose está associada com uma grande variedade de manifestações clínicas, que podem variar desde infecções subclínicas até óbito por hemorragia pulmonar (DOUDIER *et al.*, 2006).

1.3.1 Leptospirose anictérica

A maior parte dos casos de infecção por leptospiras em humanos é subclínica ou com sintomatologia muito branda (FAUCHER *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2003). Nesses casos o paciente raramente procura atendimento médico e estima-se que haja subnotificação dessa patologia (McBRIDE *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2003). Uma proporção menor de pacientes (casos confirmados) apresenta uma síndrome anictérica febril de instalação súbita, cujos principais sintomas são febre, calafrios, mialgias, cefaléia, dores abdominais, dores retro-orbitais, fotofobia, alterações conjuntivais e rash cutâneo, podendo ocorrer também encefalite, miosite e pneumonite (LEVETT, 2001). Como a sintomatologia é inespecífica, deve-se proceder ao diagnóstico diferencial com infecção por vírus influenza (ALEXANDER *et al.*, 1963), HIV (HUDSON *et al.*, 1997), dengue (LEVETT, 2001; KEE *et al.*, 1994; RAMACHANDRAN *et al.*, 1973), hantavirose (SPICHLER *et al.*, 2005; ANTONIADIS *et al.*, 1995), febre amarela (BINDER *et al.*, 1998) e algumas infecções bacterianas, como brucelose e rickettsiose (SLACK *et al.*, 2007). A taxa de mortalidade é baixa e os sintomas normalmente desaparecem em uma semana, coincidindo com a soroconversão (FAUCHER *et al.*, 2004).

1.3.2 Leptospirose ictérica

Cerca de 10% dos casos de leptospirose se apresentam como uma síndrome ictérica febril - Síndrome de Weil, cuja evolução clínica é rápida e progressiva (LEVETT, 2001). As complicações clínicas dessa forma de manifestação enfatizam o caráter multisistêmico da doença (LEVETT, 2001). Alguns sintomas associados à Síndrome de Weil são febre, icterícia (MORGAN *et al.*, 2002), insuficiência renal aguda (ABDULKADER, 1997; MERIEN *et al.*, 1995; EDWARDS *et al.*, 1988), trombocitopenia ou pancitopenia (STEFOS *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2003; MERIEN *et al.*, 1992; EDWARDS *et al.*, 1982), comprometimento pulmonar (SPICHLER *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 1998; SEHGAL *et al.*, 1995; IM *et al.*, 1989; TURNER, 1970), alterações cardíacas (KEE *et al.*, 1994) e comprometimento ocular (RATHINAM, 2005). A taxa de mortalidade nesses casos varia de 15 a 40%. Os principais fatores de risco envolvidos com o prognóstico e a evolução clínica dos pacientes são hipotensão, oligúria e anormalidades à auscultação cardíaca (DOUDIER *et al.*, 2006).

A icterícia típica da Síndrome de Weil é devida a níveis séricos de bilirrubina bastante elevados (EDWARDS *et al.*, 1990), mas não está associada à necrose hepatocelular (RAMOS-MORALES *et al.*, 1959). Simultaneamente, ocorre elevação moderada nos níveis séricos de transaminases e fosfatase alcalina. A bilirrubinemia sérica costuma ser desproporcionalmente alta quando comparada às outras provas de função hepática (AHMAD *et al.*, 2005).

A leptospirose severa causa uma forma única de insuficiência renal aguda não-oligúrica e hipocalêmica, caracterizada por nefrite túbulo-intersticial, incluindo edema intersticial e infiltrados celulares na área túbulo-intersticial (YANG *et al.*, 2001). Paralelamente ao caráter invasivo das leptospirosas, vários componentes bacterianos como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e proteínas da membrana externa – principalmente glicolipoproteínas – podem levar a um aumento da atividade monocitária através da interação com receptores celulares, especialmente do tipo CD. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e interleucinas, são liberadas e induzem um processo inflamatório através da geração de vários mediadores vasoativos e inflamatórios e moléculas de adesão. Tanto a resposta de linfócitos Th1 quanto de Th2 são envolvidas, resultando em nefropatia imuno-mediada. A

estimulação da expressão de TNF α leva à ativação do fator nuclear kB, que é responsável pela patogênese da glomerulonefrite e da nefrite túbulo-intersticial (VISITH & KEARKIAT, 2005). As principais características desses quadros são redução da reabsorção proximal e aumento da excreção distal de sódio, além de perda de potássio (SEGURO *et al.*, 1990; WINEARLS *et al.*, 1984).

1.3.3 Outras manifestações clínicas

A trombocitopenia ocorre em mais de 50% dos casos e está relacionada ao desenvolvimento de falência renal aguda (STEFOS *et al.*, 2005; EDWARDS *et al.*, 1982). Os principais mecanismos de patogênese envolvem o consumo de plaquetas devido a um possível quadro de destruição imuno-mediada. Além disso, pode ocorrer redução na síntese de plaquetas pelos megacariócitos da medula óssea, independentemente da instalação do quadro de coagulação intravascular disseminada (STEFOS *et al.*, 2005).

Os quadros de meningite e meningoencefalite associados à leptospirose são caracterizados por meningite asséptica (ROMERO *et al.*, 1998). A pressão liquórica apresenta-se normal ou levemente aumentada, com predomínio de infiltrado linfocitário. A quantidade de proteínas pode ser normal ou levemente aumentada, enquanto o nível de glicose liquórica normalmente é normal. Em pacientes com icterícia severa, pode ocorrer xantocromia (AHMAD *et al.*, 2005).

A incidência do envolvimento pulmonar na leptospirose tem crescido nos últimos anos e pode ocorrer nas formas ictéricas e anictéricas da doença. A hemorragia alveolar se apresenta com tosse, dispnéia e hemoptise, com hemorragia pulmonar de intensidade suficiente para levar à morte (IM *et al.*, 1989). Ao raio-X de tórax, achados como infiltrado alveolar bilateral, consolidação e efusão pleural podem ser observados mesmo quando a sintomatologia pulmonar é discreta (MÁRQUEZ-MARTÍN *et al.*, 2006; SPICHLER *et al.*, 2006; KARANDE *et al.*, 2005; ZAKI *et al.*, 1996). A forma pulmonar severa é a manifestação clínica mais grave da leptospirose. Os sintomas pulmonares normalmente surgem entre o quarto e o sexto dia de doença e podem levar à morte em menos de 72 horas, com taxa de mortalidade de até 60%. Três variáveis foram independentemente associadas à

mortalidade: instabilidade hemodinâmica, creatinina sérica superior a 265,2 μM e potássio sérico superior a 4,0 mM (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007).

1.3.4 Manejo terapêutico

O tratamento depende da severidade e duração dos sintomas. Normalmente a antibioticoterapia é baseada em penicilina G (WATT *et al.*, 1988) ou doxiciclina (McCLAIN *et al.*, 1984) e demonstrou reduzir a severidade e duração dos sintomas (McBRIDE *et al.*, 2005; EDWARDS *et al.*, 2004). Outro benefício é a prevenção da leptospirúria ou redução do seu tempo de duração (McBRIDE *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2003; BINDER *et al.*, 1998; EDWARDS *et al.*, 1988). Pacientes que apresentam a forma severa da doença necessitam de reposição hidro-eletrolítica agressiva a fim de prevenir ou reverter a instalação do quadro inicial de insuficiência renal aguda. Os pacientes que, apesar desses esforços, desenvolvem insuficiência renal, necessitam de diálise peritoneal ou hemodiálise. As manifestações clínicas de comprometimento pulmonar devem ser tratadas com uso de oxigenação e, em casos mais severos, de ventilação com pressão positiva (EDWARDS & LEVETT, 2004).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE

1.4.1 Epidemiologia no contexto mundial

A leptospirose é uma antropozoonose com incidência mundial e afeta tanto a população urbana quanto arural em países com clima tropical (ROMERO *et al.*, 2003; KO *et al.*, 1999), subtropical (MEITES *et al.*, 2004) ou temperado (JANSEN *et al.*, 2005). Essa patologia exhibe claro caráter sazonal em regiões tropicais, em que o período chuvoso do ano é marcado por altas temperaturas (McBRIDE *et al.*, 2005; PAPACHAN *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2003). A leptospirose está descrita nos cinco continentes (FERRO *et al.*, 2006; SAMBASIVA *et al.*, 2003; SEIJO *et al.*, 2002; KO *et al.*, 1999).

Em virtude de sua relação com a condição sanitária, a globalização e a desigualdade social produziram padrões epidemiológicos diferentes entre as classes

sociais (McBRIDE *et al.*, 2005). Tradicionalmente reconhecida nos países desenvolvidos como doença ocupacional (CAMPAGNOLO *et al.*, 2000; HERNANDÉZ *et al.*, 1999), hoje a leptospirose é cada vez mais associada a atividades recreacionais (NAKAMURA *et al.*, 2006), eventos esportivos (BOLAND *et al.*, 2004; MORGAN *et al.*, 2002), viagens e turismo de aventura (GROBUSH *et al.*, 2003; SEJVAR *et al.*, 2003), sendo também descrita como patologia reemergente (MEITES *et al.*, 2004). Já nos países em desenvolvimento, a epidemiologia da leptospirose está intimamente relacionada às condições sócio-econômicas da população (ROMERO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). O crescimento da população urbana sem acesso à estrutura sanitária básica – água tratada e encanada, rede de coleta e tratamento de esgoto, coleta de lixo doméstico, políticas governamentais para controle de zoonoses - produziu condições ecológicas ideais para a infecção a partir de roedores, favorecendo a instalação de um quadro endêmico em países como o Brasil (McBRIDE *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003, KO *et al.*, 1999).

1.4.2 Epidemiologia no contexto nacional

O Brasil sofreu uma transformação demográfica intensa no período entre as décadas de 60 e 90 devido ao processo de migração interna. Esse fenômeno levou a um aumento de cerca de 350% na população urbana. Uma das conseqüências dessa mudança foi o estabelecimento de favelas urbanas, nas quais a ausência de serviços sanitários básicos levou à instalação de um quadro ecológico que favoreceu a transmissão da leptospirose mediada por roedores (McBRIDE *et al.*, 2005; KO *et al.*, 1999). Possivelmente, o aspecto demográfico pode ser uma das explicações para que, apesar de a patologia ser descrita em todo o território nacional, haja maior prevalência nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste, respectivamente. Além disso, estima-se que o número de casos clínicos seja superior devido principalmente à falta de diagnóstico conclusivo e à subnotificação (McBRIDE *et al.*, 2005). Em 2006, foram confirmados 3.823 casos de leptospirose no Brasil.

O perfil epidemiológico da população afetada no Brasil consiste de adultos jovens, do sexo masculino, residentes em áreas urbanas e contaminados a partir de exposição ocupacional (GONÇALVES *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2005; ROMERO *et*

al., 2003; KO *et al.*, 1999). No Brasil, acredita-se que a maioria dos casos urbanos seja devida à infecção por cepas do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (ROMERO *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2000; KO *et al.*, 1999), o que fortalece o papel do rato doméstico como principal reservatório, uma vez que *Rattus rattus* e *R. norvegicus* são os carreadores mais comuns desse sorogrupo (KO *et al.*, 1999).

1.4.3 Epidemiologia no Estado do Paraná

Em 2006, foram confirmados 1.045 casos de leptospirose na região Sul, dos quais 218 ocorreram no Estado do Paraná (BRASIL, 2006). A taxa de mortalidade acumulada no Estado nos últimos seis anos é de 12,5%, sendo significativamente maior do que a dos demais Estados da região Sul (Santa Catarina acumula 5,8% e Rio Grande do Sul acumula 6,3%).

Os municípios do Estado do Paraná foram distribuídos em 22 Regionais de Saúde. Há grande discrepância entre o número de casos de leptospirose notificados por cada Regional. Dentre os casos notificados em 2006, 48% são relativos à 2ª Regional de Saúde, que atende Curitiba e região metropolitana (SESA-PR, 2005).

Em 1995, devido a um aumento mundial no número de casos de doenças emergentes e reemergentes, vários países propuseram à Organização Mundial da Saúde (OMS) a revisão do sistema de notificação existente, com base em agravos, para um sistema de notificação sindrômico. Esse conceito surge de um grupo de doenças com semelhanças de sinais e sintomas e que se apresentam dentro de um contexto epidemiológico. A vigilância sindrômica é uma estratégia de vigilância epidemiológica que se baseia na detecção de um conjunto de manifestações clínicas comuns a um grupo de doenças, visando captar o maior número de casos, contribuindo para a adesão precoce e precisa de medidas de controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

No Brasil, em meados de 2002, se iniciou a implantação do sistema de Vigilância Epidemiológica das Síndromes Febris Íctero-Hemorrágicas Agudas (VE-SFIHA) em três municípios do Estado do Amazonas. Um passo muito importante para alcançar os objetivos propostos por esse modelo de vigilância foi o fortalecimento dos laboratórios de saúde pública, com a formação de uma rede de laboratórios de vigilância que cooperam entre si e trabalham de forma integrada.

Este esforço colaborativo teve muitas dimensões, cujo denominador comum foi o conceito de prática em uma rede funcional. Os resultados obtidos no Amazonas e emergências epidemiológicas em outros Estados fizeram com que o processo de implantação da VE-SFIHA fosse desencadeado no Rio Grande do Sul e Tocantins (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

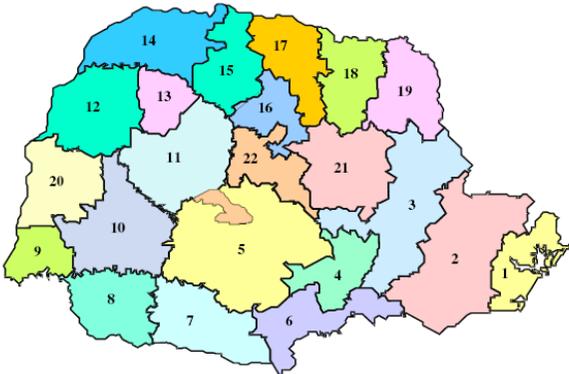
A Vigilância Sindrômica das Síndromes Íctero-Febris Agudas (VS-SIFA) foi implantada no Paraná em maio de 2000, tornando o Estado a primeira Unidade da Federação a implantar esse modelo de vigilância epidemiológica. A VS-SIFA integra a investigação dos agentes etiológicos das hepatites virais, leptospirose, malária por *Plasmodium falciparum* e febre amarela, utilizando um modelo baseado no sistema de investigação de hepatites virais, implantado no Paraná em 1993. Para tal, foi necessária uma ampla discussão e integração dos diversos departamentos envolvidos na Secretaria de Estado da Saúde (SESA-PR, 2001). Considera-se como caso todo indivíduo com início agudo de icterícia e febre, sem outro diagnóstico clínico confirmado. A notificação é feita a partir da primeira suspeita diagnóstica. Em caso de exame negativo e confirmação de outro diagnóstico, descarta-se a primeira notificação e notifica-se a doença confirmada. É realizada a investigação laboratorial sistemática do agente etiológico, de forma seqüencial a partir da primeira suspeita. A pesquisa seqüencial das hepatites virais e da leptospirose é realizada automaticamente em todos os casos de síndrome íctero-febril aguda, considerando sempre a principal suspeita diagnóstica. A pesquisa dos agentes dos demais agravos incluídos na VS-SIFA - malária e febre amarela - leva sempre em consideração os aspectos epidemiológicos (SESA-PR, 2001).

TABELA 1 - SÉRIE HISTÓRICA DE CASOS DE LEPTOSPIROSE CONFIRMADOS E NOTIFICADOS NO SINAN

		2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Região Norte	Rondônia	2	4	1	2	3	8	20
	Acre	8	18	15	4	20	466	531
	Amazonas	28	25	27	34	43	55	212
	Roraima	0	0	0	0	0	2	2
	Para	102	166	109	157	162	69	765
	Amapá	0	14	92	26	44	80	256
	Tocantins	2	0	4	0	6	1	13
Região Nordeste	Maranhão	32	27	20	25	14	33	151
	Piauí	1	0	0	0	0	4	5
	Ceara	53	44	85	103	62	84	431
	Rio Grande do Norte	8	10	9	12	5	7	51
	Paraíba	2	18	21	44	17	15	117
	Pernambuco	326	310	203	374	338	183	1734
	Alagoas	71	81	47	98	71	77	445
	Sergipe	50	23	12	26	32	39	182
Bahia	113	121	120	129	211	144	838	
Região Sudeste	Minas Gerais	35	38	163	83	93	53	465
	Espírito Santo	104	39	27	219	178	274	841
	Rio de Janeiro	268	206	242	289	307	206	1518
	São Paulo	782	634	562	727	776	919	4400
Região Sul	Paraná	186	249	315	205	341	218	1514
	Santa Catarina	328	194	309	302	406	319	1858
	Rio Grande do Sul	1133	458	571	166	344	508	3180
Região Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	8	5	9	4	15	10	51
	Mato Grosso	0	8	3	12	10	10	43
	Goiás	2	4	3	6	3	5	23
	Distrito Federal	33	20	39	49	38	34	213
Total		3677	2716	3008	3096	3539	3823	19859

Fonte: Ministério da Saúde / SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)

MAPA 1 - ESTADO DO PARANÁ DIVIDIDO EM REGIONAIS DE SAÚDE



Fonte: Secretaria de Estado da Saúde (SESA-PR)

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE LEPTOSPIROSE POR REGIONAL DE SAÚDE, 2000 A 2007*

		2000 – 2007*
1ª R. S.	Paranaguá	98
2ª R. S.	Curitiba	1084
3ª R. S.	Ponta Grossa	49
4ª R. S.	Irati	12
5ª R. S.	Guarapuava	27
6ª R. S.	União da Vitória	5
7ª R. S.	Pato Branco	16
8ª R. S.	Francisco Beltrão	26
9ª R. S.	Foz do Iguaçu	31
10ª R. S.	Cascavel	55
11ª R. S.	Campo Mourão	16
12ª R. S.	Umuarama	5
13ª R. S.	Cianorte	7
14ª R. S.	Paranavaí	7
15ª R. S.	Maringá	63
16ª R. S.	Apucarana	52
17ª R. S.	Londrina	63
18ª R. S.	Cornélio Procópio	37
19ª R. S.	Jacarezinho	22
20ª R. S.	Toledo	26
21ª R. S.	Telêmaco Borba	19
22ª R. S.	Ivaiporã	12

* dados parciais
 Fonte: Secretaria de Estado da Saúde (SESA-PR)

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial consiste de ensaios sorológicos baseados em reações imunológicas ou demonstração de antígenos do agente; demonstração microbiológica do agente etiológico ou pesquisa molecular do material genético bacteriano.

1.5.1 Métodos sorológicos

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por métodos sorológicos. Os anticorpos são detectáveis no soro em aproximadamente sete dias após o início dos sintomas. Os métodos sorológicos podem ser divididos em dois grupos: gênero-específicos e sorogrupo-específicos (LEVETT, 2001).

O MAT é o teste de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose (FAUCHER *et al.*, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; KO *et al.*, 1999; BINDER *et al.*, 1998). A base diagnóstica do MAT é formada pela reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno-O dos LPS de membrana das leptospiros. Nesse ensaio, uma diluição seriada 1:2 do soro do paciente (enquanto houver positividade) reage com suspensões dos antígenos vivos de uma bateria de sorovares de *Leptospira* spp. Em seguida, as reações são examinadas microscopicamente em campo escuro para determinação do título da aglutinação, que ocorre em virtude da presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. no soro do paciente. O MAT é capaz de fornecer resultados sorogrupo-específicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). O MAT é um teste indireto, não sendo capaz de diferenciar infecções ativas de inativas. Pode ser bastante difícil interpretar os resultados em pacientes que foram previamente vacinados, infectados ou são originários de áreas endêmicas (LUCCHESI *et al.*, 2004; BAJANI *et al.*, 2002). Outra desvantagem importante é que o resultado fornecido pelo MAT pode depender da avaliação do aumento do título de reatividade, o que requer a análise de pelo menos duas amostras pareadas, colhidas com intervalo de 15 dias. Isso faz com que os resultados do MAT não sejam gerados de maneira rápida o suficiente para permitir o diagnóstico precoce da infecção (BAJANI *et al.*, 2003; KEE *et al.*, 1994). O MAT é

um teste complexo em relação à execução, controle de qualidade e interpretação (TURNER, 1970). É necessário manter uma coleção de culturas vivas de leptospiros, subcultivadas semanalmente. Desse modo, é necessário checar periodicamente cada uma das cepas para contaminação cruzada. Caso não se adote um sistema de controle da qualidade, o risco de ocorrência de resultados falsos é grande (CHAPPEL *et al.*, 2004). Além disso, o resultado do teste também pode ser afetado pela qualidade do meio de cultura utilizado e pela experiência do técnico operador (LEVETT, 2001).

O método de ELISA IgM é utilizado como teste de triagem devido à combinação de sensibilidade, especificidade, rapidez, capacidade de processamento e facilidade na execução. Com a aplicação dessa técnica ao diagnóstico da leptospirose, tornou-se possível pesquisar anticorpos da classe IgM. Durante o curso da doença, esses anticorpos são detectáveis no soro humano em torno de sete dias após a instalação dos sintomas. Este ensaio consiste na reação de soros humanos com antígenos solúveis e purificados de leptospiros obtidos a partir de cultura *in vitro* e previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas. Caso as amostras contenham anticorpos direcionados contra as leptospiros, estes se ligarão aos antígenos adsorvidos na fase sólida (BRASIL, 2005). Apesar de ser bastante empregado para o diagnóstico da leptospirose, o teste ELISA IgM apresenta sensibilidade e especificidade menores quando comparado com o MAT, especialmente na avaliação de amostras obtidas na primeira semana após o início dos sintomas e em amostras de indivíduos provenientes de áreas endêmicas (BLACKSELL *et al.*, 2006). Além disso, é necessário levar em consideração que anticorpos anti-leptospiros da classe IgM podem ser detectados no soro dos pacientes durante anos após a infecção (McBRIDE *et al.*, 2007; ABDULKADER *et al.*, 2002). Estudos mostram que, em comparação com outros testes sorológicos, o teste ELISA IgM apresenta melhor desempenho quando avaliadas sensibilidade e especificidade para amostras coletadas na segunda semana após a instalação da sintomatologia (EFFLER *et al.*, 2002). A avaliação de um ensaio desse tipo utilizado pelos Laboratórios de Saúde Pública do Brasil mostra que o teste apresenta especificidade satisfatória e que a sensibilidade aumenta significativamente quando da análise de amostras obtidas na fase convalescente da patologia. Esses dados

sugerem que essa ferramenta diagnóstica é útil no processo de vigilância da leptospirose urbana no Brasil (McBRIDE *et al.*, 2007).

Com o intuito de desenvolver novos testes diagnósticos com alta sensibilidade na fase aguda da patologia, tem-se focado primariamente na detecção de anticorpos IgM a partir da ligação a preparações de antígenos celulares. A molécula imunodominante nessas preparações parece ser um antígeno amplamente reativo que possui um epítipo dissacarídeo presente tanto em leptospiros não-patogênicas quanto em outras espécies bacterianas outras que não *Leptospira* spp. Testes sorológicos baseados em antígenos recombinantes podem alcançar sensibilidade e especificidade mais altas em virtude da maior concentração de antígenos imunoreativos e da ausência das moléculas inespecíficas presentes nas preparações celulares (NEVES *et al.*, 2007; FLANNERY *et al.*, 2001). Portanto, o antígeno ideal seria um alvo principal na resposta imune do hospedeiro, expresso somente pelas cepas patogênicas de *Leptospira* spp. e conservado entre os mais de 200 sorovares associados à doença humana em diferentes regiões geográficas e situações epidemiológicas. Já o teste ideal deveria ser capaz de discriminar entre a leptospirose e um amplo espectro de doenças agudas febris com apresentações clínicas semelhantes (FLANNERY *et al.*, 2001). Estudo recente mostra que imunoensaios utilizando a proteína recombinante Lig como antígeno para pesquisa de anticorpos anti-LigB IgM apresentam melhor performance em comparação aos testes que utilizam antígenos celulares totais no que tange à sensibilidade e especificidade (CRODA *et al.*, 2007). Além disso, esse teste permite diferenciar resposta imune à infecção recente daquela remanescente de uma infecção anterior, o que é essencial em áreas endêmicas e de alta transmissão.

O ensaio de hemaglutinação indireta utiliza células recobertas com antígenos de *Leptospira* spp. para a pesquisa de anticorpos anti-leptospira. A presença de anticorpos específicos leva à hemaglutinação celular, cuja leitura é realizada em microplacas com fundo em U. Esse método mostrou-se pouco sensível para a análise de amostras obtidas nas duas primeiras semanas após o desenvolvimento dos sintomas. A análise de amostras obtidas após esse período levou a um aumento da sensibilidade. A sensibilidade dessa técnica é relacionada com os critérios utilizados para definição dos casos positivos e depende diretamente do sorogrupo infectante. Como esse teste é disponível comercialmente, nem sempre os antígenos

fixados às células correspondem às cepas circulantes num determinado local, o que pode levar a resultados falso-negativos (EFFLER *et al.*, 2000).

Os ensaios do tipo *dipstick* consistem de uma versão simplificada do teste ELISA IgM, em que um antígeno de *Leptospira* spp. amplamente reativo é fixado a um suporte sólido e colocado em contato com amostras de soro. A revelação é feita utilizando um conjugado anti-IgM estabilizado e corado como sistema sinal, ao invés do sistema de detecção enzimático utilizado no ELISA IgM. Estudos mostram concordância entre a sensibilidade e a especificidade obtidas para o teste *dipstick* e ELISA IgM (SMITS *et al.*, 1999; GUSSENHOVEN *et al.*, 1997). As vantagens dessa técnica incluem sua independência em relação a aparato laboratorial e refrigeração dos insumos, podendo inclusive ser realizado em campo. Além disso, utiliza pequeno volume de amostra e fornece resultados em cerca de três horas (SMITS *et al.*, 1999).

O método de imunocromatografia por fluxo lateral (*lateral-flow*) consiste de uma tira de nitrocelulose que possui em uma extremidade o conjugado anti-IgM humana marcado com ouro e na outra extremidade um *pad* de absorção. O antígeno de *Leptospira* spp. é depositado na forma de uma linha na fita de nitrocelulose. A extremidade contendo o conjugado é colocada em contato com o soro do paciente. Quando há presença de anticorpos da classe IgM na amostra, os mesmos se ligam aos antígenos e são revelados pela ligação do conjugado marcado (SMITS *et al.*, 2001). Estudos demonstram que esse método apresenta boa correlação tanto com o teste *dipstick* quanto com ELISA IgM, uma vez que os três são baseados no mesmo princípio metodológico. A maior vantagem dessa técnica é a simplicidade para a execução, uma vez que os insumos não requerem refrigeração e a execução da técnica dispensa o uso de aparato laboratorial, utilizando pequeno volume de amostra. Além disso, o *lateral-flow* fornece resultados em apenas 15 minutos, podendo ser utilizado a campo ou mesmo dentro das unidades hospitalares como teste rápido para triagem (SEHGAL *et al.*, 2003; SMITS *et al.*, 2001).

O teste de imunofluorescência direta poder ser utilizado para a pesquisa de antígenos de *Leptospira* spp. em amostras clínicas, sendo especialmente útil para avaliação de produtos de biópsia obtidas *post mortem* antes da soroconversão. Para tanto, incuba-se o corte histológico frente a um *pool* de antisoros marcados com fluoresceína. Em seguida, procede-se a leitura em microscópio de fluorescência.

Estudos mostram que, apesar de ser mais sensível do que o cultivo, essa técnica não apresenta sensibilidade satisfatória. Isso se deve, entre outros fatores, à pequena quantidade de leptospiras presente nos tecidos, falta de uniformidade nos cortes histológicos ou perda de integridade dos antígenos durante o processamento das amostras (BROWN *et al.*, 2003).

O teste de imunofluorescência indireta pode ser utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-leptospira no soro de pacientes. Para isso, testa-se o soro diluído seriadamente contra antígenos de *Leptospira* spp. previamente fixados a lâminas de microscopia. Adiciona-se então um conjugado anti-imunoglobulina humana titulado e procede-se a leitura em microscópio de fluorescência. A classe de imunoglobulinas a ser pesquisada depende da especificidade do conjugado utilizado – anti-IgM ou anti-IgG. Estudos mostram que essa técnica apresenta sensibilidade e especificidade satisfatórias quando comparadas com o MAT. A especificidade depende diretamente do antígeno de *Leptospira* spp. utilizado no ensaio. Esse método apresenta riscos de infecção ocupacional reduzidos em comparação ao MAT, uma vez que é possível utilizar cepas não-patogênicas como antígeno fixado (AGUDELO-FLÓREZ *et al.*, 2006).

1.5.2 Métodos microbiológicos

Dentre os métodos microbiológicos utilizados está a pesquisa de leptospiras por microscopia em campo escuro. Apesar de ser tradicionalmente relacionada ao diagnóstico da leptospirose e à detecção da leptospirúria, essa técnica apresenta sensibilidade e especificidade muito baixas. Além disso, a interpretação do exame é subjetiva e dependente da experiência do observador, o que em muitos casos pode levar a diagnósticos equivocados na presença de estruturas como fibras têxteis e extrusões celulares (CHANDRASEKARAN & GOMATHI, 2004).

Outro método microbiológico associado ao diagnóstico de pacientes com leptospirose é o cultivo da bactéria. O meio de Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris (EMJH) é o meio de cultura mais utilizado para o crescimento de leptospiras (ELLINGHAUSEN & McCULLOUGH, 1965). Apesar de o isolamento permitir o diagnóstico direto, o crescimento das leptospiras é lento e as culturas devem ser mantidas por até 12 semanas antes de serem descartadas como negativas.

Subcultivos puros em meio líquido normalmente apresentam crescimento em 10 a 14 dias. Apesar de apresentar alta especificidade, esse método é pouco usado para fins diagnósticos devido à baixa sensibilidade e ao longo período necessário para o crescimento bacteriano. Como o tempo necessário para a liberação de um resultado pode chegar a três meses, a cultura é usada como método confirmatório, associada ao ELISA e ao MAT. Entretanto, o isolamento das bactérias tem importância fundamental nas investigações epidemiológicas, sendo pré-requisito essencial para a identificação da cepa envolvida em surtos ou epidemias, ou mesmo circulante em determinada área geográfica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

1.5.3 Métodos moleculares

As ferramentas de biologia molecular têm-se destacado em virtude das dificuldades e limitações técnicas dos métodos sorológicos e microbiológicos empregados no diagnóstico da leptospirose. Os métodos moleculares são reconhecidamente específicos, já que é possível estudar seletivamente uma região do genoma exclusiva de determinado organismo. A sensibilidade é assegurada pelo emprego da PCR, uma poderosa ferramenta molecular capaz de amplificar seqüencial e exponencialmente a região genômica de interesse. As técnicas moleculares têm sido empregadas com sucesso em várias áreas, sendo especialmente úteis no diagnóstico de patologias infecciosas causadas por bactérias de crescimento lento ou não-cultiváveis, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (EISENACH, 1990), *Mycobacterium leprae* (MARTINEZ *et al.*, 2006) e *Treponema pallidum* (WENHAI *et al.*, 2004). Além disso, as técnicas moleculares permitem o estudo e detecção dos patógenos em vários materiais biológicos, como sangue total (FONSECA *et al.*, 2006), soro (MERIEN *et al.*, 1992; GRAVEKAMP *et al.*, 1993), urina (LUCCHESI *et al.*, 2004; BAL *et al.*, 1994; VAN EYS *et al.*, 1989), líquido (ROMERO *et al.*, 1998), sêmen (HEINEMAN *et al.*, 2000), produtos de biópsia (MARTINEZ *et al.*, 2006), entre outros.

O método de PCR é uma ferramenta sensível e específica no diagnóstico da leptospirose, quando comparada com os métodos microbiológicos convencionais quanto à análise de sangue total (KOSITANONT *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2006; MERIEN *et al.*, 1992), soro (GRAVEKAMP *et al.*, 1993), urina (LUCCHESI *et al.*,

2004; BAL *et al.*, 1994; MERIEN *et al.*, 1992; VAN EYS *et al.*, 1989) e líquor (ROMERO *et al.*, 1998). Além disso, a PCR é tecnicamente mais simples do que o MAT, o que viabiliza sua implantação em um número maior de laboratórios. Alguns sistemas moleculares são sensíveis o suficiente para detectar uma cópia do genoma de leptospira por mililitro de amostra (BAL *et al.*, 1994; GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*, 1992), mas a maioria dos sistemas apresenta sensibilidade em torno de 10 a 100 cópias do genoma de leptospiros por mililitro de amostra (KEE *et al.*, 1994; FONSECA *et al.*, 2006). Em alguns casos, a PCR é usada em associação com técnicas de hibridização pós-PCR, o que aumenta a sensibilidade do sistema (GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*, 1992; FONSECA *et al.*, 2006). Na presença de quantidade neste nível de grandeza, as técnicas até hoje utilizadas, entre elas a pesquisa em campo escuro e a cultura, podem não ser capazes de detectar os agentes infecciosos. Alguns estudos demonstram que, por serem capazes de detectar a doença em estágios distintos, os métodos sorológicos e moleculares podem fornecer resultados discordantes, porém complementares (KOSITANONT *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2006; OOTEMAN *et al.*, 2006; BAL *et al.*, 1994; KEE *et al.*, 1994). As limitações inerentes aos métodos moleculares incluem alto custo dos equipamentos e insumos, imprescindível adequação física para áreas pré e pós-amplificação e necessidade de mão-de-obra qualificada. Por fim, a avaliação das variáveis tempo, sensibilidade, especificidade e custo-benefício mostra que a PCR é um método bastante atraente e promissor quando destinado ao diagnóstico precoce da leptospirose (FONSECA *et al.*, 2006; OOTEMAN *et al.*, 2006; VAN EYS *et al.*, 1989).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O diagnóstico precoce da leptospirose humana é crucial para a intervenção terapêutica apropriada e prevenção da instalação de formas sintomatológicas graves como insuficiência renal aguda e comprometimento pulmonar. No Brasil, a maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por métodos sorológicos, principalmente por testes ELISA IgM. Entretanto, anticorpos da classe IgM são detectáveis no soro somente cerca de sete dias após o início dos sintomas. Consequentemente, os testes sorológicos apresentam sensibilidade e especificidade baixas durante a primeira semana de sintomatologia, estando sujeitos a fornecer resultados falso-negativos. Apesar de técnicas moleculares como PCR serem empregadas com sucesso para o diagnóstico precoce da leptospirose, há poucos estudos comparativos entre as metodologias descritas na literatura. Também permanece incerto qual o período pós-infecção necessário para que essas metodologias forneçam resultados informativos. Do mesmo modo, não está clara qual a amostra clínica mais adequada para utilização nesses ensaios. Com a elucidação dessas questões, seria possível tirar máximo proveito da tecnologia molecular, oferecendo um teste com altas sensibilidade e especificidade, utilizando DNA obtido da melhor amostra clínica possível, colhida no período clínico mais adequado. Esses avanços trariam benefícios como maior confiabilidade e clareza na interpretação dos resultados obtidos e racionalização do uso do teste molecular.

Desse modo, o objetivo geral desse estudo foi avaliar o diagnóstico molecular como ferramenta auxiliar aos testes sorológicos (MAT e ELISA IgM) no diagnóstico da leptospirose humana em pacientes da região metropolitana de Curitiba.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1. Determinar a melhor amostra sanguínea para a pesquisa da leptospiremia humana por métodos moleculares.
2. Comparar os resultados dos sistemas de PCR com os resultados dos métodos sorológicos – ELISA IgM e MAT - em casos clínicos de leptospirose em pacientes humanos.
3. Comparar o desempenho de dois sistemas de PCR entre si na detecção de *Leptospira* spp. em amostras de sangue total e urina humanas para verificar a sensibilidade e a especificidade de cada sistema molecular usando MAT como padrão-ouro.

Os experimentos a seguir, embora não constituam contribuição à literatura científica, foram fundamentais para a validação e otimização das metodologias empregadas nesse estudo.

3.1 VALIDAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR

3.1.1 Extração do DNA das amostras clínicas

Para a extração do DNA, 200 µl de amostra biológica (sangue total, soro ou plasma) foram aplicados a uma coluna de captura do kit de extração *GENERATION Capture Column Kit* (GENTRA SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA). Após incubação por 45 minutos a temperatura ambiente, deu-se prosseguimento à técnica seguindo as instruções do fabricante. A DNA foi eluído em 100 µl do Tampão de Eluição. As amostras de DNA foram identificadas numericamente, de forma seqüencial, sem menção ao nome ou situação sorológica dos indivíduos.

3.1.2 Seleção dos sistemas de PCR e otimização dos parâmetros de amplificação

Para amplificação do DNA das amostras clínicas foram avaliados dois sistemas de reação diferentes previamente descritos na literatura. O primeiro utiliza iniciadores capazes de amplificar um fragmento do gene *rrs* 16S do genoma de *Leptospira* spp. (MERIEN *et al.*, 1992). O segundo sistema utiliza iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene *secY* do genoma das espécies patogênicas de *Leptospira* spp., exceto *L. kirschneri* (GRAVEKAMP *et al.*, 1993).

Ambos os sistemas de PCR selecionados foram submetidos a uma etapa de otimização para confirmação da concentração ótima de MgCl₂ e da temperatura ideal de anelamento dos iniciadores. Para tanto, foram preparadas três misturas de reação com concentrações de MgCl₂ de 1,5; 2,0 e 2,5 mM, cada uma em quantidade suficiente para amplificação de 12 replicatas de uma mesma amostra de DNA (cultivo de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA). As 36 replicatas foram submetidas à ciclagem padrão (GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*,

1992) com gradiente de temperatura de 12 pontos (temperatura de anelamento descrita para os iniciadores $\pm 5^{\circ}\text{C}$) em termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany). Após análise eletroforética dos resultados (ver item 3.1.2), os parâmetros com melhor desempenho foram selecionados para amplificação das amostras clínicas, como segue.

Os iniciadores utilizados na reação de amplificação parcial do gene *rrs* 16S tinham as seguintes seqüências nucleotídicas: A - 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3'; B - 5' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 3'. O DNA extraído de todas as amostras clínicas foi amplificado conforme protocolo de PCR descrito anteriormente (MERIEN *et al.*, 1992), com algumas modificações.

A amplificação do DNA foi realizada num volume final de 50 μl . A mistura de reação consistiu de 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 2 mM de MgCl_2 , 1 μM de cada iniciador (A e B), 200 μM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para 45 μl . A seguir foram adicionados 5 μl de DNA extraído.

Para a reação de PCR foi utilizado um termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O primeiro ciclo de amplificação consistiu de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento dos iniciadores a 61°C por 1min30s e extensão a 72°C por 2 minutos. Os 29 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 61°C por 1min30s e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma etapa final de 10 minutos a 72°C conferiu extensão completa aos iniciadores. Essa reação gerou produtos de PCR de 331 pb.

Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle negativo de amplificação (5 μl de água ultrapura) e um controle positivo de amplificação (5 μl de DNA de *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA).

Os iniciadores utilizados na reação de amplificação parcial do gene *secY* tinham as seguintes seqüências nucleotídicas: G1 - 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3'; G2 - 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3'. O DNA extraído de todas as amostras clínicas foi amplificado conforme protocolo de PCR descrito anteriormente (GRAVEKAMP *et al.*, 1993), com algumas modificações.

A amplificação do DNA foi realizada num volume final de 50 μl . A mistura de reação consistiu de 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM de MgCl_2 , 1

μM de cada iniciador (G1 e G2), 200 μM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para 45 μl . A seguir foram adicionados 5 μl de DNA extraído.

Para a reação de PCR foi utilizado um termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O primeiro ciclo consistiu de desnaturação a 94°C por 5 minutos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os 34 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a 94°C por 1min30s, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma etapa final de 10 minutos a 72°C conferiu extensão completa aos iniciadores. Essa reação gerou produtos de PCR de 285 pb.

Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle negativo de amplificação (5 μl de água ultrapura) e um controle positivo de amplificação (5 μl de DNA de *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA).

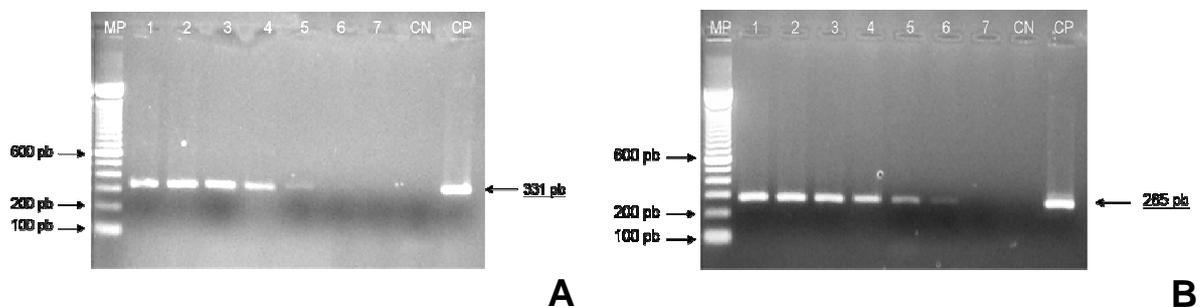
3.1.3 Eletroforese dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos (15 μl) e 6 ng de marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foram aplicados em gel de agarose tipo II eletroendosmose 0.09-0.13 mr (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 1,5% impregnado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$), utilizando 2,5 μl de *Blue Loading Buffer* para o carregamento. Os produtos foram então separados por eletroforese horizontal usando TBE 1X como tampão de corrida, sob 160 V por 45 minutos. Em seguida, o gel de agarose foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador para revelação dos fragmentos separados e comparação do tamanho dos fragmentos do produto da PCR com aqueles gerados pelo marcador de peso molecular. O gel foi fotografado e a imagem foi digitalizada em sistema de foto-documentação *Kodak Digital Science – Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak, Rochester, NY, USA). A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na identificação visual das bandas no gel de agarose. O observador ignorava a identificação e a situação sorológica das amostras avaliadas em cada gel.

3.2 DEFINIÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DOS SISTEMAS DE PCR

Para verificar o limite de detecção dos sistemas de PCR em estudo, o número de células bacterianas (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20) foi determinado utilizando uma câmara de contagem de Petroff-Hausser (Hausser Cientific, Horsham, PA, USA). As bactérias foram cultivadas em meio Fletcher líquido, incubadas a 28°C por seis dias. O caldo de cultura foi diluído 1:10 em PBS 1X (pH 7,2) e 5 µl foram adicionados à câmara de contagem. Após 15 minutos, as células foram observadas em microscopia em campo escuro e o número de células foi determinado conforme preconizado pelo fabricante do citômetro. Em seguida, a concentração foi ajustada com PBS 1X (pH 7,2) para 5×10^7 células/ml, com subsequente diluição 1:10 em PBS 1X até a concentração final de 5×10^1 células/ml. O DNA de uma alíquota de 500 µl de cada diluição foi extraído por exposição a 94°C por 10 minutos. O DNA foi então amplificado conforme descrito no item 3.1.1 e submetido à eletroforese conforme item 3.1.2.

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DOS SISTEMAS A/B E G1/G2



Limite mínimo de detecção dos conjuntos de iniciadores A/B (A) e G1/G2 (B). Poços 1 a 7: *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 em diluição seriada 1:10 partindo de 5×10^7 células/ml até 5×10^1 células/ml. MP: marcador de peso molecular de 100 pb. CN: controle negativo. CP: controle positivo.

Os resultados demonstraram que o limite de detecção teórico é de 25 células ou 5×10^2 células/ml (cerca de 250 fg) para o sistema A/B e de 2,5 células ou 5×10 células/ml (cerca de 25 fg) para o sistema G1/G2.

3.3 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE PCR FRENTE À COLEÇÃO DE CEPAS-PADRÃO

Após seleção e otimização dos sistemas de PCR a serem utilizados, os mesmos foram avaliados frente ao painel de cepas-padrão mantido no laboratório para execução do MAT.

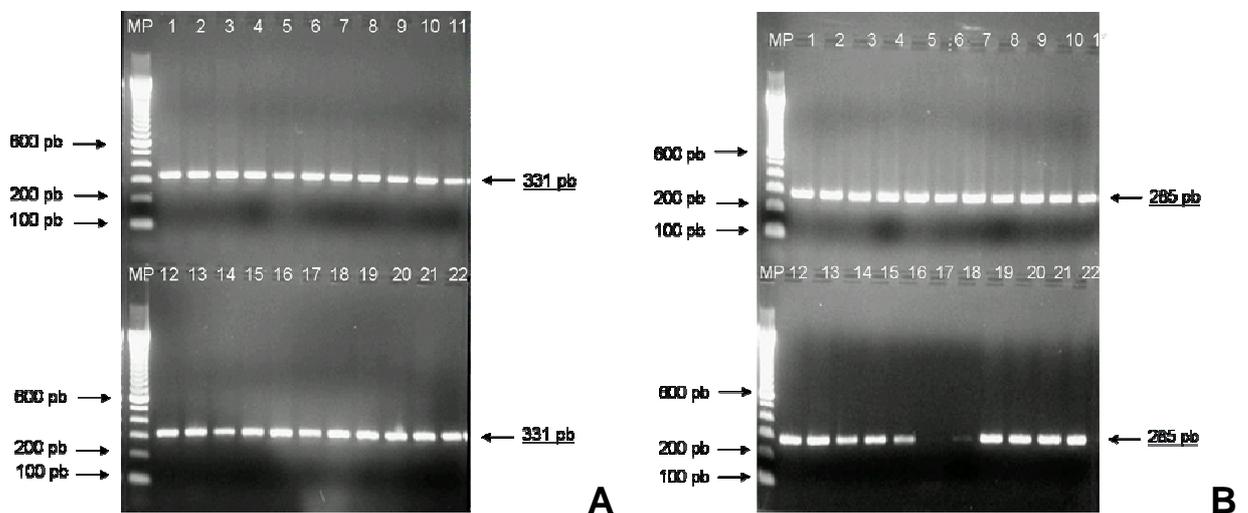
Para a extração do DNA, a turbidez de uma alíquota de 5 ml de cada cepa-padrão cultivada em meio de Fletcher Líquido foi ajustada com PBS 1X para igualar-se à turbidez do tubo n° 1 da escala de McFarland, o que equivale a aproximadamente 3×10^7 células/ml. Uma alíquota de 1 ml foi submetida à centrifugação a 13.000 rpm, por 20 minutos a 4°C. Em seguida os sobrenadantes foram removidos e o sedimento foi ressuspensionado no líquido remanescente. Foi adicionado 1 ml de PBS 1X a cada microtubo, com homogeneização subsequente. As amostras foram submetidas à nova centrifugação – 13.000 rpm por 20 minutos a 25°C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e o sedimento foi ressuspensionado no líquido remanescente. Foram adicionados 100 µl de PBS 1X a cada amostra, que foi incubada em bloco seco a 94°C por 10 minutos. O DNA obtido foi então estocado a -20°C.

As amostras de DNA obtidas foram amplificadas e os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese conforme descrito nos itens 3.1.2 e 3.1.3.

Todas as cepas avaliadas geraram produtos de PCR de tamanho compatível com o esperado para os dois sistemas de amplificação. Apesar de haver detecção, o DNA das cepas classificadas como *Leptospira kirschneri* teve rendimento menor do que as demais quando amplificado pelos iniciadores G1/G2.

Os sistemas de PCR em avaliação nesse estudo estão descritos há tempos na literatura (GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*, 1992) e têm sido extensivamente estudados para aplicação diagnóstica. Desde sua descrição, ambos os sistemas moleculares foram avaliados quanto à especificidade analítica frente a diversos microorganismos patogênicos, por diferentes grupos científicos, com resultados consoantes. Em virtude da inacessibilidade a cepas bacterianas de referência padrão ATCCTM, foram considerados nesse estudo os resultados dos testes de especificidade publicados anteriormente (FONSECA *et al.*, 2006; OOTEMAN *et al.*, 2006; GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*, 1992).

FIGURA 2 – AMPLIFICAÇÃO DE CEPAS-PADRÃO DE *Leptospira* spp. PELOS CONJUNTOS DE INICIADORES A/B E G1/G2



Amplificação das cepas-padrão de *Leptospira* spp. pelos sistemas A/B (A) e G1/G2 (B). MP: Marcador de peso molecular de 100 pb. Poços 1 a 22: sorovares Australis (1), Autumnalis (2), Bataviae (3), Bratislava (4), Canicola (5), Copenhageni (6), Djasiman (7), Hardjo (8), Hebdomadis (9), Icterohaemorrhagiae (10), Pomona (11), Pyrogenes (12), Saxkoebing (13), Wolfii (14), Celledoni (15), Panamá (16), Cynopteri (17), Grippytyphosa (18), Javanica (19), Sejroe (20), Tarassovi (21) e Shermani (22).

TABELA 3 – CEPAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NO ESTUDO

Genomoespécie	Sorovar	Cepa
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Ballico
	Autumnalis	Akiyami A
	Bataviae	Van Tienem
	Bratislava	Jez-Bratislava
	Canicola	Hond Utrecht IV
	Copenhageni	M20
	Djasiman	Djasiman
	Hardjo	Hardjioprajitno
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Sallinem
	Saxkoebing	Mus 24
	Wolffi	3705
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46
	Sejroe	M84
	Tarassovi	Perepelitsin
<i>Leptospira kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C
	Grippotyphosa	Moskva V
<i>Leptospira nogushii</i>	Panama	CZ 214 K
<i>Leptospira santarosai</i>	Shermani	LT 821
<i>Leptospira weilii</i>	Celledoni	Celledoni

4.1 EVALUATION OF SERUM, PLASMA AND WHOLE BLOOD SPECIMENS FOR MOLECULAR DETECTION OF *Leptospira* spp.

Irina Nastassja Riediger^{a,*}, Sueli Massumi Nakatani^a, Alexander Welker Biondo^b

^aLaboratório Central do Estado do Paraná, LACEN-PR, Curitiba, Brazil.

^bDual affiliation, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil, and Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana IL, USA.

Running title: Plasma, serum and whole blood for *Leptospira* spp. PCR detection

Corresponding author: Irina Nastassja Riediger. LACEN-PR, Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças, Seção de Biologia Molecular. Rua Sebastiana Santana Fraga, nº 1001, Guatupê, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil, 83060-500.

Tel: +55 (41) 3299-3266; +55 (41) 3299-3212.

email: irinariediger@sesa.pr.gov.br

ABSTRACT

Laboratory diagnosis of leptospirosis in the past several decades has been based on immunomethods, which are unreliable for prompt diagnosis and clinical decision-making. Although molecular methods have been widely used for more rapid and reliable diagnosis, it is still unclear which is the most adequate clinical sample for detection of circulating leptospire. The aim of this study was to evaluate the best specimen for leptospiremia detection, as well as to suggest an endogenous gene (beta globin) as internal control for DNA extraction and amplification. Whole blood, plasma and serum specimens were submitted to both monoplex and duplex PCR assays using previously described protocols. Results indicated that whole blood samples allow a higher sensitivity in the amplification of extracted DNA when compared to plasma or serum obtained in the same conditions, with the advantage of eliminating the centrifugation steps. PCR with DNA extracted from serum specimens presented lower sensitivity when compared to other specimens. Beta globin partial amplification was detected in both monoplex and duplex PCR assays using whole blood DNA samples, adequately working as internal control for both DNA extraction and amplification. However, partial amplification of the beta globin gene in a separate monoplex assay may be a more efficient internal control approach for both extraction and PCR amplification. In conclusion, our results suggest that whole blood specimens are more appropriate for clinical investigation of leptospiremia, when compared to plasma or serum samples.

Keywords: duplex, *Leptospira* spp., monoplex, whole blood.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide distributed anthroponosis which presents epidemiological importance in both urban and rural areas (ROMERO et al., 2003). The infection, acquired by contact with urine from animal reservoirs or contaminated environment, produces a variety of non specific symptoms (McBRIDE et al., 2005; KO et al., 1999). Clinical presentation ranges from subclinical disease to severe syndromes of multisystem complications, which have been associated with high case-fatality rates (DOLHNIKOFF et al., 2007). Two distinct clinical phases of the *Leptospira* spp. infection are, in general, preceded by a brief incubation period. First phase is marked by leptospiremia, which occurs within the first week of the acute disease; second phase, or immune phase, is characterized by the presence of circulating antibodies and shedding of leptospire in urine of infected patients (FAINE, 1993).

Laboratory diagnosis of leptospirosis has been traditionally performed by detection of circulating antibodies in patient serum (KOSITANONT et al., 2007; LEVETT, 2001) such as microscopic agglutination test (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, consistent results may be only obtained during the immune phase of the illness. Thus, these confirmatory immunomethods have been used in the past several decades and are unreliable for clinical decision-making (KO et al., 1999; FAINE, 1993).

Early diagnosis of leptospirosis is of extreme importance, since antibiotic therapy is more effective when initiated in the acute phase of disease. Thus, early detection requires a rapid and sensitive test, which also should be easy to perform (FONSECA et al., 2006; OOTEMAN et al., 2006). Molecular methods have been

widely used for diagnosis of leptospirosis (MERIEN et al., 2005; KEE et al., 1994; GRAVEKAMP et al., 1993; MERIEN et al., 1992), showing that rapid detection of *Leptospira sp* by PCR may precede antibody detection and overcome the requirement for isolation and culture (OOTEMAN et al., 2006).

The choice of an adequate clinical sample is a critical step for molecular detection of a pathogenic microorganism. However, it is still unclear whether serum (OOTEMAN et al., 2006; GRAVEKAMP et al., 1993), whole blood (FONSECA et al., 2006; MERIEN et al., 1992) or buffy coat samples (KOSITANONT et al., 2007) are more adequate for molecular detection of leptospire. Since leptospire are cell adherent bacteria, but not facultative intracellular (BAROCCHI et al., 2002), detection limit of leptospiral DNA may be higher on blood cellular fraction than on non-cellular fractions (serum or plasma). Accordingly, the aim of this study was to evaluate the best clinical specimen for leptospiremia detection, as well as to suggest an amplification approach using an endogenous gene (beta globin) as internal control for DNA extraction and amplification.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Whole blood, plasma and serum specimens were evaluated in order to determine the most adequate biological material for the detection of circulating leptospire. Whole blood (collected in EDTA) and serum samples from a healthy individual were inoculated with *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20. Bacterial cell counting was performed in Petroff-Hausser cytometer, followed by contamination of one milliliter of both whole blood and serum samples with 5×10^7 leptospire. The

contaminated samples were serially diluted by tenfold dilution until 5×10^1 cells/ml. The original samples were used as diluents. After the removal of 200 μ l for DNA extraction, each whole blood dilution sample was centrifuged to obtain the equivalent plasma sample, which was also submitted to DNA extraction.

DNA extraction. Commercial kit GENERATION Capture Column Kit (GENTRA SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA) was used for DNA extraction from 200 μ l of whole blood, plasma and serum samples, according to the manufacturer's instructions.

Monoplex PCR. All samples were amplified using two different sets of primers. Primers used for partial *secY* gene amplification had the following nucleotide sequence: G1 - 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3' and G2 - 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3' (GRAVEKAMP et al., 1993). Reaction mixture consisted of 5 μ l of extracted DNA, 50 mM of KCl, 10 mM of tris-HCl (pH 8.2), 2mM of $MgCl_2$, 1 μ M of each primer (G1 and G2), 200 μ M of each dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to a final volume of 50 μ l. The first cycle consisted of denaturation at 94°C for 5 minutes, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes. The following 34 cycles consisted of denaturation at 94°C for 1.5 minutes, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes, with a final step of 10 minutes at 72°C.

Primers used for partial *rrs 16S* gene amplification had the following nucleotide sequence: A - 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' and B - 5' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 3' (MERIEN et al., 1992). Reaction mixture was similar to described above for G1/G2 primer set. The first cycle consisted of denaturation at 94°C for 3 minutes, annealing at 61°C for 1.5 minute and extension at 72°C for 2 minutes. The following 29 cycles consisted of denaturation at 94°C for 1 minutes,

annealing at 61°C for 1.5 minute and extension at 72°C for 2 minutes, with a final step of 10 minutes at 72°C. Positive and negative controls were used in each PCR reaction.

Duplex PCR. To evaluate the best beta globin amplification strategy, DNA obtained from whole blood samples was amplified with primer sets A/B or G1/G2 in a duplex assay, using the same reaction conditions and cycling parameters used for monoplex assays, added 0.5 µM of βglobP1 (5' TAG TCC CAC TGT GGA CTA CTT 3') and βglobP2 (5' CCT GAG AGC TTG CTA GTG ATT 3') primers. Positive and negative controls were used in each PCR reaction.

DNA detection. PCR products were applied to 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and separated by horizontal electrophoresis. Following, the gel was exposed to ultraviolet light to reveal predicted size fragments of 285 bp for G1/G2 set; 331 bp for A/B set and 620 bp for βglobP1/ βglobP2 set. Positive samples were defined on basis of visual detection of specific bands on the agarose gel.

RESULTS

The results obtained for whole blood, serum and plasma samples for monoplex PCR are shown in Figure 1 (A/B set) and Figure 2 (G1/G2 set). A comparison of results obtained for whole blood samples under monoplex and duplex amplification conditions for each primer set is shown in Figures 3 and 4.

DISCUSSION

The evaluation of our results indicated that whole blood samples allow a higher sensitivity in the amplification of the respective extracted DNA when compared

to plasma or serum obtained in the same infecting conditions. A similar study has found that also buffy coat (peripheral white blood samples) showed higher positivity in the molecular detection of leptospire when compared to plasma and serum samples (KOSITANONT et al., 2007). According to these authors, the reason for the higher rate of leptospiral DNA detection in buffy coat samples may be the internalization of leptospire by circulating leucocytes. We believe that this may also occur with whole blood specimens, with the advantage of eliminating the centrifugation steps. Furthermore, as previously mentioned, since leptospire are cell adherent but not intracellular (BAROCCHI et al., 2002), detection limit of leptospiral DNA should be higher on blood cellular fraction than on non-cellular fractions (serum and plasma). PCR used in the present study with DNA extracted from serum specimens presented lower sensitivity when compared to a similar protocol using primer set G1/G2.

Beta globin partial amplification was detected in both monoplex and duplex PCR assays using whole blood DNA samples, adequately working as internal control for both extraction and amplification. Even though it was possible to detect beta globin amplification in duplex PCR, the sensitivity of A/B and G1/G2 primer sets was lower when compared to monoplex assays. Once duplex assays are based on competitive amplification, presence of fewer molecular targets of leptospiral DNA may have favored the amplification of more abundant beta globin gene. We were unable to detect beta globin partial amplification from DNA isolated from plasma or serum samples (data not shown), possibly due to absence of cellular contents. To our knowledge, there is no previous report on the use of endogenous beta globin

gene as an internal control for the molecular detection of leptospires isolated from blood specimens.

The detection limit of leptospiral DNA from whole blood samples on both assays showed lower sensitivity when compared to those obtained from pure cultured bacteria (MERIEN et al., 1992; GRAVEKAMP et al., 1993). Although with limited clinical significance, these results may suggest interference of inhibitory compounds in blood such as hemoglobin derivatives, over the amplification reaction, as has been previously suggested (KOSITANONT et al., 2007; BOOM et al., 1990).

In summary, our results suggest that whole blood specimens are more appropriate for clinical investigation of leptospiremia when compared to plasma or serum samples. Besides, partial amplification of the beta globin gene in a separate monoplex assay may be an efficient internal control approach for both extraction and PCR amplification.

AKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by grants from SETI (Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior), Paraná State, Brazil.

REFERENCES

- Barocchi, M.A., Ko, A.I., Reis, M.G., McDonald, K.L., Riley, L.W., 2002. Rapid Translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect. Immun.* 70, 6926-6932.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim van-Dillen, P.M.E., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495– 503.
- Dolhnikoff, M., Mauad, T., Bethlem, E.P., Carvalho, C.R.R., 2007. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 11, 142-148.
- Faine, S., 1993. *Leptospira and leptospirosis*. Baton Raton: CRC Press.
- Fonseca, C.A., Freitas, V.L.T., Romero, R.C., Spinosa, C., Sanches, M.C.A., Silva, M.V., Shikanai-Yasuda, M.A., 2006. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop. Med. Int. Health* 2, 1699-1707.
- Gravekamp, C., van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G.J., van Eys, G.J.J.M., Everad, C.O.R., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J., 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1691– 1700.
- Kee, S.H., Kim, I.S., Choi, M.S., Chang, W.H., 1994. Detection of leptospira DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1035-1039.
- Ko, A.I., Galvão, R.M., Ribeiro, D.C.M., Johnson Jr., W.D., Riley, L.W., 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 35, 820– 825.
- Kositanont, U., Rugsasuk, S., Leelaporn, A., Phulsuksombati, D., Tantitanawat, S., Naigowit, P., 2007. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic

- Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 117-122.
- Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.
- McBride, A.J.A., Athanazio, D.A., Reis, M.G., Ko, A.I., 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18, 376-386.
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219– 2224.
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., Baranton, G., 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microb. Lett.* 249, 139-147.
- Ooteman, M.C., Vago, A.R., Koury, M.C., 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microb. Methods* 65, 247-257.
- Romero, E.C., Bernardo, C.C.M., Yasuda, P.H., 2003. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 45, 245-248.

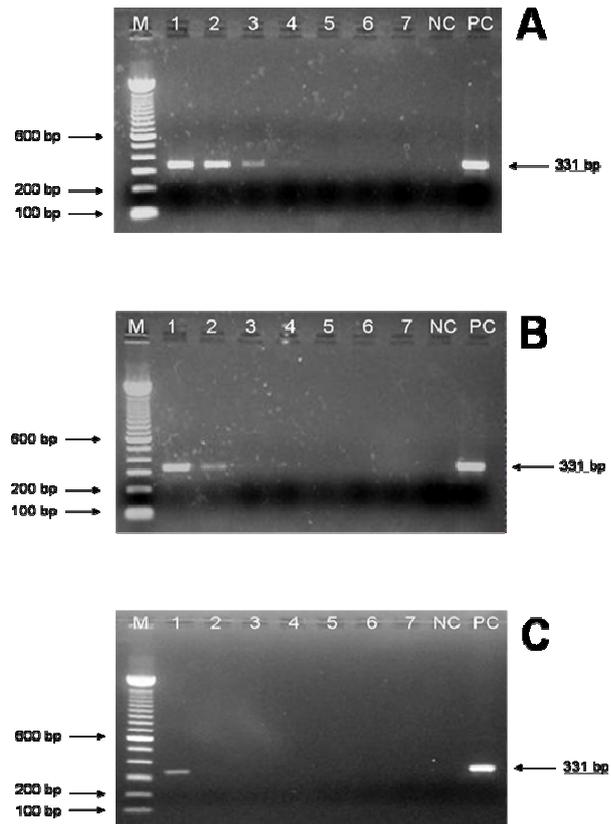


Figure 1. Sensitivity evaluation of primer set A/B on monoplex assay using whole blood (A), serum (B) and plasma (C) samples. M: Molecular size marker. Lanes 1 to 7: samples spiked with *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 (from 5×10^7 cells/ml to 5×10^1 cells/ml). NC: negative control. PC: positive control.

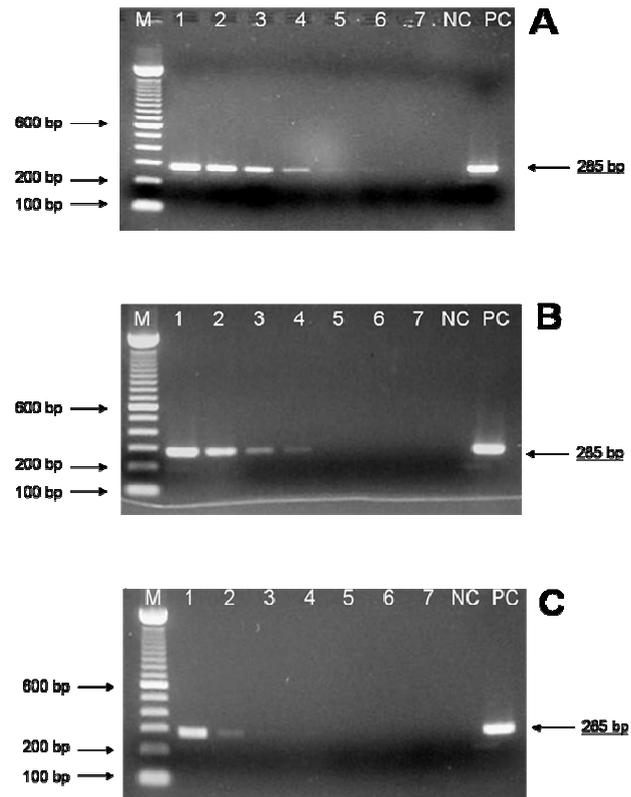


Figure 2. Sensitivity evaluation of primer set G1/G2 on monoplex scheme using whole blood (A), serum (B) and plasma (C) samples. M: Molecular size marker. Lanes 1 to 7: samples spiked with *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 (from 5×10^7 cells/ml to 5×10^1 cells/ml). NC: negative control. PC: positive control.

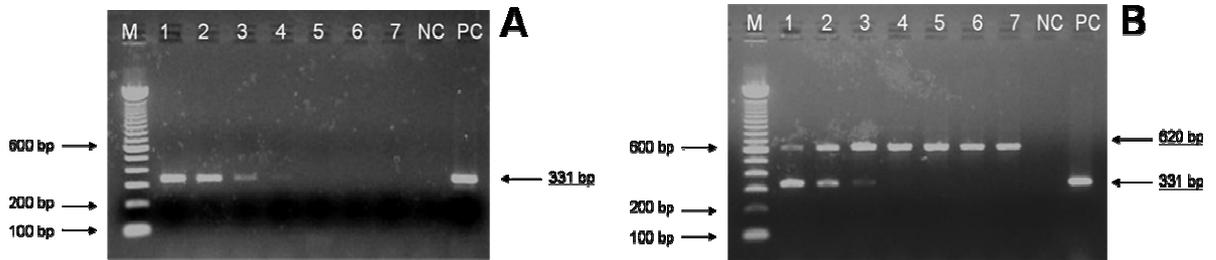


Figure 3. Sensitivity comparison for primer set A/B on monoplex (A) and duplex (B) assays, for DNA isolated from whole blood samples. M: Molecular size marker. Lanes 1 to 7: samples spiked with *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 (from 5×10^7 cells/ml to 5×10^1 cells/ml). NC: negative control. PC: positive control.

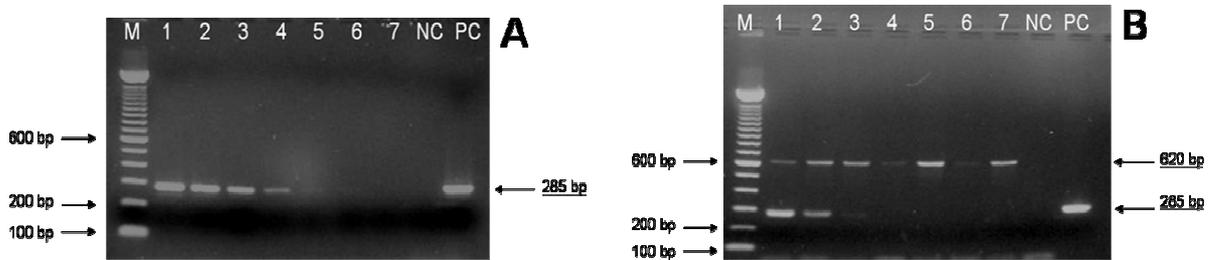


Figure 4. Sensitivity comparison for primer set G1/G2 on monoplex (A) and duplex (B) assays, for DNA isolated from whole blood samples. M: Molecular size marker. Lanes 1 to 7: samples spiked with *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 (from 5×10^7 cells/ml to 5×10^1 cells/ml). NC: negative control. PC: positive control.

4.2 USE OF A *secY* GENE FRAGMENT FOR MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Leptospira* spp.

Irina Nastassja Riediger^{a,*}, Sueli Massumi Nakatani^a, Alexander Welker Biondo^b

^aLaboratório Central do Estado do Paraná, LACEN-PR, Curitiba, Brazil.

^bDual affiliation, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil, and Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana IL, USA.

Running title: *secY* in *Leptospira* identification

Corresponding author: Irina Nastassja Riediger. LACEN-PR, Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças, Seção de Biologia Molecular. Rua Sebastiana Santana Fraga, nº 1001, Guatupê, São José dos Pinhais, Paraná 83060-500. Tel: +55 (41) 3299-3266; +55 (41) 3299-3212.

Email: irinariediger@sesa.pr.gov.br

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide zoonosis of nonspecific clinical symptoms, which definitive diagnosis relies on laboratorial tests. Although the microscopic agglutination test (MAT) is considered the reference diagnostic test, molecular diagnostic tools have been developed and utilized due to their higher sensitivity and specificity. In the present study, sequencing of *secY* gene fragment was evaluated for *Leptospira* identification. Different pathogenic leptospires (standard strains) were amplified and sequenced in order to verify their genetic variability and potential use in molecular identification. Results showed minimal variation of analyzed fragment, which did not permit identification of tested strains. In conclusion, although PCR of *secY* gene fragment has been used for diagnosis of pathogenic leptospires, sequencing of respective amplicons does not allow species identification.

Key-words: *Leptospira* spp., genotypes, *secY* gene, identification.

INTRODUCTION

Leptospirosis is an anthroponosis with worldwide relevance, being particularly important in developing countries (11). Disease exhibits a seasonal pattern with highest incidence in the rainy season, and is directly related to the social and economical conditions of the affected population (11, 13).

Leptospirosis presents highly variable and nonspecific symptoms, which may difficult clinical diagnosis. Thus, laboratorial diagnosis is essential for definitive diagnosis and infection confirmation. Tests routinely employed include serological and microbiological techniques. Among serological tests, the microscopic agglutination test (MAT) is considered the gold standard method for laboratorial diagnosis of leptospirosis (3, 5, 9), and is the only serological test that allows infecting serogroup identification (11). However, MAT is an indirect test, thus not capable of differentiating actively infected patients from convalescents. Results may be difficult to interpret in previously vaccinated, exposed or chronically infected patients, particularly in patients from endemic areas (2, 12). MAT results may not be reliable on acute phase of disease, since agglutination depends on the presence of detectable antibodies. Furthermore, MAT requires the analysis of paired samples, which may not always be available. MAT is also a very laborious method, involving the maintenance of a bacterial culture set, permanent quality control and expertise in result interpretation (11).

Molecular biology tools have been proposed due to difficulties and technical limitations of traditional techniques applied to leptospirosis diagnosis (2, 7, 12). Molecular methods, particularly polymerase chain reaction (PCR), are reportedly specific and sensitive for *Leptospira* diagnosis (11, 13). Molecular techniques have

been especially useful for the diagnosis of clinical pathogens, which genetic material may be isolated from the most diverse samples (7, 12). Although PCR is considered quite sensitive and specific for leptospirosis diagnosis in blood (11), serum (14), urine (12) and liquor (13) samples, most molecular systems do not allow infecting genospecies identification (11, 13).

SecY fragments generated by primer set G1/G2 constitute a reliable molecular diagnostic tool for *Leptospira* (7), but to the authors knowledge there is no study on either its sequence analysis or its potential use for genotypic classification of *Leptospira* from clinical samples. Accordingly, in the present study we evaluated sequences of a *secY* gene fragment from pathogenic *Leptospira* strains generated by a PCR system designed for diagnostic purposes, in order to verify its potential use for molecular identification of *Leptospira* genospecies.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Twenty two reference strains, recommended by the World Health Organization and used in MAT, were analyzed in this study as described in Table 1.

DNA extraction. For DNA extraction, the turbidity of a 5 ml aliquot of each reference strain maintained in liquid Fletcher medium was adjusted with PBS 1X to equal the turbidity of first tube in McFarland scale, which means approximately 3×10^7 leptospire/ml. Bacteria were then incubated in a dry bath at 94°C for 10 minutes. Resultant DNA was stocked at -20°C until PCR was performed.

PCR. Primers used for partial *secY* gene amplification had the following nucleotide sequence: G1 - 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3'; G2 - 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3' (7). Extracted DNA from all cultures was amplified by PCR,

essentially as previously described. Reaction mixtures consisted of 5 μ l of extracted DNA, 50 mM of KCl, 10 mM of Tris-HCl (pH 8.2), 2 mM of MgCl₂, 1 μ M of each primer (G1 and G2), 200 μ M of each dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to a final volume of 50 μ l. The first PCR cycle consisted of denaturation at 94°C for 5 minutes, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes. The following 34 cycles consisted of denaturation at 94°C for 1.5 minutes, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes, with a final step of 10 minutes at 72°C.

DNA detection and purification. PCR products were separated by horizontal electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml) to reveal fragments of 285 bp predicted size. Fragments were purified using the kit *PureLink™ PCR Purification* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as recommended by the manufacturer. Purified PCR products were quantified using horizontal electrophoresis with 470 ng of *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as quantification standard. Samples were then diluted to 1.3 ng/ μ l in ultrapure water and stocked at 4°C until utilized for sequencing.

Sequencing reaction: purified PCR products were submitted to sequencing in both sense and anti-sense directions using Big Dye Terminator cycle sequencing kit v. 2 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), following manufacturer's instructions. Sequencing reaction products were purified, dehydrated and resuspended in 10 μ l of formamide *Hi-Di* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Samples were denatured at 96°C for 3 minutes and immediately submitted to detection using ABI 3130 sequencer analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Sequencing data were analyzed using *SeqScape* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

RESULTS

It was possible to detect PCR products of the predicted size for all the 22 strains tested. However, those strains classified as *L. kirschneri* rendered reduced PCR products yields (Figure 1). DNA from strains Mus 24 and Celledoni rendered low quality DNA sequences and thus were not included in the analysis. Sequences of *secY* gene fragment for the remaining 18 *Leptospira* reference strains were analyzed, compared and submitted to GenBank (deposit number from DQ882850 to DQ882868). Region of highest nucleotide polymorphism is presented in Figure 2.

DISCUSSION

In the present study, a *secY* gene fragment, routinely used for molecular diagnosis of *Leptospira* spp., was not able to molecularly identify the infecting strain. Comparative leptospiral sequences showed minimal nucleotide polymorphism in the evaluated *secY* region, not being sufficient for individual identification of each species and respective strains tested, even in the highest polymorphic region (see Figure 1). Although *secY* region studied reveals to be insufficient for genotype identification when solely used, it may be used for exclusion of infecting genotype, or in association to MAT and epidemiological data.

Other genomic regions of *Leptospira* have been tested for potential molecular identification, including rRNA 16S and 23S genes, O antigen synthase and insertion sequences (16). Besides, different approaches have been proposed to individualize each genotype, such as RFLP, RAPD, PFGE, DNA sequencing and ribotyping (10).

These methods, when applied to the mentioned regions and fragments, allowed molecular classification of some strains. However, as in the present study, they were unable to genotype clinically relevant strains, particularly those related to serovars Icterohaemorrhagiae, Copenhageni and Canicola. In addition, the genotypic classification obtained by some of these studies conflicted with the phenotypic classification produced by MAT (1, 13). A recently described method based on multiple *loci* sequence typing (MLST) was able to differentiate the main clinically relevant strains, including the three mentioned above (1). Unfortunately, MLST still presents important technical limitations, which strongly restrain its application to diagnostic routine.

Even though clinical relevance of genotyping the infecting *Leptospira* strains is still controversial in either human or canine patients (4, 5, 6), it has clearly an important impact on epidemiological surveillance (11, 13, 16).

Although the original article on G1 and G2 primers has referred an inability to amplify the pathogenic *Leptospira kirschneri* strains (7), in the present study we were capable to successfully amplify DNA from this species (data not shown). This observation has been reported before (15).

In conclusion, although G1/G2-primed PCR of *secY* gene has been routinely used for pathogenic *Leptospira* diagnosis, sequencing of respective fragments does not permit the identification genospecies.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was partially funded by SETI - Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná, Brazil.

REFERENCES

1. **Ahmed, N., S. M. Devi, M. A. Valverde, and P. Vijayachari.** 2006. Multilocus sequence typing method for identification of genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **5**:1-10.
2. **Bajani, M. D., D. A. Ashford, S. L. Bragg, C. W. Woods, T. Aye, R. A. Spiegel, B. D. Plikaytis, B. A. Perkins, M. Phelan, P. N. Levett, and R. S. Weyant.** 2003. Evaluation of four commercially available serologic tests for the diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**:803-809.
3. **Binder, W. D., and L. A. Mermel.** 1998. Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. *J. Emerg. Med.* **16**:851-856.
4. **Esen, S., M. Sunbul, H. Leblebicioglu, C. Eroglu, and D. Turan.** 2004. Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. *Swiss Med. Wkly.* **134**:347-352.
5. **Faucher, J. F., B. H. Estavoyer, and J. M. Estavoyer.** 2004. The management of leptospirosis. *Exp. Opin. Pharmacother.* **5**:819-827.
6. **Goldstein, R. E., R. C. Lin, C. E. Langstron, P. V. Scrivani, H. N. Erb, and S. C. Barr.** 2006. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **20**:489-494.
7. **Gravekamp, C., H. Van de Kemp, M. Franzen, D. Carrington, G. J. Schoone, G. J. Van Eys, C. O. Everard, R. A. Hartskeerl, and W. J.**

- Terpstra.** 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1691-1700.
8. **Kee, S. H., I. S. Kim, M. S. Choi, and W. H. Chang.** 1994. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1035-1039.
9. **Ko, A. I., M. G. Reis, C. M. R. Dourado, W. D. Johnson, and L. W. Riley.** 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet.* **354**:820-825.
10. **Kositanont, U., K. Chotinantakul, D. Phulsuksombati, and C. Tribuddharat.** 2007. Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. *J. Microbiol. Meth.* **69**:288-297.
11. **Levett, P. N.** 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:296-326.
12. **Lucchesi, P. M. A., G. H. Arroyo, A. I. Etcheverria, A. E. Parma, and A. C. Seijo.** 2004. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **37**:131-134.
13. **McBride, A. J., D. A. Athanzio, M. G. Reis, and A. I. Ko.** 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:376-386.
14. **Merien, F., P. Amouriaux, P. Perolat, G. Baranton, and I. S. Girons.** 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2219-2224.
15. **Oliveira, M. A. A., O. L. Caballero, A. R. Vago, R. A. Harskeerl, A. J. Romanha, S. D. J. Penha, A. J. G. Simpson, and M. A. Koury.** 2003. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *J. Med. Microbiol.* **52**:127-135.
16. **Wangroongsarb, P., T. Chanket, K. Gunlabun, D. H. Long, P. Satheanmethakul, S. Jetanadee, J. Thaipadungpanit, V. Wuthiekanun, S.**

J. Peacock, S. D. Blacksell, L. D. Smythe, D. M. Bulach, and T. Kalambaheti. 2007. Molecular typing of *Leptospira spp.* based on putative O-antigen polymerase gene (*wzy*), the benefit over 16S rRNA gene sequence. **271:170-179.**

Table 1. *Leptospira* spp. reference strains used in the study.

Genomic species	Serovar	Strain
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Ballico
	Autumnalis	Akiyami A
	Bataviae	Van Tienem
	Bratislava	Jez-Bratislava
	Canicola	Hond Utrecht IV
	Copenhageni	M20
	Djasiman	Djasiman
	Hardjo	Hardjioprajitno
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Sallinem
	Saxkoebing	Mus 24
	Wolffi	3705
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46
	Sejroe	M84
	Tarassovi	Perepelitsin
<i>Leptospira kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C
	Grippotyphosa	Moskva V
<i>Leptospira nogushii</i>	Panama	CZ 214 K
<i>Leptospira santarosai</i>	Shermani	LT 821
<i>Leptospira weilii</i>	Celledoni	Celledoni

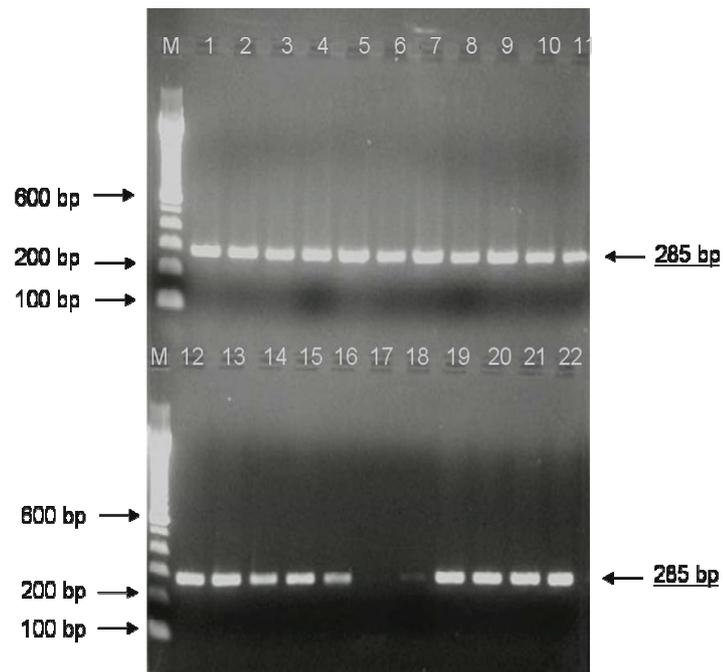


Figure 1. Amplification of *Leptospira* spp. standard strains by primer set G1/G2. M: Molecular size marker. Wells 1 to 22: strains belonging to serovars Australis (1), Autumnalis (2), Bataviae (3), Bratislava (4), Canicola (5), Copenhageni (6), Djasiman (7), Hardjo (8), Hebdomadis (9), Icterohaemorrhagiae (10), Pomona (11), Pyrogenes (12), Saxkoebing (13), Wolfii (14), Celledoni (15), Panamá (16), Cynopteri (17), Grippotyphosa (18), Javanica (19), Sejroe (20), Tarassovi (21) and Shermani (22).

	10	20	30	40	50
<i>copenhageni</i>	GGAAAACAAA	TGCTCGGAAG	AAAAATGGTT	-CAGGCCAAG	AGTCAATCTA
<i>bataviae</i>	A.....
<i>bratislava</i>
<i>hardjo</i>
<i>icterohaemorrhagiae</i>
<i>pyrogenes</i>
<i>canicola</i>	T.....
<i>hebdomadis</i>
<i>pomona</i>
<i>australis</i>
<i>autumnalis</i>	A.....
<i>djasiman</i>
<i>sejroe</i>
<i>wolfii</i>
<i>panama</i>G..AC.....C.
<i>shermani</i>G..AC.....C.
<i>javanica</i>G..AC.....C.
<i>tarassovi</i>G..AC.....C.

	60	70	80	90	100
<i>copenhageni</i>	TTCCTTTCAA	AGTAAACGGC	GCGAACGTGA	TGCCGATCAT	TTTTGCCTC
<i>bataviae</i>
<i>bratislava</i>
<i>hardjo</i>
<i>icterohaemorrhagiae</i>
<i>pyrogenes</i>
<i>canicola</i>T
<i>hebdomadis</i>T
<i>pomona</i>T
<i>australis</i>T..T
<i>autumnalis</i>T..TT...
<i>djasiman</i>T..TT...
<i>sejroe</i>T..TT...
<i>wolfii</i>T..TT...
<i>panama</i>T..G....A....C.....
<i>shermani</i>T..G....A....C.....
<i>javanica</i>T..G..T..A....A.C.....
<i>tarassovi</i>T..G....TA....A.C..C....

Figure 2. Region of highest genetic polymorphism of *secY* gene fragment (1-100 bp) for each tested strain of *Leptospira* spp. Complete nucleotide sequences are available in GenBank (DQ882850 to DQ882868).

4.3 USE OF URINE AND BLOOD SAMPLES FOR PCR DIAGNOSIS OF HUMAN LEPTOSPIROSIS

Irina Nastassja Riediger^{a,*}, Suzana Dal Ri Moreira^b, Irene Skraba^a, Juliano Leônidas Hoffmann^c, Leila Ullmann^c, Sueli Massumi Nakatani^a, Helio Langoni^c, Alexander Welker Biondo^d

^aLaboratório Central do Estado do Paraná, LACEN-PR, Curitiba, Brazil.

^bServiço de Epidemiologia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

^cDepartamento de Higiene e Saúde Pública Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus of Botucatu, São Paulo, Brazil.

^dDual affiliation, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil, and Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana IL, USA.

Running title: PCR diagnosis of human leptospirosis

*Corresponding author: Irina Nastassja Riediger. LACEN-PR, Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças, Seção de Biologia Molecular. Rua Sebastiana Santana Fraga, nº 1001, Guatupê, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil, 83060-500. Tel: +55 (41) 3299-3266; +55 (41) 3299-3212.

email: irinariediger@sesa.pr.gov.br

ABSTRACT

Laboratory diagnosis of leptospirosis has conventionally been performed either by culture or detection of antibodies in serum samples. However, reliable results in microscopic agglutination test (MAT) require analysis of paired serum samples, which may not always be available. In the present study we compared two distinct PCR assays using previously described primer pairs (G1/G2 and A/B) in urine and blood samples for clinical diagnosis of leptospirosis. A total of 66 clinical samples tested by IgM ELISA, MAT and blood and urine PCR, along with 15 paired samples, were evaluated. PCR detection of leptospiral DNA occurred prior to MAT, by evaluation of paired samples. G1/G2-primed amplifications showed significantly greater sensitivity and specificity than A/B in clinical samples. Overall PCR sensitivity and specificity was 53.57% and 63.16%, respectively. In conclusion, although we found PCR to be less sensitive when compared to serological tests throughout the course of the disease, our results show that PCR performed on blood or urine samples may be a complementary tool in the first phase of the illness, specially when no specific antibodies can be detected by serological techniques, allowing early confirmation of the infection and differential diagnosis from other infectious febrile diseases.

Keywords: blood, diagnosis, urine, leptospirosis, microscopic agglutination test, PCR.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a zoonotic infection that currently affects urban populations in the five continents, with higher incidence in tropical climates (SAMBASIVA et al., 2003; PLANK et al., 2000). Leptospirosis is a common cause of febrile illness with protean manifestations in developing countries, where uncontrolled growth of slum population, poverty and poor sanitation favor rodent-borne transmission (McBRIDE et al., 2005; KO et al., 1999).

Clinical presentation ranges from subclinical infection to severe syndromes with multiple site complications, which have been associated with high case-fatality rates (DOLHNIKOFF et al., 2007). A brief incubation period often precedes the two distinct clinical phases of *Leptospira* spp. infection. The first week of disease is marked by leptospiremia, which is responsible for the acute phase of illness. The second phase, or immune phase, is characterized by presence of circulating antibodies and shedding of leptospire in urine (LEVETT, 2001).

Laboratory diagnosis has conventionally been performed either by culture or demonstration of antibodies against leptospire in serum samples (KOSITANONT et al., 2007) with employment of techniques such as microscopic agglutination test (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MAT is considered the serological reference method and allows serological classification of infecting serovar. However, reliable results require analysis of paired serum samples, which may not always be available. Besides, cross reaction between related serovars often turns result interpretation into a difficult task (OOTEMAN et al., 2006; LEVETT, 2001).

Early case definition requires a diagnostic test that is rapid, sensitive and easy to carry out. Rapid diagnosis is crucial to increase the chance of successful antibiotic treatment and to reduce tissue damage in human infections. Molecular methods have been widely used for diagnosis of leptospirosis (MERIEN et al., 2005; KEE et al., 1994; GRAVEKAMP et al., 1993; MERIEN et al., 1992), suggesting that rapid detection of *Leptospira* by PCR may precede antibody detection and overcome the requirement for isolation and culture (OOTEMAN et al., 2006).

The aim of the present study was to compare two distinct PCR assays using urine and blood samples with IgM ELISA and MAT for diagnosis of leptospirosis.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Blood, urine and serum samples were collected from 92 patients clinically suspected of leptospirosis. Patient selection was based on available samples, with at least one IgM ELISA and one PCR performed on either blood or urine. Samples from 40 patients with acute hepatitis A and from 40 patients with dengue, as determined by immunological tests, were used as negative controls.

Serological tests. Serum samples from patients were submitted to IgM ELISA using the kit supplied by Bio-Manguinhos (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), as recommended by the manufacturer. Absorbance value was used to assign samples as positive, negative or not determined.

MAT was performed as established by World Health Organization, using a battery of 29 reference strains (provided by Adolfo Lutz Institute, Sao Paulo), as described on Table 1. End-point was defined by at least 50% agglutination with one or more serovars, visualized under dark-field microscopy. Patients were designated

as laboratory-confirmed cases upon demonstration of a fourfold rise in titer between paired serum samples or by agglutination titer equal or greater than 800 in a single serum sample. Probable cases were defined as presenting titers between 100 and 400. Unconfirmed cases exhibited negative results (OOTEMAN et al., 2006).

DNA isolation. Commercial kit GENERATION Capture Column Kit (GENTRA SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA) was used according to the manufacturer's instructions for DNA extraction of patients' whole blood and controls' serum samples, as well as artificially infected whole blood specimens. DNA from clinical and artificially infected urine samples was isolated as previously described (LUCCHESI et al., 2004).

Cultured bacteria were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) 1x pH 7.2, followed by DNA thermal release upon incubation in dry bath at 94°C for 10 minutes. Extracted DNA was stocked at -20°C until PCR was performed.

Polymerase Chain Reaction. All DNA samples were amplified using two primer pairs (G1: 5' CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT 3' and G2: 5' GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG 3'; A: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' and B: 5' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 3'), as previously described by GRAVEKAMP et al. (1993) and MERIEN et a (1992). PCR was carried out in a final volume of 50 µl containing 5 µl of extracted DNA, 50 mM of KCl, 10 mM of Tris-HCl (pH 8.2), 2mM of MgCl₂, 1 µM of each primer (G1 and G2; or A and B), 200 µM of each dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification program for primers G1 and G2 consisted of an initial cycle of denaturation at 94°C for 5 minutes, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes. The following 34 cycles consisted of denaturation at 94°C for 1.5 minutes, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes, with a

final elongation step of 10 minutes at 72°C. For primers A and B, the reaction mixtures were incubated at 94°C for 3 minutes for denaturation, 61°C for 1.5 minute for annealing and at 72°C for 2 minutes for extension, and then subjected to 29 cycles of denaturation at 94°C for 1 minutes, annealing at 61°C for 1.5 minute and extension at 72°C for 2 minutes, with a final elongation step of 10 minutes at 72°C. All whole blood DNA samples were subjected to partial amplification of beta globin gene as control for the presence of inhibitory compounds. Two controls were added to each PCR set: ultrapure water as negative control for the amplification reaction, and DNA obtained from *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA as positive control.

Molecular detection of dengue virus and Hepatitis A virus were performed as previously described (POERSCH et al., 2005; PAULA et al., 2004).

DNA sequencing. PCR products of both *Leptospira* cultures (table 1) and clinical specimens were sequenced in both orientations by the dideoxy-chain termination method using Big Dye Terminator cycle sequencing kit v. 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA), according to the manufacturer's instructions. Products were detected on ABI 3130 sequence analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Determination of detection limit. Spiked samples were prepared by mixing 900 µl of whole blood and urine from a healthy individual with 100 µl of a bacterial suspension (*L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20) at a concentration of 5×10^7 cells/ml, as determined by cell counting on a Petroff-Hausser chamber. Biological samples from the same healthy individual were used as negative controls for PCR. Five microliters of DNA were used as template in PCR as described above. Two experiments were carried out in order to determine the detection limit of PCR assays. For the first experiment, spiked whole blood and urine samples described

above were serially diluted by tenfold dilution in the original samples until reaching the concentration of 50 cells/ml. The second experiment was performed with tenfold dilutions of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20 in PBS 1X (pH 7.2), in concentrations ranging from 5×10^7 to 50 cells/ml. All dilution samples from both experiments were submitted to DNA extraction and PCR amplification as described above.

Results analysis. Analysis of the results was carried out using Epi Info version 3.4.1

RESULTS

The detection limit was verified in two different experiments. PCR products obtained from amplification of serial dilutions of bacterial DNA isolated from culture could be visualized in agarose gel up to a concentration of 5×10^2 cells/ml. In the second assay, DNA isolated from artificially infected urine samples could be visualized in agarose gel up to a dilution of 5×10^2 cells/ml. The last dilution point that could be visualized in gel for similarly infected blood samples was 5×10^3 cells/ml (data not shown).

Serum, blood and urine samples from 66 patients were tested by MAT, IgM ELISA and PCR and included for analysis. Among the total, 15 were confirmed-cases diagnosed by MAT, of which 10 (66.67%) showed positive PCR amplification; 5 (38.46%) out of the 13 probable-cases were PCR positive, as were 14 (36.84%) of the 38 unconfirmed-cases in MAT (Table 2).

Out of 20 positive blood PCR samples, 14 (70.0%) were obtained within the first 8 days of disease. In 3 blood samples, detection of leptospiral DNA was obtained within 2 days after the onset of symptoms. All the 16 positive matched urine samples

were collected within day 3 and day 12 after the first symptoms. Both IgM ELISA and MAT showed greater positivity between days 3 and 12 after the onset of symptoms (Table 3).

A second serum sample (paired sample) was collected in fifteen of the 66 patients, with an average interval of 10 days. Although all the first serum samples were negative by MAT, analysis of the results of second samples showed seroconversion in 7 cases. At the time of first MAT sample collection, blood specimens obtained for 3 of these 7 cases yielded positive PCR results; while PCR performed on urine samples was positive for 2 of the 7 samples, rendering overall positive results for 5 (71.42%) out of 7 cases. No PCR positive results were observed in blood or urine specimens collected during the convalescent phase of disease for the 7 seroconverted patients, as well as from samples obtained from the remaining 8 negative cases in MAT.

Sensitivity of IgM ELISA was found to be 85.71% when compared to MAT. When both primer pairs and both biological sample types (blood and urine) were considered, PCR sensitivity was 53.57%. No difference in sensitivity was found between the analysis of whole blood and urine samples using G1/G2 primer pair. A/B primer set showed lower sensitivity for both clinical specimens, despite of 100% specificity for blood samples analysis. When each primer set and each clinical specimen was considered, PCR sensitivity was higher for G1/G2 primer pair than for A/B set for both blood and urine specimens, as shown in Table 4.

DNA sequencing was performed for G1/G2-primed PCR products from clinical specimens of 7 patients and 18 reference strains. All DNA sequences presented the predicted size of 285 bp. Sequence analysis revealed high homology between

products obtained from clinical specimens and those generated by some *L. interrogans* serovars.

Beta globin partial amplification was detected for all 82 blood samples evaluated. Thirty one (77.50%) out of the 40 acute hepatitis A control samples yielded specific amplification by nRT-PCR. Among dengue control samples, viral RNA was demonstrated in 30 (75.0%) specimens by nRT-PCR. None of 80 control samples was positive for leptospiral DNA for neither primer pairs.

DISCUSSION

In the present study, molecular (PCR) and serological (MAT and IgM ELISA) techniques were compared for diagnosis of human leptospirosis.

Differences in PCR detection limit observed between bacteria recovered from culture medium and clinical specimens may be due to inhibitory compounds present in clinical samples, such as hemoglobin and its derivatives, as previously proposed (BOOM et al., 1991; FONSECA et al., 2006a; FONSECA et al., 2006b). Although both urine and blood samples were obtained from a healthy individual and contaminated *in vitro* with leptospira, PCR analytical sensitivity was higher in urine samples when compared to blood samples. However, other inhibitory compounds generated as consequence of *Leptospira* infection, such as products of renal failure or inflammation process, may lead to a different inhibition pattern of PCR performed in clinical specimens.

The main challenge in the leptospirosis approach is to define the diagnosis when results of MAT and other serological tests are negative (FONSECA et al., 2006a). Prior reports have found concurrent positive PCR and negative MAT results,

but majority of cases were not followed and data interpretation was difficult (FONSECA et al., 2006a; FONSECA et al., 2006b; OOTEMAN et al., 2006; KEE et al., 1994; BAL et al., 1994). In the present study, PCR performed on urine and blood samples early detected leptospiral DNA in 71.42% of seronegative patients, all later confirmed by paired MAT seroconversion. Hence, PCR positive results in blood or urine specimens obtained from MAT seronegative patients may be due to early diagnosis rather than being PCR false-positive results. These data reinforce that PCR might potentially be used as a valuable complementary tool to the early diagnosis of leptospirosis.

In addition to shedding of leptospores in urine during the first 10 days of disease, we have found evidence of long-term shedding, as a clinical urine sample collected 130 days after the acute phase of disease was positive by PCR (data not shown), suggesting persistent infection. Previous studies report molecular detection of leptospores shedding in urine one year after the first symptoms (BAL et al., 1994). As patients from both studies had been submitted to antibiotic therapy, these data suggest that some antibiotics used for leptospirosis treatment may not achieve sufficient concentration in kidneys to eradicate leptospores.

The overall sensitivity of PCR using both G1/G2 and A/B primer sets and urine and blood samples was 53.57%. However, the best sensitivity for PCR assays (60.71%) was achieved in this work when G1/G2 primer set and both biological samples (blood and urine) were considered. The first description of G1/G2 primer pair reported a sensitivity of 50.0% on serum samples (GRAVEKAMP et al., 1993). Our results corroborate with similar studies using the same primer set in clinical samples, which have found sensitivity varying from 28.0% in urine samples to 62.0% in blood and/or urine samples (BAL et al., 1994; BROWN et al., 1995). Studies

conducted in Brazil using the same primers have also shown varying sensitivity from 34.0% in serum samples (OOTEMAN et al., 2006), 65.0% in buffy coat and/or urine samples (FONSECA et al., 2006a), and 57.6% in both blood and urine samples (FONSECA et al., 2006b).

Primer set G1/G2 was described as part of a molecular system capable of amplifying DNA from 7 pathogenic *Leptospira* species, but not *L. kirschneri* (GRAVEKAMP et al., 1993). However, we were able to generate PCR products of the correct size for this species, probably due to the large amount of DNA obtained from culture of this pathogenic species (Grippotyphosa and Cynopteri) as previously reported (OOTEMAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2003).

In the present study the IgM ELISA sensitivity was found to be 85.71%, with specificity of 56.76%. A recent study using the same commercial kit reported sensitivity of 75.5% and specificity 93.3% (McBRIDE et al., 2007). Since IgM ELISA have shown to detect antibodies even several months after infection, the discrepancy in specificity may be due to false-positive results, as previously referred (McBRIDE et al., 2007; ABDULKADER et al., 2002), and observed on two positive ELISA results within first days after the onset of symptoms.

In conclusion, although we found PCR to be less sensitive when compared to serological tests throughout the course of the disease, our results show that PCR performed on blood or urine samples may be a complementary tool in the first phase of the illness, specially when no specific antibodies can be detected by serological techniques, allowing early confirmation of the infection and differential diagnosis from other infectious febrile diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by grants from SETI (Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior), Paraná State, Brazil.

REFERENCES

- ABDULKADER, R. C. R. M. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 79-83, 2002.
- BAL, A. E. et al. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BOOM, R. et al. Rapid purification of hepatitis B virus from serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 29, n. 9, p. 1804-1811, 1991.
- BROWN P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 43, n. 2, p. 110-114, 1995.
- DOLHNIKOFF, M. et al. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations of leptospirosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 142-148, 2007.
- FONSECA, C. A. et al. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Infection**, London, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2006(a).

FONSECA, C. A. et al. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 1699-1707, 2006(b).

GRAVEKAMP, C. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, U. K, v. 139, n. 8, p. 1691-1700, 1993.

KEE, S. H. et al. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, London, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KOSITANONT, U. et al. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 57, n. 2, p. 117-122, 2007.

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

LUCCHESI, P. M. A. et al. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 2, p. 131-134, 2004.

McBRIDE, A. J. A. et al. Evaluation of the *EIE-IgM-Leptospirose* assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 206-211, 2007.

McBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

MERIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

OLIVEIRA, M. A. A. et al. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 52, n. 2, p. 127-135, 2003.

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**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 247-257, 2006.

PAULA, V. S.; VILLAR, L. M.; GASPAR, A. M. C. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus in serum and stool samples. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 135-141, 2004.

POERSCH, C. O. et al. Dengue virus infection: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.

PLANK, R. DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microb. Infect.*, v. 2, n. XXX, p. 1265-1276, 2000.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; AGARWAL, S. W. Leptospirosis in India and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

Table 1. Leptospire used in the study.

Genomic species	Serovar	Strain
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Ballico
	Autumnalis	Akiyami A
	Bataviae	Van Tienem
	Bratislava	Jez-Bratislava
	Canicola	Hond Utrecht IV
	Djasiman	Djasiman
	Hardjo	Hardjioprajitno
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Copenhageni	M20
	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Sallinem
	Saxkoebing	Mus 24**
	Sentot	Sentot*
	Szwajizak	Szwajizak*
	Wolffi	3705
<i>Leptospira biflexa</i>	Andamana	CH 11*
	Patoc	Patoc 1*
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Castellonis	Castellon 3*
	Hardjo (hardjobovis)	Sponselee*
	Javanica	Veldrat Batavia 46
	Mini	Sari*
	Sejroe	M84
	Tarassovi	Perepelitsin
<i>Leptospira kirschneri</i>	Butembo	Butembo*
	Cynopteri	3522 C
	Grippotyphosa	Moskva V
<i>Leptospira nogushii</i>	Panama	CZ 214 K
<i>Leptospira santarosai</i>	Shermani	LT 821
<i>Leptospira weilii</i>	Celledoni	Celledoni

*strains used only for MAT assays

**strain used only for molecular assays

Table 2. IgM ELISA and PCR results for leptospirosis diagnosis, stratified according to MAT results.

MAT (<i>n</i> = 66)	IgM ELISA*		Blood PCR		Urine PCR		PCR**	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg
Laboratory-confirmed cases (<i>n</i> = 15)	15	0	7	8	6	9	10	5
Laboratory-probable cases (<i>n</i> = 13)	9	4	2	11	4	9	5	8
Unconfirmed cases (<i>n</i> = 38)	16	21	10	28	6	32	14	24
Total	40	25	19	47	16	50	29	37

* 1 case not-determinate

** PCR results of either blood or urine samples

Table 3. MAT, IgM ELISA and PCR positive results for leptospirosis obtained from analysis of 66 clinical samples, stratified according to days after onset of symptoms.

Days* (<i>n</i> = 66)	MAT**	IgM ELISA	Blood PCR	Urine PCR	PCR***
1 to 2	0	2	3	0	3
3 to 4	5	7	6	7	9
5 to 8	7	16	5	4	8
9 to 12	14	11	5	5	9
> 12	2	4	1	0	0

*days after onset of symptoms

** Confirmed or probable cases

*** Either blood or urine samples

Table 4. Sensitivity and specificity of IgM ELISA and PCR assays when compared to MAT for diagnosis of leptospirosis in 66 clinical samples.

<i>n</i> = 66	IgM ELISA	PCR						Either PCR**
		G1/G2 primer pair			A/B primer pair			
		Urine	Blood	Either*	Urine	Blood	Either*	
Sensitivity	85.71%	35.71%	35.71%	60.71%	7.14%	3.57%	7.14%	53.57%
Specificity	56.76%	73.68%	73.68%	65.79%	94.74%	100%	94.74%	63.16%

*PCR performed on either blood or urine samples

**PCR using either primer set and clinical samples.

5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de adequar os parâmetros de PCR previamente descritos para os sistemas moleculares selecionados para uso nesse estudo, desenvolvemos uma etapa de validação e otimização metodológica prévia ao estudo das amostras clínicas. As técnicas moleculares utilizadas apresentaram boa concordância com estudos anteriores, em que houve descrição do limite de sensibilidade do sistema de iniciadores A/B em 1 pg (MERIEN *et al.*, 1992) e do sistema G1/G2 em 10 células (FONSECA *et al.*, 2006; GRAVEKAMP *et al.*, 1993).

Houve amplificação do DNA de todas as cepas-padrão testadas com a utilização de ambos os sistemas de PCR. Apesar da descrição inicial do sistema G1/G2 afirmar que esse conjunto de iniciadores não é capaz de amplificar as cepas de *L. kirschneri* (GRAVEKAMP *et al.*, 1993), no presente estudo essas cepas foram amplificadas, apesar de apresentarem padrão de amplificação menos intenso que as demais cepas. Como já havia sido previamente relatado, o uso de quantidades relativamente grandes de DNA – como no caso de DNA isolado a partir de cultivo *in vitro* – pode levar à amplificação do DNA de *L. kirschneri* pelo conjunto de iniciadores G1/G2 (OOTEMAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Posteriormente à etapa de otimização das metodologias moleculares, realizamos um estudo comparativo para determinar a melhor amostra clínica para pesquisa de leptospiros circulantes (leptospiremia), conforme descrito no primeiro artigo da seção “Resultados”. A avaliação dos dados obtidos indicou que amostras de sangue total apresentam sensibilidade maior na amplificação do DNA quando comparadas com DNA de amostras de plasma ou soro obtidas nas mesmas condições de contaminação *in vitro*. Um estudo similar descreveu que *buffy coat* apresentou maior sensibilidade na detecção de leptospiros quando comparado com amostras de plasma e soro (KOSITANONT *et al.*, 2007). De acordo com esses autores, a razão para o maior limite de detecção do DNA das leptospiros em amostras de *buffy coat* seria a internalização das bactérias nos leucócitos circulantes. É possível que isso também justifique o que ocorre com amostras de sangue periférico, com a vantagem de que esse material dispensa a etapa de centrifugação necessária para a obtenção do *buffy coat* a partir do sangue total. Como as leptospiros são bactérias aderentes, mas não intracelulares obrigatórias (BAROCCHI *et al.*, 2002), o limite de detecção para o DNA dessas bactérias deveria ser maior na fração celular sanguínea (sangue total e *buffy coat*) do que na fração

acelular (soro e plasma). O protocolo de PCR utilizando o conjunto de iniciadores G1/G2 empregado nesse estudo apresentou sensibilidade menor quando comparado com um protocolo similar utilizando o mesmo conjunto de iniciadores (OOTEMAN *et al.*, 2006).

Paralelamente, tentamos definir qual seria o impacto da amplificação concomitante de um gene endógeno (beta globina) sobre a sensibilidade dos sistemas moleculares voltados à detecção do DNA de *Leptospira* spp. A amplificação parcial do gene da beta globina foi detectada tanto em sistemas *monoplex* quanto em sistemas *duplex* utilizando amostras de DNA obtidas a partir de sangue total, de modo a agir adequadamente como controle interno para extração e amplificação do DNA. Apesar de ter sido possível detectar a amplificação da beta globina nos sistemas *duplex*, a sensibilidade analítica dos conjuntos de iniciadores específicos A/B e G1/G2 foi menor quando comparada com aquela dos sistemas *monoplex*. Mesmo que a amplificação no sistema *duplex* tenha base não-competitiva, a presença de pequena quantidade de alvos moleculares de *Leptospira* spp. pode ter favorecido a amplificação do gene da beta globina, presente em quantidade maior. Não foi possível detectar a amplificação parcial do gene da beta globina no DNA isolado a partir de amostras de plasma ou soro (dados não apresentados), possivelmente em virtude da ausência de DNA genômico humano, presente em material celular. Aparentemente, não há relato prévio do uso do gene endógeno da beta globina como controle interno para a detecção molecular de leptospiros obtidas a partir de amostras de sangue total.

O limite de detecção em amostras de sangue total tanto nos ensaios *monoplex* quanto *duplex* foi menor quando comparado com aquele obtido a partir de culturas bacterianas puras (GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*, 1992). Apesar do limitado significado clínico, esses resultados sugerem que compostos inibitórios presentes no sangue, como derivados da hemoglobina, possam interferir na reação de amplificação por PCR, como foi previamente sugerido (FONSECA *et al.*, 2006a; BOOM *et al.*, 1990).

Os fragmentos do gene *secY* gerados pelo conjunto de iniciadores G1/G2 constituem uma ferramenta molecular confiável para o diagnóstico das leptospiros (FONSECA *et al.*, 2006a; FONSECA *et al.*, 2006b; OOTEMAN *et al.*, 2006; BAL *et al.*, 1994; GRAVEKAMP *et al.*, 1993), mas não há estudos publicados quanto à

análise das seqüências do gene *secY* ou seu uso potencial para a classificação genotípica das leptospiras presentes em amostras clínicas. No segundo artigo da seção “Resultados”, comparamos seqüências parciais do gene *secY* de leptospiras patogênicas para verificar seu potencial uso na identificação molecular dos genótipos de *Leptospira* spp.

O seqüenciamento do fragmento do gene *secY* gerado pela amplificação com os iniciadores G1/G2 não foi capaz de genotipar molecularmente a cepa infectante. A comparação das seqüências de DNA obtidas para as várias cepas de referência estudadas mostrou mínimo polimorfismo genético na região estudada, o que não foi suficiente para a classificação molecular da bactéria. Apesar de o polimorfismo presente na região avaliada do gene *secY* ser insuficiente para a genotipagem, a utilização conjunta dessa informação com os dados epidemiológicos pode sugerir o genótipo infectante.

Outras regiões genômicas das leptospira têm sido testadas para potencial identificação molecular, incluindo os genes rRNA 16S e 23S, o antígeno-O da sintase e seqüências de inserção (WANGROONGSARB *et al.*, 2007). Além disso, a utilização de diferentes abordagens moleculares têm sido propostas para a genotipagem, com a aplicação de técnicas como RFLP, RAPD, PFGE, seqüenciamento de DNA, ribotipagem, MLVA e MLST (KOSITANONT *et al.*, 2007).

Essas metodologias permitem a classificação molecular de algumas cepas, mas até o presente momento essas técnicas não foram capazes de caracterizar individualmente os principais genótipos de relevância clínica, principalmente aqueles relacionados aos sorovares Canicola, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae. Paralelamente, a classificação obtida a partir de vários desses métodos moleculares é muitas vezes conflitante com a classificação fenotípica obtida a partir do MAT (AHMED *et al.*, 2006; McBRIDE *et al.*, 2005). Recentemente, foi descrita uma metodologia empregando a tipagem de seqüência de múltiplos *loci* (MLST), capaz de diferenciar as principais cepas clinicamente relevantes, incluindo aquelas citadas acima (AHMED *et al.*, 2005). Infelizmente, essa técnica apresenta uma série de dificuldades técnicas, o que restringe bastante sua aplicação à rotina diagnóstica.

Apesar de a identificação dos genótipos apresentar relevância clínica controversa tanto em infecções humanas quanto animais (GOLDSTEIN *et al.*, 2006; ESEN *et al.*, 2004; FAUCHER *et al.*, 2004), essa informação tem um impacto

claramente importante nas investigações epidemiológicas (McBRIDE *et al.*, 2005; LEVETT, 2001).

A definição precoce dos casos de leptospirose requer um método diagnóstico rápido, sensível e de fácil execução. O diagnóstico precoce é crucial para aumentar as chances de antibioticoterapia bem-sucedida e reduzir os riscos de danos teciduais em infecções humanas. Os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico da leptospirose humana (MERIEN *et al.*, 2005; KEE *et al.*, 1994; GRAVEKAMP *et al.*, 1993; MERIEN *et al.*, 1992), sugerindo que a detecção rápida das leptospirosas pela PCR pode preceder a detecção de anticorpos específicos e suplantam a necessidade de isolamento e cultura (OOTEMAN *et al.*, 2006). No terceiro artigo proposto na seção “Resultados”, realizamos a comparação de dois ensaios de PCR distintos utilizando amostras clínicas de sangue total e urina com os testes sorológicos ELISA IgM e MAT para verificar o impacto sobre o diagnóstico da leptospirose humana.

Diferenças no limite de detecção dos sistemas de PCR entre DNA bacteriano obtido de meio de cultura e de amostras clínicas podem ser devidas à presença de compostos inibitórios, como hemoglobina e seus derivados, como já mencionado (BOOM *et al.*, 1991; FONSECA *et al.*, 2006a; FONSECA *et al.*, 2006b). Apesar de as amostras de sangue e urina serem obtidas de um indivíduo saudável e contaminadas *in vitro* com leptospirosas, a sensibilidade analítica da PCR foi maior para amostras de urina do que para amostras de sangue. Entretanto, outros compostos inibitórios gerados como consequência da infecção por *Leptospira*, como produtos da insuficiência renal e do processo inflamatório, podem levar a um padrão de inibição diferente na PCR realizada a partir de amostras clínicas, contaminadas *in vivo*.

O principal desafio no diagnóstico laboratorial da leptospirose é definir o caso quando os resultados do MAT e das provas sorológicas são negativos (FONSECA *et al.*, 2006a). Relatos anteriores descrevem a ocorrência simultânea de resultados de PCR positivos e de MAT negativos, mas não houve seguimento da maioria dos casos relatados e a interpretação dos dados se tornou difícil (FONSECA *et al.*, 2006a; FONSECA *et al.*, 2006b; OOTEMAN *et al.*, 2006; KEE *et al.*, 1994; BAL *et al.*, 1994). No presente estudo, a PCR realizada a partir de amostras de sangue ou urina detectou precocemente o DNA das leptospirosas em 71,4% dos pacientes

soronegativos, com soroconversão posterior confirmada com análise pelo MAT de amostras pareadas. Assim sendo, resultados de PCR positivos em amostras de sangue ou urina obtidas de pacientes soronegativos pelo MAT podem ser devidos ao diagnóstico precoce, ao invés de constituírem resultados moleculares falso-positivos. Esses achados reforçam que a PCR pode potencialmente ser uma ferramenta complementar útil para o diagnóstico precoce da leptospirose.

Além de detectar a eliminação de leptospiras na urina durante os primeiros 10 dias após a instalação dos sintomas, foram encontradas evidências de eliminação a longo prazo. Uma amostra clínica de urina coletada 130 dias após a instalação da fase aguda da doença apresentou resultados de PCR positivos (dados não apresentados), sugerindo infecção persistente. Estudos anteriores relatam a detecção molecular de leptospiras eliminadas na urina até um ano após os primeiros sintomas clínicos. Como os pacientes desse e daquele estudo foram submetidos à terapia antimicrobiana, os dados sugerem que alguns antibióticos utilizados no tratamento da leptospirose podem não alcançar concentração renal suficiente para eliminar as bactérias (BAL *et al.*, 1994). A fim de verificar o grau de infecção dos túbulos renais, avaliar sua persistência e eventual impacto sobre o sistema renal do indivíduo seria necessário monitorar periodicamente a excreção de leptospiras na urina de pacientes com diagnóstico confirmado de leptospirose, por um período de aproximadamente 12 meses após a instalação sintomatológica. A partir dos dados obtidos nesse modelo, seria possível definir com maior exatidão a relevância da leptospiúria tanto para o diagnóstico laboratorial quanto para a evolução clínica do paciente.

A sensibilidade total da PCR considerando os conjuntos de iniciadores G1/G2 e A/B e amostras de sangue e urina foi de 53,6%. Entretanto, a melhor sensibilidade nos ensaios de PCR (60,7%) foi alcançada quando somente os iniciadores G1/G2 e ambas as amostras biológicas foram consideradas. A primeira descrição dos iniciadores G1/G2 relatou sensibilidade de 50,0% em amostras de soro (GRAVEKAMP *et al.*, 1993). Os resultados do presente estudo corroboram com estudos similares utilizando o mesmo conjunto de iniciadores, em que foram encontradas sensibilidades variando entre 28,0% em amostras de urina e 62,0% em amostras de sangue e/ou urina (BROWN *et al.*, 1995; BAL *et al.*, 1994). Estudos conduzidos no Brasil utilizando o mesmo sistema de PCR também mostram variação

na sensibilidade, com 34,0% em amostras de soro (OOTEMAN *et al.*, 2006), 65,0% em amostras de *buffy coat* ou urina (FONSECA *et al.*, 2006a) e 57,6% em amostras tanto de sangue quanto de urina (FONSECA *et al.*, 2006b).

No presente trabalho, a sensibilidade observada para o teste ELISA IgM foi 85,7%, com especificidade de 56,8%. Um estudo recente usando o mesmo kit comercial reportou sensibilidade de 75,5% e especificidade de 93,3% (McBRIDE *et al.*, 2007). Uma vez demonstrado que o ELISA IgM detecta anticorpos específicos meses após a infecção, a discrepância observada na especificidade do teste pode ser devida a resultados falso-positivos, como referido previamente (McBRIDE *et al.*, 2007; ABDULKADER *et al.*, 2002) e provavelmente observado nesse estudo nas duas amostras com resultados positivos de ELISA IgM nos dois primeiros dias após a instalação sintomatológica.

Apesar da PCR convencional utilizando os iniciadores G1/G2 permitir o diagnóstico precoce da leptospirose humana, o limite mínimo de detecção obtido para amostras de sangue total, a partir do protocolo de PCR utilizado no presente estudo, requer ao menos 5×10^3 bactérias/ml. Essa carga bacteriana parece só estar presente nos quadros de leptospirose grave, como casos fatais com envolvimento pulmonar (SEGURA *et al.*, 2005), o que impossibilita o diagnóstico precoce em casos brandos. Desse modo, o diagnóstico molecular poderia ser melhorado utilizando a tecnologia de PCR em tempo real. Com o emprego do sistema de monitoramento TaqMan[®], seria possível alcançar a sensibilidade e a especificidade obtidas em ensaios de hibridização pós-PCR, conjugadas à amplificação em tempo real. Com a metodologia de PCR em tempo real, seria possível eliminar as etapas de processamento pós-PCR, diminuindo o risco de contaminações e conseqüentes resultados falso-positivos, além de reduzir o tempo necessário para a liberação do resultado. Por sua natureza quantitativa, a PCR em tempo real também permitiria mensurar a carga bacteriana nas amostras analisadas, fornecendo um resultado mais informativo e preciso do que o resultado qualitativo da PCR convencional.

Até o momento foram propostos alguns alvos potenciais para sistemas de detecção em tempo real, como rRNA 16S (SMYTHE *et al.*, 2002) e rRNA 23S (WOO *et al.*, 1997). Como esses genes são altamente conservados e estão presentes em todos os genótipos de *Leptospira*, independentemente de seu potencial patogênico, a amplificação desses alvos moleculares pode levar a resultados falso-positivos e a

quantificações não-confiáveis devido à detecção de genótipos saprofíticos eventualmente presentes nas amostras. Mais recentemente, foram descritos sistemas de detecção utilizando como alvos moleculares genes codificantes para fatores de virulência ou proteínas de membrana envolvidas na patogênese, como *lipL32* (LEVETT *et al.*, 2005) e os genes *ligA* e *ligB* (PALANIAPPAN *et al.*, 2005). Outros alvos potenciais para os ensaios de PCR em tempo real seriam *lipL41*, *lipL45*, *ompL1* e *loa22*, genes codificantes de proteínas de membrana externa com potencial imunogênico importante cuja expressão está aumentada durante o processo de infecção do hospedeiro (NALLY *et al.*, 2007; RISTOW *et al.*, 2007).

Outro avanço seria a utilização de técnicas de extração de DNA baseadas no método de Boom (BOOM *et al.*, 1990), com a utilização de sílica magnetizada. Como padrão-ouro para extração de DNA, essa tecnologia confere alta eficiência à extração de DNA com esgotamento das amostras (TANG *et al.*, 2005). Além disso, o DNA extraído apresenta rendimento e pureza superiores aos obtidos com as técnicas convencionais (SCHUURMAN *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2005). A possibilidade de automação reduziria os riscos de contaminação cruzada entre as amostras, além de permitir o processamento de um número maior de amostras simultaneamente (LOENS *et al.*, 2007; STEVENS *et al.*, 2007). Além disso, a automação promoveria a uniformização das etapas no processo de extração do DNA, minimizando variações de rendimento ou pureza decorrentes do processo manual. Paralelamente, as técnicas de extração baseadas no método de Boom são mais versáteis do que as técnicas baseadas em colunas de eluição, permitindo a extração concomitante de DNA a partir de uma gama mais ampla de amostras clínicas. Isso permitiria padronizar um único método de extração de DNA para amostras de sangue total, soro, plasma, urina e biópsias, facilitando a avaliação comparativa dos resultados obtidos.

O LACEN-PR dispõe, em seu parque tecnológico, dos aparatos necessários tanto para o desenvolvimento de testes na plataforma PCR em tempo real quanto para a automação da extração do DNA pelo método de Boom. A utilização conjunta dessas duas tecnologias elevaria o diagnóstico molecular da leptospirose humana a nível quantitativo, com aumento da sensibilidade e da especificidade do teste.

A implantação de um teste para o diagnóstico molecular da leptospirose humana representa um grande avanço em relação às ferramentas laboratoriais

disponíveis, uma vez que permite o diagnóstico dessa doença a partir do primeiro dia após a infecção, quando comparado com os 7 dias necessários para o diagnóstico sorológico. Com isso, pode-se aumentar a captação de casos pelo sistema de vigilância VE-SIFA, instalar antibioticoterapia adequada mais precocemente e facilitar o diagnóstico em casos de manifestações atípicas, como quadros pulmonares graves e meningites.

6 CONCLUSÕES

As amostras de sangue total colhido em EDTA apresentaram melhor desempenho do que as amostras de plasma e soro na pesquisa molecular da leptospiremia humana, em virtude do maior limite de detecção.

A análise de amostras clínicas pareadas de pacientes com leptospirose mostrou que os métodos moleculares permitem a detecção do DNA bacteriano em amostras de sangue total ou urina anteriormente à soroconversão. Esse fato demonstra que os métodos moleculares avaliados permitem o diagnóstico precoce da infecção.

O conjunto de iniciadores G1/G2 apresentou maiores sensibilidade e especificidade na análise de amostras de sangue total e urina quando comparado com o conjunto de iniciadores A/B.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDULKADER, R. C. R. M. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 79-83, 2002.
- ABDULKADER, R. C. R. M. Acute renal failure in leptospirosis. **Renal Failure**, Oxfordshire, v. 19, n. 2, p. 191-198, 1997.
- AGUDELO-FLÓREZ, P. et al. Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la leptospirosis humana. **Biomédica**, Bogotá v. 26, n. 2, p. 216-223, 2006.
- AHMED, S. N.; SHAH, S; AHMAD, F. M. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 195-200, 2005.
- ALEXANDER, A. D. et al. Leptospirosis in Puerto Rico. **Zoonoses Research**, New York, v. 2, p. 152-227, 1963.
- ANDERS, H. J.; BANAS, B.; SCHLÖNDORFF, D. Signaling danger: Toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington D. C., v. 15, n. 4, p. 854-867, 2004.
- ANTONIADIS, A. et al. Comparison of the clinical and serological diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and leptospirosis. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 11, n. 1, p. 91-92, 1995.
- AOKI, T.; KOIZUMI, N.; WATANABE, H. A case of leptospirosis probably caused by drinking contaminated well-water after an earthquake. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 54, n. 6, p. 243-244, 2001.
- BACTERIÓL, S. N. et al. Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano. **Salud Publica de México**, Cuernavaca, v. 47, n. 3, p. 240-244, 2005.
- BAJANI, M. D. et al. Evaluation of four commercially available serologic tests for the diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 41, n. 2, p. 803-809, 2003.
- BAL, A. E. et al. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesion mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.
- BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cells monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

BELMACHER, I. et al. Risk of transmission of leptospirosis from infected cattle to dairy workers in Southern Israel. **Israel Medical Association Journal**, Israel, v. 6, n. 1, p. 24-27, 2004.

BINDER, W. D. et al. Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine**, New York, v. 16, n. 6, p. 851-856, 1998.

BLACKSELL, S. D. et al. Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* Immunoglobulin M antibodies in Laos. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington D. C.; v. 13, n. 10, p. 1166-1169, 2006.

BOLAND, M. et al. A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition in the River Liffey. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 195-200, 2004.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica**. Série histórica de óbitos e casos de doenças de notificação compulsória no Brasil (1980 – 2005) [on line]. Disponível: http://portal.saude.gov.br/portal/svs/area.cfm?id_area=451 [capturado em 19 set. 2006].

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. **EIE – IgM – Leptospirose**. Rio de Janeiro, 2005.

BROWN, P. D. et al. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 8, p. 581-586, 2003.

BROWN P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 43, n. 2, p. 110-114, 1995.

BURTH, P. et al. Role of nonesterified unsaturated fatty acids in the pathophysiological processes of leptospiral infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 1, p. 51-57, 2005.

CAMPAGNOLO, E. R. et al. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected suines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 216, n. 5, p. 676-682, 2000.

CHANDRASEKARAN, S; GOMATHI, S. A standard screening test for the early and rapid diagnosis of leptospirosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 22, n. 1, p. 23-27, 2004.

CHAPPEL, R. J. et al. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 42, n. 12, p. 5484-5488, 2004.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

CRODA, J. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

de FOST, M. et al. Interleukin12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington D. C., v. 10, n. 2, p. 332-335, 2003.

DIAMENT, D. et al. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoproteins. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 70, n. 4, p. 1677-1683, 2002.

DOLHNIKOFF, M. et al. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations of leptospirosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 142-148, 2007

DORIGATTI, F. et al. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 6, p. 909-914, 2005.

DOUDIER, B. et al. Prognostic factors associated with severe leptospirosis. **Clinical Microbiology and Infection**, U. K., v. 12, n. 3, p. 299-300, 2006.

EDWARDS, C. N.; LEVETT, P. N. Prevention and treatment of leptospirosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 2, n. 2, p. 293-298, 2004.

EDWARDS, C. N. et al. Leptospirosis in Barbados: a clinical study. **West Indian Medicine Journal**, Mona, v. 39, n. 1, p. 27-34, 1990.

EDWARDS, C. N. et al. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 39, n. 4, p. 388-390, 1988.

EDWARDS, C. N. et al. Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 35, n. 2, p. 352-354, 1986.

EDWARDS, C. N. et al. Thrombocytopenia in leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 31, n. 4, p. 827-829, 1982.

- EFFLER, P. V. et al. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 40, n. 4, p. 1464-1469, 2002.
- EFFLER, P. V. et al. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 38, n. 3, p. 1081-1084, 2000.
- EISENACH, K. D. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 161, p. 977-981, 1990.
- ELLINGHAUSEN, H. C. Jr; McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 26, p. 45-51, 1965.
- FAUCHER, J. F.; ESTAVOYER, B. H.; ESTAVOYER, J. M. The management of leptospirosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London, v. 5, n. 4, p. 819-827, 2004.
- FERRO, B. E. et al. Seroprevalence of leptospira infections in habitants of peripheral neighborhoods in Cali, Colombia. **Biomédica**, Bogotá, v. 26, n. 2, p. 250-257, 2006.
- FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 39, n. 9, p. 3303-3310, 2001.
- FONSECA, C. A. et al. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Infection**, London, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2006(a).
- FONSECA, C. A. et al. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 1699-1707, 2006(b).
- GOLDSTEIN, R. E. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 489-494, 2006.
- GONÇALVES, D. D. et al. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 135-140, 2006.
- GRAVEKAMP, C. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, U. K, v. 139, n. 8, p. 1691-1700, 1993.

GROBUSH, M. P. et al. Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic. **Journal of Travel Medicine**, Zurich, v. 10, n. 1, p. 55-58, 2003.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.

GUSSENHOVEN, G. C. et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 35, n. 1, p. 92-97, 1997.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospiral membrane proteins: variation on a theme? **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 121, n. 3, p. 143-145, 2005.

HEINEMAN, M. B. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HERNANDEZ, M. S. et al. Human leptospirosis outbreak in the district of Ciego de Ávila, Cuba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 1, p. 13-18, 1999.

HUDSON, C. P. et al. Severe primary HIV-1 infection among black persons in Barbados. **International Journal of STD & Aids**, London, v. 8, n. 6, p. 393-397, 1997.

HUNG, C. C. et al. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through Toll-like receptor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, New York, v. 21, n. 4, p. 898-910, 2006.

IM, J. -G. et al. Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. **American Journal of Roentgenology**, Baltimore, v. 152, n. 5, p. 955-959, 1989.

JANSEN, A. et al. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 7, p. 1048-1055, 2005.

JOHNSON, R. C., HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. **Journal of Bacteriology**, Washington D. C., v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.

KARANDE, S. et al. Leptospiral pneumonia. **Indian Journal of Pediatrics**, Calcutta, v. 72, n. 1, p. 86, 2005.

KAUFMANN, A. F. et al. *Leptospira* genomospecies definitions [on line]. Disponível: <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Strains.html> [capturado em 19 set. 2006].

KEE, S. H. et al. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

- KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, London, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.
- KOSITANONT, U. et al. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 57, n. 2, p. 117-122, 2007.
- LEVETT, P. N. et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2005.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington D. C., v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- LEVETT, P. N. et al. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington D. C., v. 8, n. 2, p. 349-351, 2001.
- LOENS, K. et al. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 45, n. 2, p. 421-425, 2007.
- LUCCHESI, P. M. A. et al. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 2, p. 131-134, 2004.
- MÁRQUEZ-MARTÍN, E. et al. Lung involvement in leptospirosis. **Archivos de Bronconeumología**, Barcelona, v. 42, n. 4, p. 202-204, 2006.
- MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 44, n. 9, p. 3154-3159, 2006.
- MATSUNAGA, J. et al. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 75, n. 6, p. 2864-2874, 2007.
- MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.
- McBRIDE, A. J. A. et al. Evaluation of the *EIE-IgM-Leptospirose* assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 206-211, 2007.
- McBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

- McCLAIN, J. B. L. et al. Doxycycline therapy for leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 100, n. 5, p. 696-698, 1984.
- MEITES, E. et al. Reemerging leptospirosis, California. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 3, p. 406-412, 2004.
- MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, n. 1, p. 281-285, 1995.
- MERIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, ano IV, n. 04, 2004.
- MOLL van CHARANTE, A. W. et al. Occupational risks of zoonotic infections in Dutch forestry workers and muskrat catchers. **European Journal of Epidemiology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 109-116, 1998.
- MORGAN, J. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 2, p. 1593-1599, 2002.
- NALLY, J. E. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.
- NAIMAN, B. M. et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo: involvement of WC1⁺γδ and CD4 T cells. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 70, n. 11, p. 6147-6157, 2002.
- NAKAMURA, M. et al. Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the Northern part of Okinawa Main Island. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 83-85, 2006.
- NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 4, p. 459-478, 2004(a).
- NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, Washington D. C., v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004(b).
- NATARAJASEENIVASAN, K. et al. Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. **Japanese Journal of Infectious Disease**, Tokyo, v. 55, n. 5, p. 170-173, 2002.

- NEVES, F. O. et al. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Archives of Microbiology**, New York, in press, 2007.
- OLIVEIRA, M. A. A. et al. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 52, n. 2, p. 127-135, 2003.
- 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**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 247-257, 2006.
- PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Evaluation of *lig*-based conventional and real-time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, n. 2, p. 111-117, 2005.
- PAPPACHAN, M. J.; SHEELA, M.; ARAVINDAN, K. P. Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. **Journal of Epidemiology and Community Health**, London, v. 58, n. 12, p. 1054-1055, 2005.
- PAULA, V. S.; VILLAR, L. M.; GASPARI, A. M. C. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus in serum and stool samples. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 135-141, 2004.
- PEREIRA, M. M. et al. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 72, n. 1, p. 13-20, 2005.
- PEREIRA, M. M. et al. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 38, n. 1, p. 450-452, 2000.
- POERSCH, C. O. et al. Dengue virus infection: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.
- RAMACHANDRAN, S. et al. Patterns of acute renal failure in leptospirosis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 79, n. 7, p. 158-160, 1976.
- RATHINAM, S. R. Ocular manifestations of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 189-194, 2005.
- REN, S-X. et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, London, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.
- RISTOW, P. et al. The Omp-A like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. 894-903, 2007.

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

ROMERO, E. C. et al. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 36, n. 5, p. 1453-1455, 1998.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; AGARWAL, S. W. Leptospirosis in India and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

SCHRÖPPEL, B.; HE, J. C. Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. **Kidney International**, New York, v. 69, n. 5, p. 785-787, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Boletim Epidemiológico**. Curitiba, ano IV, edição especial, 2001.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Boletim Epidemiológico**. Curitiba, ano VIII, n. 23, 2005.

SEGURA, E. R. et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 343-351, 2005.

SEGURO, A. C.; LOMAR, A. V.; ROCHA, A. S. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. **Nephron**, Basel, v. 55, n. 2, p. 146-151, 1990.

SEHGAL, S. C. et al. Field application of lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 10, p. 897-901, 2003.

SEHGAL, S. C.; MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P. Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in North Andaman. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 102, p. 9-12, 1995.

SEIJO, A. et al. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 1004-1005, 2002.

SEJVAR, J. et al. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 6, p. 702-707, 2003.

SCHUURMAN, T. et al. Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for a *Salmonella enterica* 5'-nuclease assay. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, ahead of print, 2007.

- SLACK, A. et al. Evaluation of a modified TaqMan assay detecting pathogenic leptospires spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 57, n. 4, p. 361-366, 2007.
- SMYTHE, L. D. et al. A quantitative PCR (TaqMan) for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 13, p. 1-7, 2002.
- SMITS, H. L. et al. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington D. C., v. 8, n. 1, p. 166-169, 2001.
- SMITS, H. L. et al. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 37, n. 9, p. 2904-2909, 1999.
- SILVA, H. R. et al. Leptospiral infection and subclinical presentation among children in Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 2, p. 227-233, 2003.
- SPICHLER, A. et al. Weil's Disease: an unusual fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 336-340, 2005.
- STEFOS, A. et al. Leptospirosis and pancytopenia: two case reports and review of literature. **Journal of Infection**, London, v. 51, n. 5, p. 277-280, 2005.
- STEVENS, W., HORSFIELD, P., SCOTT, L. E. Evaluation of the performance of the automated NucliSens easyMAG and easyQ systems versus the Roche AmpliPrep-AMPLICOR combination for the high-throughput monitoring of human immunodeficiency virus load. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D.C., v. 45, n. 4, p. 1244-1249, 2007.
- TANG, Y. W. et al. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D.C., v. 43, n. 9, p. 4830-4833, 2005.
- THOMAS, D. D., HIGBIE, L. M. *In vitro* association of leptospires with host cells. **Infection and Immunity**, Washington D. C, v. 58, n. 3, p. 581-585, 1990.
- TURNER, L. H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 64, n. 4, p. 623-646, 1970.
- VAN EYS, G. J. J. M. et al. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.

- VIEIRA, M. L. et al. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. **International Journal of Infectious Diseases**, U. K., v. 10, n. 5, p. 378-386, 2005.
- VISITH, S., KEARKIAT, P. Nephropathy in leptospirosis. **Journal of PostGraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 184-188, 2005.
- WANGROONGSARB, P. et al. Molecular identification of *Leptospira* spp. based on putative O-antigen polymerase gene (*wzy*), the benefit over 16S rRNA gene sequence. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 271, n. 2, p. 170-179, 2007.
- WATT, G. et al. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8583, p. 433-435, 1988.
- WENHAI, L.; JIANZHONG, Z.; CAO, Y. Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate. **Dermatology**, Basel, v. 208, n. 2, p. 94-97, 2004.
- WINEARLS, C. G. et al. Acute renal failure due to leptospirosis: clinical features and outcome in six cases. **The Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 53, n. 212, p. 487-495, 1984.
- WOLGEMUTH, C. W. et al. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v. 11, n. 3-5, p. 221-227, 2006.
- WOO, T. H. S. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 35, n. 12, p. 3140-3146, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta, 2003.
- YASUDA, P. H. et al. Deoxiribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposal of seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 37, p. 407-415, 1987.
- YANG, C. W. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney International**, New York, v. 69, n. 5, p. 815-822, 2006.
- YANG, C. W., WU, M. Z., PAN, M. J. Leptospirosis renal disease. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 73-77, 2001.
- YOUNES-IBRAHIM, M. et al. Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 213-223, 1997.

YURI, Z. et al. Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 61, n. 5, p. 2270-2272, 1993.

ZAKI, S. R. et al. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. **The Lancet**, London, v. 347, n. 9000, p. 535-536, 1996.

ANEXO 1. DADOS BRUTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Identificação do paciente	Registro	Idade	Sexo	Profissão	Bairro	Município
R. A. B.	U-01	15	M	Estagiário	Jd. Filadelfia	Araucária
M. P. C.	U-02	19	F	Estudante	Bockman	Paranaguá
C. J. M. S.	S e U-03	32	M	Pintor	Jd. Itambé	Colombo
J. J. A.	S e U-04	45	M	Morador de rua	Sítio Cercado	Curitiba
L. R. D. S.	S e U-05	15	M	Estudante	CIC	Curitiba
J. V. S.	U-06	47	M	Desempregado	Centro	Itaperucu
R. A. B. C.	S e U-07	33	F	do lar	Vila Nova	Matinhos
C. L. S.	U-08	65	F	Zeladora	CIC	Curitiba
M. S.	S-09	19	M	Repositor de atacado	Pilarzinho	Curitiba
E. G. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-11	33	F	do lar	Lagoinha	Mandirituba
H. R.	S e U-12	27	M	Operador de empilhadeira	Rio Pequeno	São José dos Pinhais
L. F.	S e U-13	59	F	Aposentada	Ribeirão Vermelho	Quitandinha
J. M. S.	S e U-14	66	M	Lavrador	CIC	Curitiba
B. M. S.	S-15	16	M	Estudante	Bom Jesus	Rio Negro
B. M. S.	S-16	16	M	Estudante	Bom Jesus	Rio Negro
D. G. D.	S-17	27	M	Auxiliar de produção	Umbará	Curitiba
L. C. M. A.	S e U-18	12	M	Estudante	Vila Verde/CIC	Curitiba
J. L. G.	S e U-19	12	M	Estudante	Tibotuva	Campo Largo
A. M. B.	S e U-20	47	F	Doméstica	Jd. Santa Cândida	Colombo
J. A.	S e U-21	20	M	Servente	Jd. Grazielle	Almirante Tamandaré
S. S. I.	S e U-22	43	M	Instrutor de trânsito	Vila Juliana	Piraquara
A. F. B. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-23	40	M	Pedreiro	Xaxim	Curitiba
E. S. F.	U-24	7	M	Estudante	Jd. Guaratuba	Colombo
A. A. N. F. (NÃO CONSIDERADO)	U-25	13	M	Estudante	Jd. Planalto	Almirante Tamandaré
A. M.	S-26	53	M	Funcionário da SANEPAR	Sítio Cercado	Curitiba
A. M.	S e U-27	53	M	Funcionário da SANEPAR	Sítio Cercado	Curitiba

Identificação do paciente	Registro	Idade	Sexo	Profissão	Bairro	Município
F. M. B. O.	S e U-28	23	F	Aux. escritório	Iguaçu	Fazenda Rio Grande
N. G. R. J.	So e L-29	13	M	Não informado	Não informado	Paranaguá
A. S.	S e U-30	56	M	Autônomo	Pinheirinho	Curitiba
F. M. B. O. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-31	23	F	Aux. escritório	Iguaçu	Fazenda Rio Grande
A. A.	S e U-32	17	M	Técnico em informática	Santa Cândida	Curitiba
T. K.	S e U-33	61	M	Aposentado	Cajuru	Curitiba
M. R. C.	S e U-34	20	M	Pintor	Não informado	Almirante Tamandaré
F. A. L. N.	S e U-35	9	M	Estudante	CIC	Curitiba
E. E. S. B. M (<i>post mortem</i>)	So e L-36	5	M	Menor	Não informado	Londrina
L. R. C.	S e U-37	27	M	Pintor	Centro	Rebouças
B. S. P.	S e U-38	13	M	Estudante	Centro	Araucária
J. C. D. A.	S e U-39	11	M	Estudante	Morro Grande	Colombo
P. H. S. B.	S e U-40	13	M	Estudante	CIC	Curitiba
A. J. C. P.	S e U-41	42	M	Auxiliar de enfermagem	Capão da Imbuia	Curitiba
A. J. C. P.	S e U-42	42	M	Auxiliar de enfermagem	Capão da Imbuia	Curitiba
L. S. M.	S e U-43	13	M	Estudante	Rio Verde	Colombo
Z. A. S.	U-44	25	F	Não informado	Não informado	Não informado
R. M. S.	S e U-45	29	M	Marceneiro	Capão Raso	Curitiba
E. C. R.	S e U-46	29	M	Pedreiro	Planta Santa	Colombo
L. O. A.	S e U-47	69	F	do lar	Não informado	Não informado
E. C. R.	S-48	29	M	Pedreiro	Jd Bom Pastor	Campo Magro
T. A. L.	S e U-49	17	M	Estudante	Bacacheri	Curitiba
B. M. M.	S e U-50	15	M	Estudante	Vila Alto Pinheiro	Almirante Tamandaré
F. F. P.	S e U-51	14	M	Estudante	Uberaba	Curitiba
N. F. A.	S e U-52	60	F	Catadora de Papel	Portão	Curitiba
P. C. F.	S e U-53	81	F	do lar	Ilegível	Rio Branco do Sul
P. C. F. (2ª amostra)	S e U-54	81	F	do lar	Ilegível	Rio Branco do Sul

Identificação do paciente	Registro	Idade	Sexo	Profissão	Bairro	Município
S. L. F.	S e U-55	25	M	Catador de papel	Jd. Guairatuba	Colombo
F. O.	U-56	25	M	Estudante	São Gabriel	Colombo
G. B. S.	S e U-57	30	M	Motorista	Prado	Colombo
R. C.	S e U-58	36	M	Caseiro de chácara	Bairro Alto	Antonina
S. S. G.	S e U-59	27	M	Desempregado	Conjunto Residencial	Pinhais
F. O. (2ª amostra)	S e U-60	25	M	Estudante	São Gabriel	Colombo
M. J. S.	S e U-61	12	M	Estudante	Afonsa Pena	São José dos Pinhais
C. R. R.	S e U-62	17	M	Latoeiro	Parque São Jorge	Almirante Tamandaré
J. N.	S e U-63	19	F	Estudante	Bairro Alto	Curitiba
C. R. R. (2ª amostra)	S e U-64	17	M	Latoeiro	Parque São Jorge	Almirante Tamandaré
C. A. O.	S e U-65	45	F	Comerciante	Xaxim	Curitiba
M. J. S. (2ª amostra)	S e U-67	12	M	Estudante	Afonsa Pena	São José dos Pinhais
R. L. S.	S-68	32	M	Não informado	Sítio Cercado	Curitiba
T. P. A.	S-69	68	F	Não informado	Não informado	Não informado
C. A. O. (2ª amostra)	S e U-70	45	F	Comerciante	Xaxim	Curitiba
P. C. B. M.	S e U-71	18	M	Auxiliar de serviços gerais	Jd. Bonilaura	Pinhais
A. R. B.	S e U-72	32	F	do lar	Afonso Peba	São José dos Pinhais
S. A. I.	S e U-73	22	M	Estudante	Santa Felicidade	Curitiba
G. W. C. R.	S e U-74	16	M	Estudante	Santa Felicidade	Curitiba
C. A. M. M. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-75	7	F	Estudante	Bairro Alto	Curitiba
D. M. R. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-76	12	M	Estudante	Cajuru	Curitiba
B. R. M.	S e U-77	14	M	Estudante	Não informado	Não informado
R. D. S.	S e U-78	19	M	Desempregado	Alto da XV	Curitiba
V. Q.	S e U-79	Não informado	M	Serralheiro	Não informado	Não informado
O. B. F.	S e U-80	41	M	Motoboy	Tatuquara	Curitiba
J. G. S. S.	S-81	11 m	M	Não informado	Não informado	Não informado
R. P. (NÃO CONSIDERADO)	S-82	25	M	Tratorista	Pinheirinho	Curitiba

Identificação do paciente	Registro	Idade	Sexo	Profissão	Bairro	Município
S. M. D.	S e U-83	45	F	do lar	Não informado	Não informado
R. D. S.	S e U-84	19	M	Estudante	Não informado	Não informado
E. P. L.	S e U-85	24	M	Pedreiro	Campo de Santana	Curitiba
J. M. J.	S e U-86	13	M	Estudante	Borda do Campo	São José dos Pinhais
J. R. S.	U-88	37	M	Pintor	Alto Boqueirão	Curitiba
R. P.	U-89	25	M	Tratorista	Pinheirinho	Curitiba
L. F. C. G.	S e U-90	80	M	Aposentado	Não informado	Não informado
J. A. D.	S e U-91	19	M	Estudante	Capão de Imbuia	Curitiba
S. M. D.	S e U-92	45	F	do lar	Capão da Imbuia	Curitiba
E. C.	S e U-93	28	M	Mecânico	Campo Comprido	Curitiba
T. D.	S e U-94	14	F	Estudante	Esgínia Maria	Curitiba
E. C.	S e U-95	28	M	Mecânico	Campo Comprido	Curitiba
N. C. C. F.	S e U-96	Não informado	F	Menor	Não informado	Não informado
J. F. F.	S e U-97	11	M	Menor	São João Batista	Almirante Tamandaré
C. L. S. (NÃO CONSIDERADO)	U-98	67	F	Aposentada	Não informado	Não informado
A. B. C.	S-100	Não informado	F	Não informado	Não informado	Não informado
J. B. S.	S-101	43	M	Não informado	Andracana	Londrina
T. B. L.	S e U-102	Não informado	M	Não informado	Não informado	Não informado
T. B. L. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-103	Não informado	M	Não informado	Não informado	Não informado
M. S. B. M. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-105	10	M	Estudante	Jardim Atuba	Pinhais
S. A. I. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-106	22	M	Estudante	Santa Felicidade	Curitiba
W. D. A.	U-107	25	M	Pedreiro	Bairro Alto	Curitiba

ANEXO 2. DADOS BRUTOS LABORATORIAIS

Identificação do paciente	Registro	Início dos sintomas	Data da coleta	Dias	PCR sangue	PCR urina	1ª ELISA	2ª ELISA	MAT
R. A. B.	U-01	1/8/2005	4/8/2005	3	ANR*	D*	NR*	ANR	TNR*
M. P. C.	U-02	1/4/2005	10/8/2005	130	ANR	D	R*	ANR	TNR
C. J. M. S.	S e U-03	4/8/2005	15/8/2005	11	ND*	D	R	R	R
J. J. A.	S e U-04	13/9/2005	27/9/2005	14	ND	ND	R	ANR	NR
L. R. D. S.	S e U-05	15/10/2005	21/10/2005	6	ND	ND	NR	R	TNR
J. V. S.	U-06	14/10/2005	22/10/2005	8	ANR	ND	NR	NR	TNR
R. A. B. C.	S e U-07	6/11/2005	8/11/2005	2	D	ND	NR	ANR	TNR
C. L. S.	U-08	31/10/2005	8/11/2005	8	ANR	D	R	ANR	TNR
M. S.	S-09	5/11/2005	10/11/2005	5	D	ANR	R	ANR	TNR
E. G. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-11	12/12/2005	20/12/2005	8	ND	ND	ANR	ANR	TNR
H. R.	S e U-12	26/12/2005	2/1/2006	7	ND	ND	R	ANR	R
L. F.	S e U-13	2/1/2006	11/1/2006	9	ND	ND	NR	ANR	NR
J. M. S.	S e U-14	28/12/2005	13/1/2006	16	ND	ND	R	NR	NR
B. M. S.	S-15	31/12/2005	2/1/2006	2	ND	ANR	NR	ANR	TNR
B. M. S.	S-16	26/12/2005	2/1/2006	7	ND	ANR	NR	ANR	TNR
D. G. D.	S-17	14/1/2006	26/1/2006	12	ND	ANR	R	ANR	R
L. C. M. A.	S e U-18	26/1/2006	3/2/2006	8	ND	ND	R	ANR	TNR
J. L. G.	S e U-19	27/1/2006	7/2/2006	11	ND	ND	NR	ANR	TNR
A. M. B.	S e U-20	2/2/2006	8/2/2006	6	ND	ND	R	ANR	NR
J. A.	S e U-21	20/2/2006	6/3/2006	14	ND	ND	R	ANR	P*
S. S. I.	S e U-22	1/3/2006	9/3/2006	8	ND	ND	I*	NR	TNR
A. F. B. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-23	4/3/2006	22/3/2006	18	ND	ND	ANR	ANR	TNR
E. S. F.	U-24	1/4/2006	13/4/2006	12	ANR	ND	NR	NR	TNR
A. A. N. F. (NÃO CONSIDERADO)	U-25	9/4/2006	13/4/2006	4	ANR	D	ANR	R	R
A. M.	S-26	22/6/2006	26/6/2006	4	ND	ND	NR	ANR	P
A. M.	S e U-27	21/6/2006	26/6/2006	5	ND	ND	NR	ANR	TNR

Identificação do paciente	Registro	Início dos sintomas	Data da coleta	Dias	PCR sangue	PCR urina	1ª ELISA	2ª ELISA	MAT
F. M. B. O.	S e U-28	20/6/2006	6/7/2006	16	ND	ND	NR	ANR	NR
N. G. R. J.	So e L-29	Não informado	3/6/2006	Não informado	So = ND	L = ND	R	ANR	TNR
A. S.	S e U-30	9/7/2006	18/7/2006	9	ND	D	NR	NR	P
F. M. B. O. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-31	20/6/2006	20/7/2006	30	ND	ND	ANR	ANR	TNR
A. A.	S e U-32	10/8/2006	22/8/2006	12	ND	ND	NR	ANR	NR
T. K.	S e U-33	18/8/2006	28/8/2006	10	ND	ND	NR	ANR	P
M. R. C.	S e U-34	30/8/2006	4/9/2006	5	ND	ND	R	ANR	R
F. A. L. N.	S e U-35	31/8/2006	4/9/2006	4	ND	ND	R	ANR	P
E. E. S. B. M (<i>post mortem</i>)	So e L-36	7/9/2006	10/9/2006	3	So = ND	L = D	NR	ANR	NR
L. R. C.	S e U-37	2/7/2006	25/9/2006	75	ND	ND	I	R	NR
B. S. P.	S e U-38	17/9/2006	26/9/2006	9	D	D	NR	ANR	NR
J. C. D. A.	S e U-39	12/10/2006	18/10/2006	6	D	D	R	ANR	TNR
P. H. S. B.	S e U-40	15/10/2006	20/10/2006	5	ND	D	R	ANR	R
A. J. C. P.	S e U-41	17/10/2006	31/10/2006	14	ND	ND	NR	ANR	TNR
A. J. C. P.	S e U-42	17/10/2006	9/11/2006	23	ND	ND	NR	ANR	TNR
L. S. M.	S e U-43	19/11/2006	21/11/2006	2	ND	ND	R	ANR	NR
Z. A. S.	U-44	Não informado	20/11/2006	Não informado	ND	D	NR	ANR	NR
R. M. S.	S e U-45	17/11/2006	24/11/2006	7	ND	ND	R	ANR	NR
E. C. R.	S e U-46	21/11/2006	24/11/2006	3	ND	D	R	ANR	NR
L. O. A.	S e U-47	24/11/2006	27/11/2006	3	D	D	NR	R	R
E. C. R.	S-48	21/11/2006	24/11/2006	3	ND	ANR	R	ANR	NR
T. A. L.	S e U-49	1/12/2006	5/12/2006	4	ND	ND	NR	ANR	NR
B. M. M.	S e U-50	6/12/2006	13/12/2006	7	ND	ND	NR	R	NR
F. F. P.	S e U-51	8/12/2006	15/12/2006	5	ND	D	R	R	P
N. F. A.	S e U-52	8/12/2006	20/12/2006	12	ND	ND	R	R	P
P. C. F.	S e U-53	14/12/2006	20/12/2006	6	D	ND	NR	ANR	NR
P. C. F. (2ª amostra)	S e U-54	14/12/2006	22/12/2006	8	D	ND	R	ANR	R

Identificação do paciente	Registro	Início dos sintomas	Data da coleta	Dias	PCR sangue	PCR urina	1ª ELISA	2ª ELISA	MAT
S. L. F.	S e U-55	16/12/2006	27/12/2006	11	D	D	R	ANR	TNR
F. O.	U-56	28/12/2006	4/1/2007	7	ANR	ND	NR	ANR	NR
G. B. S.	S e U-57	3/1/2007	8/1/2007	5	ND	ND	NR	ANR	NR
R. C.	S e U-58	2/1/2007	8/1/2007	6	D	ND	R	ANR	NR
S. S. G.	S e U-59	27/12/2006	8/1/2007	12	D	ND	R	ANR	P
F. O. (2ª amostra)	S e U-60	29/12/2006	9/1/2007	11	D	ND	R	ANR	R
M. J. S.	S e U-61	12/1/2006	16/1/2007	4	D	D	R	R	R
C. R. R.	S e U-62	Não informado	16/1/2007	Não informado	ND	ND	NR	ANR	TNR
J. N.	S e U-63	7/1/2007	17/1/2007	10	D	ND	NR	NR	P
C. R. R. (2ª amostra)	S e U-64	13/1/2007	17/1/2007	4	D	ND	NR	ANR	NR
C. A. O.	S e U-65	14/1/2007	22/1/2007	8	D	ND	R	ANR	NR
M. J. S. (2ª amostra)	S e U-67	11/1/2007	24/1/2007	13	ND	ND	R	ANR	TNR
R. L. S.	S-68	Não informado	24/1/2007	Não informado	ND	ND	NR	ANR	NR
T. P. A.	S-69	Não informado	23/1/2007	Não informado	ND	ND	R	ANR	P
C. A. O. (2ª amostra)	S e U-70	15/1/2007	22/1/2007	7	ND	D	R	ANR	NR
P. C. B. M.	S e U-71	24/1/2007	31/1/2007	7	ND	ND	I	R	NR
A. R. B.	S e U-72	31/1/2007	2/2/2007	2	D	ND	NR	ANR	NR
S. A. I.	S e U-73	3/2/2007	5/2/2007	2	D	ND	R	R	NR
G. W. C. R.	S e U-74	26/1/2007	6/2/2007	11	ND	D	R	ANR	P
C. A. M. M. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-75	27/1/2007	4/2/2007	8	ND	ND	ANR	ANR	TNR
D. M. R. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-76	6/2/2007	9/2/2007	3	ND	ND	ANR	ANR	TNR
B. R. M.	S e U-77	18/2/2007	23/2/2007	5	D	D	NR	R	R
R. D. S.	S e U-78	27/2/2007	6/3/2007	7	D	D	NR	ANR	TNR
V. Q.	S e U-79	1/3/2007	7/3/2007	7	D	D	R	ANR	TNR
O. B. F.	S e U-80	27/2/2007	8/3/2007	10	ND	ND	R	ANR	P
J. G. S. S.	S-81	28/2/2007	1/3/2007	2	D	ANR	NR	ANR	NR
R. P. (NÃO CONSIDERADO)	S-82	25/2/2007	9/3/2007	12	D	ANR	ANR	R	TNR

Identificação do paciente	Registro	Início dos sintomas	Data da coleta	Dias	PCR sangue	PCR urina	1ª ELISA	2ª ELISA	MAT
S. M. D.	S e U-83	6/3/2007	12/3/2007	6	ND	ND	NR	R	TNR
R. D. S.	S e U-84	Não informado	6/3/2007	Não informado	D	D	NR	ANR	NR
E. P. L.	S e U-85	12/3/2007	20/3/2007	8	ND	ND	R	ANR	NR
J. M. J.	S e U-86	11/3/2007	20/3/2007	9	ND	ND	R	ANR	NR
J. R. S.	U-88	26/2/2007	9/3/2007	11	ANR	ND	NR	R	R
R. P.	U-89	25/2/2007	12/3/2007	15	ANR	ND	R	ANR	R
L. F. C. G.	S e U-90	Não informado	22/3/2007	Não informado	D	ND	NR	NR	NR
J. A. D.	S e U-91	4/3/2007	23/3/2007	19	ND	ND	R	R	TNR
S. M. D.	S e U-92	6/3/2007	23/3/2007	17	ND	ND	R	R	TNR
E. C.	S e U-93	24/3/2007	29/3/2007	5	ND	ND	R	R	NR
T. D.	S e U-94	25/3/2007	4/4/2007	10	ND	ND	NR	ANR	NR
E. C.	S e U-95	24/3/2007	4/4/2007	11	ND	ND	R	ANR	P
N. C. C. F.	S e U-96	Não informado	13/4/2007	Não informado	D	ND	R	R	R
J. F. F.	S e U-97	13/4/2007	24/4/2007	9	D	ND	R	ANR	R
C. L. S. (NÃO CONSIDERADO)	U-98	30/3/2007	24/4/2007	26	ANR	ND	ANR	ANR	TNR
A. B. C.	S-100	Não informado	Não informado	Não informado	ND	ANR	I	ANR	NR
J. B. S.	S-101	7/4/2007	13/4/2007	Não informado	ND	ANR	NR	ANR	NR
T. B. L.	S e U-102	19/5/2007	Não informado	Não informado	ND	ND	NR	ANR	NR
T. B. L. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-103	Não informado	Não informado	Não informado	ND	ND	ANR	ANR	TNR
M. S. B. M. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-105	14/6/2007	20/6/2007	6	ND	ND	ANR	ANR	TNR
S. A. I. (NÃO CONSIDERADO)	S e U-106	3/2/2007	25/6/2007	22	ND	ND	ANR	ANR	TNR
W. D. A.	U-107	16/6/2007	25/06/07	9	ANR	ND	NR	ANR	TNR

*ANR: amostra não recebida; D: detectável; ND: não detectável; R: reagente; I: inconclusivo; NR: não reagente; TNR: teste não realizado; P: provável.

Curitiba, 01 de novembro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Farm. Irina Nastassja Riediger
Nesta

Prezado Pesquisador:

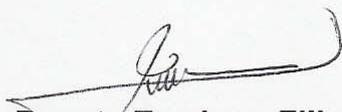
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**VIGILÂNCIA DESCENTRALIZADA DA LEPTOSPIROSE HUMANA E ANIMAL NO ESTADO DO PARANÁ**”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de outubro de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP: 1117.156/2005-10

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 25 de abril de 2006.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR