



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR

**LEPTOSPIROSE EM RATOS URBANOS EM LONDRINA,
PARANÁ**

Londrina
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR

LEPTOSPIROSE EM RATOS URBANOS EM LONDRINA, PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S762L Spohr, Kledir Anderson Hofstaetter.
Leptospirose em ratos urbanos em Londrina, Paraná / Kledir Anderson Hofstaetter
Spohr. – Londrina, 2009.
63 f. : il.

Orientador: Julio Cesar de Freitas.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Leptospirose em animais – Teses. 2. Rato como transmissor de doenças –
Teses. I. Freitas, Julio Cesar de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR

LEPTOSPIROSE EM RATOS URBANOS EM LONDRINA, PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos
Universidade de São Paulo (USP)

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Londrina, 25 de maio de 2009

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Leptospirose e Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC.**
- 2. SETI/UGF: Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior / Unidade Gestora do Fundo Paraná.**
- 3 Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.**

*E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados insanos por aqueles
que não podiam escutar a música.*

Friedrich Nietzsche

DEDICATÓRIA

Às pessoas mais importantes da minha vida:

Minha mãe Helena Hofstaetter Spohr,
Com seu apoio incondicional na busca de meus objetivos.

À meus irmãos e amigos,
que simplesmente me guiaram, mesmo sem saber que o faziam.

E aos meus mestres,
que me guiaram sabendo o que o faziam.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar tudo possível.

Ao querido professor e orientador Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas, pelo exemplo de dignidade e dedicação. Agradeço pelos seus esforços objetivando meu crescimento pessoal e profissional nestes anos de convívio e orientação. Obrigado por acreditar em mim! Sempre será, além de orientador e professor, um grande amigo.

A professora Roberta Lemos Freire, pelo trabalho em conjunto desenvolvido nestes dois anos de mestrado, pelos ensinamentos e momentos de debate frente aos dados obtidos e pelas importantes contribuições na qualificação e defesa.

A professora Alice Fernandes Alfieri pelas contribuições na qualificação e pelos ensinamentos e amizade nestes quatro anos.

Ao grande professor e amigo Amauri A. Alfieri, pelas palavras de apoio, pelo suporte técnico, pelo suporte logístico, sempre auxiliando a resolver os problemas que não se resolviam. Além de um grande exemplo, espero que sempre possa ter como um grande amigo.

Ao professor Silvio Arruda, por todo o auxílio durante a execução deste projeto e por todas as contribuições na defesa de dissertação.

Aos professores Fabiana Seixas e Odir Delagostin da Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio na metodologia e importantes informações repassadas para a realização deste projeto.

À todos os demais professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, por todo auxílio direto ou indireto em minha formação científica.

À Elenice, por toda a colaboração e auxílio nos procedimentos burocráticos envolvidos com estes dois anos de mestrado. Além é claro, da amizade, sempre presente.

À técnica Lucimara A. Alves, que muito mais que simples técnica do laboratório de Leptospirose foi uma importante amiga e companha durante todo o período de pós-graduação, com uma convivência repleta de risadas, debates de opiniões, de um convívio agradável e divertido.

Aos técnicos Luciene G. Preto Garcia e José Aldevino por todo o auxílio, carinho e conhecimentos transmitidos. À querida técnica e amiga Kerlei Cristina Médici, por todo o convívio, paciência, companheirismo e ensinamentos. A todos os demais funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva que me auxiliaram em pequenos ou grandes processos da realização deste trabalho, especialmente Dalíria, Ademir e Hélio.

À Francielle Gibson da Silca Zacarias, que muito além de uma companhia extremamente agradável, considero praticamente como uma coorientadora durante todo este período de pós-graduação. Pelos imensos conhecimentos transmitidos e pela confiança no trabalho depositada em minha pessoa durante todo este convívio. Sempre serás além de um exemplo profissional e de competência, uma grande amiga.

À Bruno Bergano por todo o auxílio neste projeto durante toda a captura. Devo a este, grande parte deste trabalho.

À grande amiga Vanessa Hashimoto, por todo o auxílio durante a execução deste projeto e término do mestrado. Sempre foi uma ótima companheira de trabalho, mas muito mais que isso, uma amiga extraordinária.

Ao grande e célebre “Trio Maravilha”, Livita e Carioca, sempre amigas para todas as horas, confidentes, fontes de conhecimentos e prontas para debater todos os assuntos possíveis de âmbito pessoal e profissional. Sempre estarão em meu coração e em minha vida!

Aos eternos amigos Bruna, Eleine, Betinha, Walfrido e Juliana Dias, por toda a amizade, carinho e conforto.

Aos amigos e estagiários do laboratório de Microbiologia, Leptospirose e Virologia: Valéria, Aline Benitez, Elaine, Marlise, Michelli, Patrícia, Elis, Cláudia entre muitos outros, pelo carinho e amizade.

Aos vizinhos de laboratório: Ronaldo, Ana Paulo, Rafael, Henrique, sempre emprestando um lugar naquele pequeno laboratório para momentos de distração e fuga dos problemas.

Agradeço ainda aos amigos Danilo, Flora, Daniel (frango), Michele, Kátia, Tonel.

Aos queridos amigos e colegas de trabalho da Universidade Federal do Paraná, campus Palotina, pelo auxílio neste término de mestrado.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

SPOHR, K.A.H. **Leptospirose em ratos urbanos de Londrina, Paraná.** 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

A leptospirose é uma zoonose endêmica, que afeta a população humana em escala mundial. A transmissão ocorre principalmente pelo contato com urina de roedores sinantrópicos infectados das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* considerados reservatórios da *Leptospira* spp. No ambiente urbano, o cão é considerado um importante reservatório. A prova de referência no diagnóstico da infecção é a soroglutinação microscópica (SAM). A técnica de PCR também pode ser utilizada, porém sua sensibilidade varia conforme protocolo, tipo de amostra biológica e *primers* utilizados. O presente trabalho teve por objetivo verificar a prevalência da leptospirose em 181 *R. rattus* capturados em 37 locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos e em 57 cães comunicantes presentes em 25 pontos de captura na região urbana de Londrina – Paraná, de maio a dezembro de 2006. Amostras de soro dos ratos e cães foram testadas pela SAM e amostras de rim dos ratos pela nested-PCR. Das amostras de ratos, o soro de 16/172 (9,3 %) foram reagentes na SAM, sendo o principal sorovar mais provável detectado o Pomona, e das amostras de rim, 22/181 (12,15%) foram positivas na nested-PCR. Somente cinco ratos apresentaram resultados positivos nas duas técnicas. A prevalência geral da leptospirose nos ratos foi de 33/181 (18,23%). Na população de cães, 7/57 (12,28%) apresentaram anticorpos antileptospiras na SAM, sendo o sorovar Canicola o principal sorovar detectado como mais provável. A infecção pela *Leptospira* spp nos roedores estudados indica o risco da transmissão da bactéria para a população humana nesta área urbana.

Palavras-chave: *Leptospira* spp, diagnóstico, nested-PCR, *Rattus rattus*, área urbana

ABSTRACT

Spohr, K.A.H. **Leptospirosis in urban rats in Londrina, Paraná**. 63 lvs. Dissertation (Master's Degree in Animal Science, Animal Sanitary area) – State University of Londrina, Londrina. 2009.

Leptospirosis is an endemic zoonosis, that affects the human population worldwide. Transmission occurs mainly through contact with urine of infected synanthropic rodents from species *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* and *Mus musculus* that are the reservoirs of *Leptospira* spp. Dogs are considered important reservoirs in the urban area. Microscopic agglutination test (MAT) is the reference method for the diagnosis of infection. PCR technique can also be used, but its sensitivity varies with protocol, type of biological sample and primers used. This study aimed to determine the prevalence of leptospirosis in 181 *Rattus rattus* capture in 37 establishments of solid waste recycling and scrap heaps and 57 dogs found in 25 points of rats capture in urban areas of Londrina – Paraná, between May and December of 2006. Rats and dogs serum samples were tested by MAT and rat kidney samples by nested-PCR. Among rat samples, serum of 16/172 (9.3%) were reactive in MAT and Pomona was the most probable serovar detected, and from kidney samples, 22/181 (12.15%) were positive in nested-PCR. Only five rats were positive in both techniques. The prevalence of leptospirosis in rats was 33/181 (18.23%). Concerning dogs population, 7/57 (12.28%) presented antibodies against *Leptospira* spp, and Canicola was considered as the most probable serovar. Infection by *Leptospira* spp in the rodents studied indicates risk of transmission of the bacteria to the human population in this urban area.

Key Words: *Leptospira* spp, diagnostic, nested-PCR, *Rattus rattus*, urban area

1. REVISÃO DE LITERATURA

LEPTOSPIROSE EM ROEDORES SINANTRÓPICOS URBANOS	
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Epidemiologia.....	16
Sorovares e infecção.....	18
Diagnóstico.....	20
Referências bibliográficas.....	23

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1. PREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM RATOS URBANOS CAPTURADOS EM LONDRINA, PARANÁ	
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e métodos.....	37
Local de coleta e população estudada.....	37
Coleta de amostras biológicas	37
Soroaglutinação microscópica.....	38
Extração do ácido nucleico.....	38
PCR e nested PCR.....	39
Análise estatística.....	39
Resultados.....	40
Discussão.....	40
Agradecimentos.....	44
Referências bibliográficas.....	47

4. CONCLUSÕES

54

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	57
ANEXO B: Normas de publicação do periódico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.....	59

LISTA DE FIGURAS

Prevalência da leptospirose em ratos urbanos capturados em Londrina, Paraná.

- Figura 1** Nested PCR para *Leptospira* spp patogênicas de amostras biológicas de rim de *R. rattus* urbanos capturados em Londrina. Linha 1, 123 pb DNA Ladder (Invitrogen), linha 2, produto da PCR do controle positivo com 264 pb; linha 3, produto amplificado pela n-PCR do controle positivo com um fragmento de 183 pb, linhas 4, 7, 9 e 10, amostras de rim negativas na n-PCR, linhas 5, 6 e 8, amostras de rim positivas na n-PCR e linha 11, controle negativo.....46

LISTA DE TABELAS

Prevalência da leptospirose em ratos urbanos capturados em Londrina, Paraná.

Tabela 1. Sorovares mais prováveis de <i>Leptospira</i> spp e títulos detectados na prova de soroaglutinação microscópica (SAM) em 16 <i>Rattus rattus</i> , capturados na área urbana de Londrina – PR, no período de maio a dezembro de 2006.....	45
--	----

1. REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

LEPTOSPIROSE EM ROEDORES SINANTRÓPICOS URBANOS

Resumo: Os roedores sinantrópicos são responsáveis pela transmissão de diversas zoonoses ao homem na área urbana. A leptospirose é uma doença endêmica que afeta a população humana em escala mundial, tornando-se epidêmica no Brasil em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas. Os surtos epidêmicos da doença geralmente são associados a condições inadequadas de saneamento básico, e variações climáticas com quedas de chuvas intensas. A transmissão ocorre principalmente pelo contato com urina de roedores sinantrópicos infectados das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* considerados reservatórios da *Leptospira* spp. Sorovares adaptados podem infectar os rins de hospedeiros reservatórios e serem eliminados pela urina por longos períodos. A prova de referência no diagnóstico da infecção é a soroaglutinação microscópica (SAM). A técnica de PCR também pode ser utilizada, porém sua sensibilidade varia conforme protocolo, tipo de amostra biológica e *primers* utilizados.

Palavras-chave: *Leptospira* spp, zoonose, zona urbana, roedores, diagnóstico.

LEPTOSPIROSIS IN URBAN SYNANTHROPIC RODENTS

Abstract: Synanthropic rodents are responsible for the transmission of several zoonosis to humans in urban areas. Leptospirosis is an endemic disease that affects the human population worldwide, becoming epidemic in Brazil in rainy periods, particularly in capitals and metropolitan areas. The epidemic outbreaks of disease are usually associated with inadequate sanitation conditions, and climate change with heavy rain falling. The transmission occurs mainly through contact with urine of infected synanthropic rodents from species *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* and *Mus musculus* that are the reservoirs of *Leptospira* spp. Adapted serovars can infect the kidneys of reservoir hosts and be eliminated through the urine for long periods. Microscopic agglutination test (MAT) is the reference method for the diagnosis of infection. PCR technique can also be used, but its sensitivity varies with protocol, type of biological sample and primers used.

Key-words: *Leptospira* spp, zoonosis, urban area, rodents, diagnostic

Introdução

Os roedores sinantrópicos determinam grandes prejuízos econômicos na área rural, e são responsáveis pela transmissão de várias zoonoses ao homem na área urbana e rural, atuando como reservatório de importantes doenças como leptospirose, toxoplasmose, leishmaniose e algumas de etiologia viral⁰⁹.

A leptospirose foi considerada como doença infecciosa reemergente nos últimos anos da década de 1990, afetando a população humana em escala mundial^{05 49}. É uma doença que pode ocorrer em qualquer época do ano, porém tem caráter sazonal e sua incidência é elevada em países de clima tropical e/ou subtropical, onde as elevadas temperaturas e os altos índices pluviométricos favorecem a sobrevivência do microrganismo^{19 29 38}.

No Brasil, dados do SINAN/SVS/MS⁴⁴ informam 2490 casos de leptospirose no ano de 2008, com letalidade de 11,1%, casuística inferior a de 2007, com 3072 casos humanos notificados e letalidade de 10,4%. Entre os anos de 1997 a 2008 foram notificados no Brasil 38712 casos de leptospirose humana, com uma média anual de 3226 casos, com amplitude de 2433 em 1999 a 4360 em 2006. Do total de casos notificados entre 1999 e 2003, 1683/14334 vieram a óbito, perfazendo uma letalidade de 11,7% e uma média de 336 óbitos/ano¹⁰. Deste total de casos notificados, 77% foram hospitalizados e caracterizados como casos graves a moderados. A baixa quantidade de casos brandos notificados indica uma subnotificação pelo sistema público de saúde¹⁰. As taxas de incidência de leptospirose humana são subestimadas devido à falta de conhecimento da doença e do diagnóstico relativamente inacessível e demorado⁰⁵.

Epidemiologia

A leptospirose pode ocorrer tanto em área urbana quanto rural, sendo mais grave na área urbana. É uma doença endêmica no Brasil, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas¹⁰.

A ausência de levantamentos contínuos da doença no Brasil limita a formação de conclusões da doença no país³⁸, contudo características climáticas e sociais de risco verificadas no surto epidêmico em Salvador em 1999, onde ocorreram 50 óbitos dos 326 casos identificados, também ocorrem em todos os maiores centros urbanos no Brasil²⁷. Os surtos epidêmicos da doença estão associados à aglomeração da população de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento básico e às variações climáticas com incidência de chuvas intensas²⁷. Estas condições somadas a enchentes, principalmente na área urbana, permitem a transmissão indireta de *Leptospira* pela água contaminada com urina de ratos infectados⁴⁹.

A *Leptospira* spp pode infectar cerca de 160 espécies de mamíferos domésticos e silvestres³³, sendo que a inter-relação entre doença e os roedores foi confirmada por Ido no Japão em 1916²⁹.

A transmissão ocorre de forma direta ou indireta nas diferentes espécies mamíferas. A forma direta ocorre através da transmissão transplacentária em infecções congênitas, contato sexual, leite de fêmeas infectadas, sangue de um animal em leptospiremia, ou urina de um portador renal e de forma indireta pela contaminação do meio ambiente com a urina de portadores renais¹⁹. As principais formas de transmissão da leptospirose para o homem são o contato com solo e água contaminados pela urina ou contato com tecidos de animais infectados, tendo como porta de entrada a conjuntiva ou pele lesionada, ou ainda pela mordedura de ratos⁴⁰.

Os principais reservatórios urbanos das leptospiros são roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*¹⁰. Estes roedores podem ser uma fonte contínua de infecção da *Leptospira* spp, pois ao se infectarem albergam a bactéria nos rins, eliminando-a viva no meio ambiente e contaminando água, solo e alimentos⁴⁰. Vinetz⁴⁹ afirma que a diversidade de leptospiros varia conforme o ambiente, sendo determinada pela variedade de fauna mamífera. No ambiente urbano, ratos, camundongos e cães predominam como reservatórios.

Historicamente, a espécie sinantrópica *R. norvegicus* é a mais importante para transmissão desta zoonose ao homem, e as espécies *R. rattus* e *M. musculos* teriam uma pequena contribuição na manutenção das leptospiros na natureza⁰⁸. Entretanto em estudo realizado nas ilhas dos Açores em 1997, as espécies *M. musculus*, *R. rattus*, e *R. norvegicus* apresentaram os percentuais de isolamento aproximados (33,8%, 20,7%, 21,7%) da *Leptospira* spp a partir dos rins de 157, 87 e 23 animais respectivamente, indicando as três espécies como hospedeiros naturais de importância no local de estudo¹⁵. A pesquisa de anticorpos contra leptospiros em 201 roedores urbanos e silvestres capturados em Santa Fé, Argentina, demonstrou 42% de animais soropositivos pela técnica de ELISA no ano de 2003. Destes roedores, 147 eram espécies *M. musculus* (92), *R. rattus* (32) e *R. norvegicus* (23), não sendo encontrada diferença estatística quanto a soroprevalência nas espécies⁴⁷.

Pesquisas realizadas em diferentes países demonstraram valores altos de prevalência da doença entre os roedores, encontrados tanto em zonas urbanas quanto rurais.

Nas ilhas dos Açores, Portugal, no ano de 2000, taxa de 62,8% de positividade foi encontrada em 94 roedores sinantrópicos em diferentes pontos das ilhas, com predomínio das espécies *M. domesticus* (41/94) e *R. rattus* (49/94) e com um pequeno número de *R. norvegicus* (4/94). As taxas de positividade total obtidas na soroaglutinação microscópica (SAM) e cultura por espécie foram de 85,4%, 44,9% e 50% respectivamente¹⁶.

Na região de Madurai em 2007, na Índia, 58% dos *R. rattus* de campo capturados foram positivos na SAM. Destes animais sorologicamente positivos foi possível isolar *Leptospira* spp do rim de 85,7% dos animais⁴¹.

Altas variações nas taxas de infecção por *Leptospira* spp (2,3% a 80,6%) foram detectadas em ratos capturados em ilhas do Japão em diferentes regiões²⁵.

Dalu & Ferusu¹⁷ em 1997, realizando estudos em regiões rurais de duas cidades de Harare no Zimbábue encontraram 62,5% de roedores positivos na SAM. Machangu et al³² no mesmo ano, pela SAM com cinco sorovares (Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Grippotyphosa, Pyrogenes e Canicola) detectaram 1,9% de positividade em 537 amostras de soro de roedores da Tanzânia. Esta prevalência baixa pode ter sido causada pela utilização de um número pequeno de sorovares que acarretou perda significativa da sensibilidade da prova, já que a resposta é sorogrupo específica⁰⁶.

No Chile, na área urbana de Valdivia em 1994, anticorpos antileptospiras foram detectados pela SAM em 12,2% de 131 roedores silvestres capturados. Aplicando a técnica de imunoperoxidase e imunofluorescência direta nos rins dos animais foram obtidos 13,7% de positividade, com 20,6% de positivos em pelo menos uma das técnicas sorológica ou histológica⁴³.

No Brasil, na cidade de São Paulo, no ano de 1949 foi observada 38% (11/29) de positividade na SAM dos *R. norvegicus* capturados. Destes, 9 apresentaram resultados positivos por métodos de diagnóstico direto como inoculação em cobaio, campo-escuro e cultura²³. Em Belo Horizonte, no ano de 1952, 44,3% (27/61) dos *R. norvegicus* capturados foram positivos para *Leptospira* spp a partir do exame direto pelo campo-escuro e cultura a partir do tecido renal⁴.

No porto de Santos, estado de São Paulo, estudou-se a presença de *Leptospira* spp em rins de roedores sinantrópicos no ano de 1950 obtendo-se 6 animais portadores renais da

bactéria de 85 *Rattus* spp capturados²¹. Neste mesmo local, no ano de 1984, foram capturados 116 roedores da espécie *R. rattus*, *R. norvegicus* e *M. musculus*. Destes, foi obtido 4 isolamentos de *Leptospira* spp apartir dos rins²⁰.

Estudos sorológicos realizado pela SAM em regiões urbanas da cidade do Rio de Janeiro, com 101 *R. norvegicus* e três *M. musculus* em 1988 e em Duque de Caxias com 47 *R. norvegicus* em 1993, detectaram respectivamente 39%³⁹ e 36,17%³¹ de positividade.

Sorovares e infecção

Espécies de ratos do gênero *Rattus* são os principais reservatórios dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni e espécies de camundongos do gênero *Mus* dos sorovares Ballum, Arborea e Bim, sendo demonstrado que um hospedeiro de manutenção pode abrigar diferentes sorovares em regiões geográficas distintas⁰⁵. Collares-Pereira e colaboradores¹⁵ isolaram com maior frequência o sorovar Icterohaemorrhagiae de *R. norvegicus* e o sorovar Arborea do sorogrupo Ballum de *R. rattus*.

No Peru, dos 55 isolados de *Leptospira* spp de *R. rattus* e *R. norvegicus*, 47 foram classificados como sorovar Icterohaemorrhagiae e oito pertenciam a uma nova espécie de *Leptospira* spp, com características antigênicas diferentes, contudo extremamente semelhantes a dois isolados humanos do mesmo estudo³⁴. Na Índia, foram isoladas de *R. rattus*, seis estirpes patogênicas identificadas como Autumnalis (5/6) e Javanica (1/6)⁴¹.

A adaptabilidade do sorovar ao hospedeiro reservatório permite a infecção e sobrevivência das leptospiros no rim do mamífero por toda sua vida, o que possibilita a eliminação do microrganismo pela urina¹⁹.

Athanazio et al⁰¹, estudando a relação de um sorovar com seu reservatório, inocularam o sorovar Copenhageni em *R. norvegicus* pela via intraperitoneal e sugeriram que na fase de leptospiremia havia rápida disseminação, sendo seguida do acúmulo de leptospiros no lúmen

dos túbulos proximais do rim. Verificaram nove dias pós infecção, que a bactéria estava ausente em todos os outros tecidos, sugerindo que a rápida disseminação é seguida da sobrevivência seletiva e proliferação no rim. A disseminação generalizada, seguida em um curto período da ausência das leptospiras em todos os tecidos exceto o rim, sugere que este órgão é um sítio de proteção imune e não exatamente um tecido com tropismo. As leptospiras nos rins estariam protegidas da ação dos anticorpos formados pelo sistema imune no começo da infecção.

Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por técnicas diretas e indiretas, contudo todas apresentam vantagens e desvantagens¹⁹.

Dentre as técnicas indiretas utilizadas, a SAM que utiliza antígenos vivos e apresenta grande sensibilidade é a mais rotineiramente empregada em todo o mundo. É uma técnica que detecta anticorpos no soro contra os antígenos de superfície da leptospira²⁹. A desvantagem é que pode apresentar reações cruzadas entre sorovares e não ser capaz de caracterizar a infecção no início da fase aguda da doença pela ausência de anticorpos⁰⁶, contudo pode indicar infecções que ocorreram sem que o hospedeiro tenha se tornado portador renal da bactéria⁴³. Bolin⁰⁶ sugeriu o emprego do maior número possível de sorovares de referência e amostras de isolados locais para aumentar a sensibilidade da SAM, entretanto embora a resposta do hospedeiro seja sorovar específica, a capacidade da SAM de predizer o sorogrupo infectante é menor que 40%⁴⁶.

A resposta imune induzida pelas leptospiras é de curta duração, e varia de acordo com a espécie infectada e sorovar infectante, indicando que a avaliação somente de resultados sorológicos não são esclarecedores quando avaliados isoladamente. A ausência de anticorpos não elimina a condição de portador renal observada no animal reservatório¹³. O fato das

leptospiras estarem protegidas do sistema imune nos rins e poderem infectar este órgão por toda a vida do roedor, torna fundamental o isolamento ou detecção do microrganismo para avaliação da importância do roedor na cadeia epidemiológica local de transmissão da doença²⁸.

A visualização direta de leptospiras em microscópio de campo escuro em amostras como a urina é pouco utilizada devido a sua baixa sensibilidade, eliminação intermitente do agente na urina e necessidade de um profissional com experiência²⁹.

O isolamento da *Leptospira* spp é considerado a técnica definitiva no diagnóstico da leptospirose, proporcionando a identificação do sorovar infectante. A desvantagem é que o isolamento do agente é bastante difícil, é uma técnica laboriosa e que necessita de um acompanhamento semanal, podendo levar meses para apresentar qualquer crescimento. Por estes motivos poucos laboratórios fazem uso desta técnica, sendo muito pouco utilizada para a rotina diagnóstica, porém é de suma importância em estudos epidemiológicos e profiláticos da infecção²⁹.

Em roedores sinantrópicos, grande parte dos estudos de leptospiras são relativamente antigos, e poucos são os que utilizaram a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção da bactéria^{02 25 28 45}.

A PCR tem apresentado crescente utilização para o diagnóstico precoce da doença, apresentando alta sensibilidade e especificidade. O uso de protocolos cada vez mais sensíveis detecta e amplifica quantidades cada vez menores do DNA do microrganismo nas mais variadas amostras biológicas como soro sanguíneo¹¹, fragmentos de órgãos¹² e urina⁰³. Para a detecção de *Leptospira* spp em fragmentos de órgãos post-mortem, a técnica de maior sensibilidade é a PCR¹².

Entre as limitações da PCR destaca-se a incapacidade de determinar o sorovar envolvido, porém este dado apresenta maior valor epidemiológico do que propriamente no

diagnóstico³⁰. Outro inconveniente é que a sensibilidade da PCR pode variar de acordo com os *primers* utilizados, a padronização dos reagentes, do protocolo de amplificação, seleção do material biológico, forma de conservação e tempo de estocagem da amostra, uma vez que o DNA pode ser facilmente degradado⁴⁸.

Diversos *primers* tem sido empregados no diagnóstico da leptospirose, com sensibilidade e especificidade variadas^{03 07 18 22 24 26 35 37 42}. Palaniappan et al³⁷, desenvolveram o par de *primers* Lig1 e Lig2 que amplificam um fragmento de 468 pb da região amino-terminal dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira* spp é um dos que mais se destaca. O gene *lig* é um fator de virulência encontrado apenas em leptospiros patogênicas³⁶. Quando comparado a *primers* previamente descritos, os *primers* Lig1 e Lig2 apresentaram-se mais sensíveis que os demais, amplificando menores quantidades de DNA por amostra e não detectando a forma não patogênica do agente, contudo foram testados com sorovares da espécie genômica *L. interrogans*³⁷. Na avaliação de diferentes espécies genômicas patogênicas de *Leptospira* spp, foi constatado que nem todas as espécies patogênicas possuem o gene *lig* completo, o que pode influenciar a sua detecção por *primers* específicos para esse gene¹⁴.

Os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Jouglard et al²⁴ amplificam pela nested-PCR um fragmento altamente conservado de DNA que codifica a lipoproteína LipL32, considerada a maior lipoproteína da membrana externa de leptospiros patogênicas e importante fator de virulência, que está ausente em espécies não-patogênicas. A nested-PCR apresenta ótima sensibilidade, e foi testada frente a diferentes espécies genômicas patogênicas, diferentemente do estudo de Palaniappan et al³⁷.

Referências bibliográficas

01. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, Ko AI, Reis MG. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropical* 105: 176-180, 2008.
02. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2008. Doi 10.1016/j.cimid.2008.05.2004.(article in press)
03. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeert RA, De Meza Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1894-1898, 1994.
04. Barbosa M, Hipólito O. *Leptospira Icterohaemorrhagiae* em ratos (*Rattus norvegicus*) em Belo Horizonte. Separata do Boletim do “ Arquivos” da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 5: 12-15, 1952.
05. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 757-771, 2003.
06. Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 11: 116-171, 1996.
07. Branger C; Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, Andre-Fontaine G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene

- hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiology Letters 243: 437-445, 2005.
08. Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de Leptospirose. 2 ed, Brasília, 1995.
 09. Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual de Controle de Roedores. Brasília, 2002.
 10. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica, 6 ed. Brasília, 2005.
 11. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard COR, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology 43: 110-114, 1995.
 12. Brown PD, Carrington DG, Gravekamp C, Van de Kemp H, Edwards CN, Jones SR, Prussia PR, Garriques S, Terpstra WJ, Levett PN. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. Research in Microbiology 154: 581-586, 2003.
 13. Caldas EM, Fehringer WT, Sampaio MB. Aglutininas anti-leptospira em *Rattus norvegicus* e *Didelphis marsupialis*, em Salvador-BA. Arquivos da Escola de Medicina Veterinária – UFBA 9: 56-58, 1994.
 14. Cerqueira, GM. Caracterização de *Leptospira* spp quanto à presença e conservação dos genes da família lig: alvos potenciais para utilização em vacina e testes de diagnóstico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.

15. Collares-Pereira M, Kover WJ, Terpstra M, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Mathias ML, Oom MM, Fons R, Libois R, Petrucci-Fonseca F. First epidemiological data of pathogenic leptospire isolated on the Azorean islands. *European Journal of Epidemiology* 13: 435-441, 1997.
16. Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Duarte-Rodrigues P. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *European Journal of Epidemiology* 16: 1151-1157, 2000.
17. Dalu JM, Feresu SB. Domestic rodents as reservoirs of pathogenic *Leptospira* on two City of Harare farms: Preliminary results of bacteriological and serological studies. *Belgian Journal of Zoology* 127: 105-112, 1997
18. Faber NA, Crawford M, Lefebvre LB, Buyukmihci NS, Madigan JE, Willits NH. Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2731-2733, 2000.
19. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd edition. MedSci, Melbourne, 1999.
20. Giorgi W, Genovez ME, Teruya JM, Silva AS. *Leptospira interrogans* sorotipo Wolffi, isolada de camundongo capturado no porto de Santos, SP. *Biológico* 50 (12): 295-297, 1984.
21. Gomes LD, Ribas JC, Corrêa MOA, JORDÃO FM. Incidência da *Leptospira* em ratos nas cidades de São Paulo e Santos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*: 111-115, 1950.
22. Gravekamp C, Van De KH, Franzen M, Carrington D, Schoone GL, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospire by

- PCR using two sets of primers. Journal of Genetical Microbiological 139: 1691-1700, 1993.
23. Guida VO. Identificação sorológica de leptospiros e pesquisa de anticorpos em ratos (*R. norvegicus*) capturados na cidade de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico 19: 85-92, 1949.
 24. Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin AO. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. Canadian Journal of Microbiology 52: 747-752, 2006.
 25. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F, Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H. First Record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami islands, Japan. Microbiology and Immunology 50: 429-434, 2006.
 26. Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. Journal of Clinical Microbiology 32: 1035-1039, 1994.
 27. Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson Jr WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. The Lancet 354: 820-825, 1999.
 28. Langoni H, Souza LC, Da Silva AV, Cunha ELP, Silva RC. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science 45: 190-199, 2008.
 29. Levett PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 14: 296-326, 2001.
 30. Levett PN. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clinical and Applied Immunology Reviews 6: 435-448, 2004.

31. Lilenbaum W, Ribeiro V, Martin E, Bispo V. Estudo sorológico para detecção de anticorpos anti-leptospira em *Rattus norvegicus* de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 35: 357-360, 1993.
32. Machangu RS, Mgone G, Mpanduji D. Leptospirosis in animals and humans in selected areas of Tanzania. *Belgian Journal of Zoology* 127: 97-104, 1997.
33. Martini EZ, Pizarro R. Leptospirosis. Puesta al día. *Revista Chilena de Infectología* 24: 220-226, 2007
34. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz J.M. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2: e 213, 2008.
35. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2219-2224, 1992.
36. Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, Mcdonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, Mcdonough PL, Mohammed HO. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity* 70: 5934-5930, 2002.
37. Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, Mcdonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roed B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Molecular and Cellular Probes* 19: 111-117, 2005.

46. Torten M. Leptospirosis. In: Stoenner IIE, Torten M, Kaplan W. CRC handbook series in zoonosis, section A: bacteriological, rickettsial and mycotic diseases. CRC Press. Boca Raton, Flórida, p 363-420, 1979.
47. Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and enviromental characteristics in Argentina. Preventive Veterinary Medicine 60: 227-235, 2003.
48. Velose IF; Lopes MTP, Salas CE, Moreira EC. A comparison of three DNA extractive procedure with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction analysis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95: 339-343, 2000.
49. Vinetz JM. Leptospirosis. Current Opinion in Infectious Diseases 14: 527-538, 2001.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Determinar a prevalência da leptospirose em roedores sinantrópicos urbanos capturados em locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos em Londrina – PR;

2.2. Objetivos específicos

- Utilizar uma técnica de nested-PCR para detecção da *Leptospira* spp patogênicas em amostras de rins ratos;
- Detectar anticorpos antileptospíricos em amostras de soro de ratos e cães comunicantes dos locais de reciclagem.

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1. PREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM RATOS URBANOS CAPTURADOS EM LONDRINA, PARANÁ.

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Revista da
Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*

PREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM RATOS URBANOS CAPTURADOS EM LONDRINA, PARANÁ.

Resumo: A leptospirose é uma das zoonoses de maior distribuição no mundo, as diversas espécies de ratos são fontes de infecção de importância da doença endêmica. O presente trabalho teve por objetivo verificar a prevalência da leptospirose em 181 *Rattus rattus* capturados em locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos e 57 cães comunicantes na região urbana de Londrina – Paraná. A prevalência da leptospirose nos ratos foi de 33/181 (18,23%). Das amostras de ratos, os soros de 16/172 (9,3 %) foram reagentes na soroglutinação microscópica (SAM), o sorovar mais provável foi o Pomona. As amostras de rim, 22/181 (12,15%) foram positivas na nested-PCR. Na população de cães, o soro de 7/57 (12,28%) apresentaram anticorpos antileptospiras na SAM, o sorovar Canicola o sorovar detectado como mais provável. A infecção pela *Leptospira* spp nos roedores estudados indica o risco da transmissão da bactéria para a população humana nesta área urbana.

Palavras-chave: *Leptospira* spp, *Rattus rattus*, zoonose, nested-PCR, soroglutinação microscópica.

PREVALENCE OF LEPTOSPIROSIS IN URBAN RATS CAPTURED IN LONDRINA, PARANÁ.

Abstract: Leptospirosis is one of the most distributed zoonosis worldwide, the several rats species are important sources of infection for the endemic disease. This study aimed to determine the prevalence of leptospirosis in 181 *Rattus rattus* capture at establishments of solid waste recycling and scrap heaps and 57 dogs in urban areas of Londrina – Paraná. The prevalence of leptospirosis in rats was 33/181 (18,23%). Among rat samples, serum of 16/172 (9.3%) were reactive in SAM, and Pomona was the most probable serovar detected. From kidney samples, 22/181 (12.15%) were positive in nested-PCR. Concerning dog population, serum samples of 7/57 (12,28%) presented antibodies against *Leptospira* spp, and Canicola was considered as the most probable serovar. Infection by *Leptospira* spp in the rodents studied indicates risk of transmission of the bacteria to the human population in this urban area.

Keywords: *Leptospira* spp, *Rattus rattus*, zoonosis, nested-PCR, microscopic agglutination test.

Introdução

A leptospirose é uma das zoonoses de maior distribuição no mundo, é causada por bactérias do gênero *Leptospira*¹⁷, pode ocorrer em cerca de 160 espécies de mamíferos domésticos e silvestres²⁷. A presença abundante de espécies de roedores ou pequenos mamíferos susceptíveis à infecção por leptospirosas pode ser um indicador do potencial de transmissão da *Leptospira* spp para o homem e animais domésticos³⁸.

Os ratos são reconhecidos como reservatórios crônicos assintomáticos de *Leptospira* spp especialmente de alguns sorovares¹⁶. Existem três espécies de roedores distribuídas mundialmente e comumente associadas com a infecção leptospírica: *Mus musculus* (rato de casa); *Rattus norvegicus* (rato marrom) e *Rattus rattus* (rato preto). Várias taxas de infecção e soropositividade (2,3 a 80,6%) têm sido descritas para estes roedores em diversos países, variando conforme características ecológicas e teste o diagnóstico utilizado^{05 13 24 34 39}. As espécies de ratos são fontes de infecção de importância da leptospirose endêmica para humanos e animais domésticos como o cão, especialmente no ambiente urbano em todo o mundo^{06 36}.

O diagnóstico da leptospirose é baseado geralmente na demonstração de anticorpos no soro sanguíneo pela soroprecipitação microscópica (SAM), prova de referência²⁹. Entretanto resultados sorológicos negativos não excluem a possibilidade do animal ser um portador renal²⁴.

Técnicas de PCR, de alta sensibilidade, tem sido descritas para detecção de leptospirosas em diferentes amostras biológicas animais e humanas, utilizando-se diferentes *primers*, protocolos de extração de amostras e condições de amplificação^{08 10 15 18 21 23 28 30 33}.

Embora a leptospirose seja considerada uma doença endêmica no Brasil e de sérios riscos a saúde pública¹⁷, as pesquisas com esta bactéria em roedores de zona urbana ainda são escassas no país.

O presente trabalho teve por objetivo determinar a prevalência da leptospirose em roedores urbanos em Londrina – Paraná, e cães comunicantes.

Material e Métodos

Local de coleta e população estudada

Os pontos de coleta de dados e animais foram os locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos existentes nas cinco regiões (Norte, Sul, Leste, Oeste e Central) da cidade de Londrina – PR, tendo como ponto de referência o entorno das Unidades Básicas de Saúde (UBS) das respectivas regiões, contemplando 37 pontos de captura de roedores. Nos pontos de captura de ratos, com presença de cães comunicantes, foi efetuada a coleta de amostras biológicas dos mesmos.

O tamanho da amostra de ratos urbanos foi calculado para uma população infinita, nível de significância de 5%, prevalência estimada de 50% e precisão de 7,5%, cálculo efetuado pelo programa EPI 6¹⁴, resultando em 171 animais.

A captura e coleta de amostras biológicas de ratos e cães foi realizada no período de Maio a Dezembro de 2006.

O presente trabalho foi registrado (nº 28/06) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina – PR.

Coleta de amostras biológicas

Os ratos capturados foram identificados quanto à espécie⁰⁹, submetidos à anestesia com éter etílico para coleta de sangue do plexo braquial, em seguida foi realizada a eutanásia e laparotomia para a coleta de ambos os rins. As amostras de sangue foram acondicionadas

em tubos de ensaio estéreis, identificadas, centrifugadas para a obtenção do soro, e aliqüotadas em eppendorf®. Amostras de soro e rim foram estocadas a -20°C até sua utilização.

Os cães comunicantes foram submetidos somente à coleta de sangue por punção da veia cefálica ou jugular com seringa e agulha 25x7 estéreis. Para a obtenção e estocagem do soro foi utilizada a mesma metodologia aplicada às amostras dos ratos.

Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Para detectar anticorpos contra *Leptospira* spp, os soros dos ratos e dos cães foram submetidos à prova de soroaglutinação microscópica (SAM), com antígenos vivos¹⁶. Foram utilizados 23 sorovares de referência: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcomb, Cynopteri, Fortbragg, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Sentot Tarassovi e Ballum. Os antígenos foram mantidos a 28°C por 5 a 10 dias em meio EMJH (DIFCO®-USA) modificado pela adição de soro de coelho⁰². Para as amostras de soro dos ratos foi utilizada a diluição de 1:25 como ponto de corte³⁴ enquanto para as amostras de cães a diluição 1:100¹⁶.

Foram considerados reagentes os soros que apresentaram pelo menos 50% das leptospiras aglutinadas. As amostras reagentes foram diluídas geometricamente na razão dois para determinação da diluição máxima positiva. A análise dos resultados considerou como sorovar mais provável aquele que apresentou maior título⁴⁰. Os soros que apresentaram coaglutinação na maior diluição foram considerados apenas reagentes para *Leptospira* spp⁰¹.

Extração do ácido nucléico

Foi realizado um pool de fragmentos de ambos os rins de cada rato, o qual foi triturado (10% p/v) em PBS, centrifugado a 3.000 x g por 15 min, o sobrenadante aliqüotado em frascos estéreis e congelados a -20°C até a extração.

A extração do DNA da leptospira foi realizada em 300 µL do sobrenadante do pool de rins como descrito na técnica da sílica/isotiocianato de guanidina⁰⁷. Amostras de controle negativo (água ultrapura autoclavada) e amostra de controle positivo, isolado local (Londrina 14, sorovar canicola⁰³) foram incluídas em todos os procedimentos.

PCR e Nested PCR

Para a realização da PCR foram utilizados os *primers lipL32* F: 5' CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT 3' e *lipL32* R: 5' CTCACCGATTTCGCCTGTTGGG 3', desenhados para amplificar um produto de 264 pb entre as posições 73 e 336 da região codificadora da *lipL32*. A nested PCR (n-PCR) foi realizada utilizando os *primers lipL32* R1: 5' CTCCCATTTCAGCGATTACGG 3' e *lipL32* F2: 5' TTCTGAGCGAGGACACAATCCC 3', que amplifica um produto de 183 pb da primeira amplificação²¹. A técnica de PCR e n-PCR foi realizada conforme Jouglard et al²¹. As reações foram realizadas em termociclador modelo TC 312, marca Techne®.

Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), e visualizados e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

Análise estatística

Os resultados sorológicos e de n-PCR em ratos e sorológicos em cães comunicantes foram tabulados utilizando-se o pacote estatístico EPI 6. Foram realizados os cálculos percentuais e verificada a associação entre a variável detecção da leptospirose em ratos e em cães por meio do teste de qui-quadrado, admitindo-se o nível de significância de 5%.

Resultados

Foram capturados 181 roedores identificados como *R. rattus*, resultando em 181 amostras de rins e 172 amostras de soro. Em 25 dos 37 pontos de captura de roedores, foi constatada a presença de 57 cães comunicantes, obtendo-se amostras de soro de todos eles.

A prevalência geral da leptospirose nos ratos estudados foi de 33/181 (18,23%) animais positivos em pelo menos uma das técnicas utilizadas.

Das amostras de soro de ratos, 16 (9,3 %) foram reagentes na SAM. Em 14 amostras foi possível determinar o sorovar mais provável e em duas amostras houve coaglutinação na diluição 1:25 (Tabela 1).

Na n-PCR, fragmentos de rim de 22 (12,15%) ratos apresentaram resultados positivos, amplificando um produto de 183 pb (Figura 2).

Apenas cinco dos 33 ratos positivos apresentaram positividade em ambas as técnicas. Resultados positivos somente na SAM foram encontrados em 11 ratos e somente na n-PCR em 17.

Das 57 amostras de soro de cães, sete (12,28%) foram reagentes na SAM. Os sorovares mais prováveis foram Canicola em cinco amostras (duas amostras com título de 100, uma amostra com 200 e duas 400), Pomona em uma (título de 1600), e Castellonis em uma (título de 100).

A análise da associação entre ratos e cães positivos para *Leptospira* spp não apresentou significância estatística ($p=0,05$).

Discussão

No Brasil, poucos são os estudos atuais de prevalência da leptospirose em ratos urbanos. Aqueles existentes não contemplam a real frequência da enfermidade nestes animais devido à ausência de planejamento amostral.

A prevalência da leptospirose nos ratos estudados de 18,23% foi bastante semelhante aos 20,6% obtidos em roedores silvestres no Chile³⁴. Resultados distintos foram obtidos nos Açores¹³ e na Índia³¹ com respectivamente 62,8% e 58% de roedores reagentes capturados em diferentes ambientes, enquanto resultados altamente variados, de 2,3 a 80,6%, foram relatados em roedores sinantrópicos em diferentes pontos do Japão²². A transmissão de *Leptospira* spp entre animais de vida livre (roedores) é dependente de fatores do meio ambiente, principalmente temperatura e umidade, os quais favorecem a sobrevivência deste microrganismo fora do corpo do hospedeiro e contribuem provavelmente para as diferenças nas prevalências observadas nas diferentes regiões citadas¹³. O conhecimento sobre a transmissão da *Leptospira* spp entre ratos é limitado, contudo existem evidências que associam alta densidade populacional de ratos à maiores taxas de portadores renais¹⁶ resultando em uma maior taxa de transmissão entre os animais¹².

Os 12,15% de ratos positivos na n-PCR realizada com os *primers* LipL32 confirmaram a presença de leptospiros no tecido renal destes animais. Langoni et al²⁴ utilizando a PCR com os *primers* LEP, não encontraram resultado positivo para *Leptospira* spp nos rins de 45 *R. rattus* estudados. Isto pode ter sido relacionado ao local de captura dos ratos na zona rural, onde a densidade populacional destes provavelmente é inferior a verificada em centros urbanos. Além disso a sensibilidade da PCR pode variar por diversos motivos, sendo um deles os *primers* selecionados.

Os *primers* utilizados no presente trabalho amplificam pela n-PCR um fragmento altamente conservado de DNA que codifica a lipoproteína LipL32, considerada a maior lipoproteína da membrana externa de leptospiros patogênicos de diferentes espécies genômicas e importante fator de virulência, sendo ausente em espécies não-patogênicas²¹.

Os 16/172 (9,3%) ratos sororeagentes detectados na SAM foram inferiores aos 17/56 (36,17%) encontrados em Duque de Caxias, Rio de Janeiro²⁶. Os locais descritos em Duque

de Caxias apresentavam sérios problemas de saneamento básico, como despejo de esgoto em valas a céu aberto, áreas sujeitas à inundação, sistema urbano de coleta de lixo inexistente, acúmulo de lixo em terrenos baldios e às margens de rios, condições consideradas favoráveis a proliferação de roedores da espécie *Rattus norvegicus* e também propícias à sobrevivência das leptospiros no meio ambiente. No presente estudo, tais condições não foram encontradas nos locais de captura dos roedores, apesar dos locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos acumularem lixo e água da chuva.

Entre os sorovares mais prováveis detectados nos ratos, o Pomona (3/16) foi o mais freqüente. Este sorovar tem sido descrito em estudos sorológicos na região norte do Paraná em outras espécies animais: eqüinos¹⁹, bovinos³⁵, e cães³².

Em Duque de Caxias, Rio de Janeiro foi detectado o sorovar Icterohaemorrhagiae em 16 dos 17 *R. norvegicus* sororeagentes²⁶. Este sorovar é mantido principalmente pelo *R. norvegicus*, o qual é encontrado com maior freqüência em regiões litorâneas⁰⁹. Neste trabalho, os resultados sorológicos não demonstraram o sorovar Icterohaemorrhagiae. A captura somente da espécie *R. rattus* pode ter sido o fator responsável pela não detecção deste sorovar na SAM dos ratos estudados em Londrina.

Embora a soropositividade (12,3%) nos cães semidomiciliados tenha sido próxima à soropositividade encontrada nos ratos (9,3%), não houve significância estatística entre esta variável. Também não houve relação entre a prevalência dos sorovares mais prováveis encontrados nos ratos e nos cães. O sorovar Canicola foi considerado o mais provável em cinco dos sete cães sororeagentes. O cão é o principal reservatório deste sorovar²⁵ e é provável que a transmissão entre estes animais tenha sido por contato direto com outros cães ou de modo indireto, principalmente pelo meio ambiente contaminado pela urina de cães portadores renais. A enfermidade em cães apresenta importante potencial zoonótico em meio urbano, devido a manutenção da *Leptospira* spp por cães reservatórios neste meio¹¹.

Entre os 33 ratos positivos na nested PCR e na SAM, somente cinco foram positivos nas duas técnicas. Essa discrepância entre resultados de técnicas diretas e indiretas tem sido relatada^{05 34 39}.

A presença de animais portadores renais da *Leptospira* spp, sem a detecção de anticorpos circulantes pode ser decorrente de infecções por sorovares não incluídos na bateria de antígenos utilizados na SAM, ou por uma alta adaptação do sorovar infectante ao hospedeiro²⁵.

Animais sororeagentes com ausência de leptospiras no rim podem indicar anticorpos residuais de uma infecção anterior por *Leptospira* spp, em condição de portadores renais temporários³⁷. Altas doses de inóculo de leptospiras patogênicas são necessárias para a transmissão ocorrer entre os roedores, pois inoculações com baixa dose infectante de bactérias, poderiam levar a estimulação do sistema imune, sem contudo resultar na condição de portador renal⁰⁴.

As infecções transmitidas entre os roedores e animais domésticos e homem são esporádicas, mas a alta densidade de roedores, ou alta prevalência de animais portadores podem acarretar no aumento destas infecções²⁰. Tal fato é relevante, já que os pontos de coleta deste trabalho estavam situados na zona urbana e dez dos 37 locais selecionados apresentavam residências junto aos pontos de coleta. A prevalência de ratos e de cães na SAM e a presença de ratos portadores renais de *Leptospira* spp patogênicas, indicaram a possibilidade de transmissão dessa zoonose ao homem.

Os locais de coleta deste trabalho, caracterizados como locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos, provavelmente ofereceram condições favoráveis para proliferação da espécie *R. rattus*. A manutenção deste ambiente propício à proliferação desta população, com conseqüente aumento da densidade populacional poderá levar a um aumento de animais portadores renais de *Leptospira* spp. É importante que se faça um

acompanhamento permanente pelo serviço de vigilância sanitária municipal junto aos ferros-velhos e locais de reciclagem de resíduos sólidos para controle populacional destes ratos urbanos e orientação dos trabalhadores para o uso de equipamentos de proteção individual.

Para a avaliação mais ampla da situação da leptospirose na cidade de Londrina, novos estudos deverão ser realizados a partir dos presentes dados, objetivando principalmente o isolamento de estirpes de leptospiras.

Agradecimentos

O autor agradece a Odir Dellagostin e Fabiana Seixas (UFPEL) pelo auxílio na metodologia empregada e a CAPES, Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI)/UGF e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Tabela 1. Sorovares mais prováveis de *Leptospira* spp e títulos detectados na prova de soroaglutinação microscópica (SAM) em 16 *Rattus rattus*, capturados na área urbana de Londrina – PR, no período de maio a dezembro de 2006.

Sorovar	Título				Total (n/%)
	25	50	100	400	
Pomona	0	0	2*	1	3 (18,8)
Shermani	2	0	0	0	2 (12,6)
Tarassovi	2*	0	0	0	2 (12,6)
Castellonis	0	0	1*	0	1 (6,2)
Copenhageni	0	0	1*	0	1 (6,2)
Autumnalis	0	1	0	0	1 (6,2)
Bratislava	0	1	0	0	1 (6,2)
Sentot	1	0	0	0	1 (6,2)
Hardjo	1	0	0	0	1 (6,2)
Bataviae	1	0	0	0	1 (6,2)
Coaglutinação	2*	0	0	0	2 (12,6)
TOTAL	9	2	4	1	16
%	56,3	12,5	25,0	6,2	100

* um animal positivo na n-PCR.

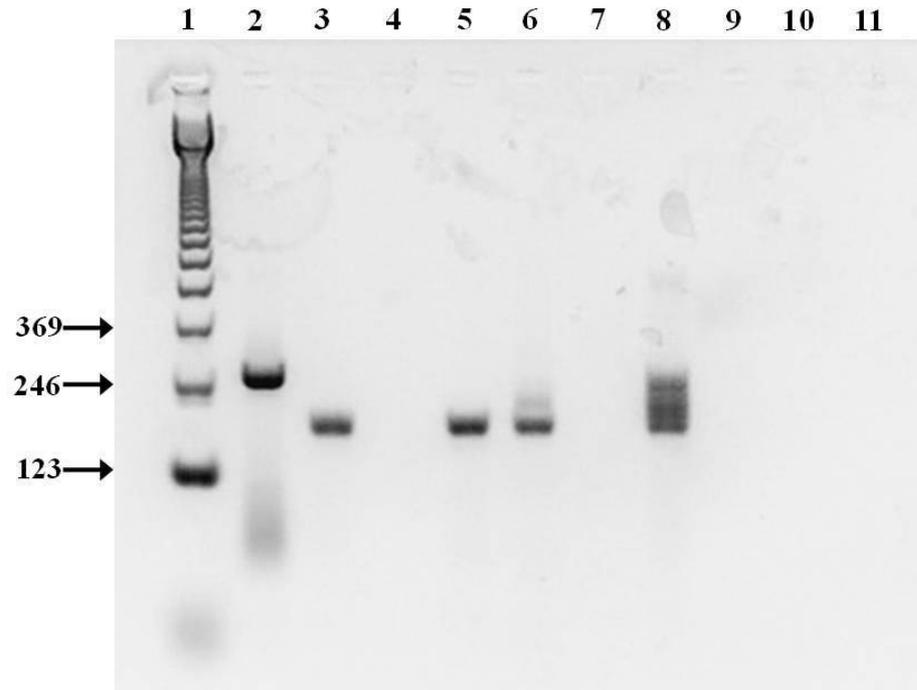


Figura 1 Nested PCR para *Leptospira* spp patogênicas de amostras biológicas de rim de *R. rattus* urbanos capturados em Londrina. Linha 1, 123 pb DNA Ladder (Invitrogen), linha 2, produto da PCR do controle positivo com 264 pb; linha 3, produto amplificado pela n-PCR do controle positivo com um fragmento de 183 pb, linhas 4, 7, 9 e 10, amostras de rim negativas na n-PCR, linhas 5, 6 e 8, amostras de rim positivas na n-PCR e linha 11, controle negativo.

Referências bibliográficas

01. Almeida LP, Martins LFS, Brod CS, Germano ML. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 28:76-81,1994.
02. Alves CJ. Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 1995
03. Anzai EK. Utilização da PCR para o diagnóstico da leptospirose em cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2006.
04. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, Ko AI, Reis MG. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropical* 105: 176-180, 2008.
05. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2008. Doi 10.1016/j.cimid.2008.05.004.(article in press)
06. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 757-771, 2003.
07. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503, 1990.

08. Branger C; Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, Andre-Fontaine G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiology Letters 243: 437-445, 2005.
09. Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual de Controle de Roedores. Brasília, 2002.
10. Brown PD, Carrington DG, Gravekamp C, Van de Kemp H, Edwards CN, Jones SR, Prussia PR, Garriques S, Terpstra WJ, Levett PN. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. Research in Microbiology 154: 581-586, 2003.
11. Cachay ER, Vinetz JM. A global research agenda for leptospirosis. Journal of Postgraduate Medicine 51: 174-178, 2005
12. Collares-Pereira M, Kover WJ, Terpstra M, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Mathias ML, Oom MM, Fons R, Libois R, Petrucci-Fonseca F. First epidemiological data of pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. European Journal of Epidemiology 13: 435-441, 1997.
13. Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Duarte-Rodrigues P. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). European Journal of Epidemiology 16: 1151-1157, 2000.
14. Dean GA, Dean AJ, Coulombier D. Epi Infoversion 6,04: A word processing, database and statistic program for epidemiology on microcomputer. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1994.
15. Faber NA, Crawford M, Lefebvre LB, Buyukmihci NS, Madigan JE, Willits NH. Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. Journal of Clinical Microbiology 38: 2731-2733, 2000.

16. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd edition. MedSci, Melbourne, 1999.
17. Figueiredo CM, Mourão AC, Oliveira MAA, Alves WR, Ooteman MC, Charmone CB, Koury MC. Leptospiose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 331-338, 2001.
18. Gravekamp C, Van De KH, Franzen M, Carrington D, Schoone GL, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of Genetical Microbiological* 139: 1691-1700, 1993.
19. Hashimoto VY, Gonçalves DD, Silva FG, Oliveira RC, Alves LA, Reichmann P, Müller EE, Freitas JC. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp in horses of the urban área of Londrina, Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 49: 327-330, 2007.
20. Hathaway SC, Blackmore DK. Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospires of the Ballum serogroup in the Black rat (*Rattus rattus*) and the Brown rat (*Rattus norvegicus*) in New Zealand. *Journal of Hygiene* 87: 427-436, 1981.
21. Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin AO. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 747-752, 2006.
22. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F, Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H. First Record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami islands, Japan. *Microbiology and Immunology* 50: 429-434, 2006.
23. Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1035-1039, 1994.

24. Langoni H, Souza LC, Da Silva AV, Cunha ELP, Silva RC. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science 45: 190-199, 2008.
25. Levett PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 14: 296-326, 2001.
26. Lilenbaum W, Ribeiro V, Martin E, Bispo V. Estudo sorológico para detecção de anticorpos anti-leptospira em *Rattus norvegicus* de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Latinoamericana de Microbiologia 35: 357-360, 1993
27. Martini EZ, Pizarro R. Leptospirosis. Puesta al dia. Revista Chilena de Infectologia 24: 220-226, 2007
28. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I, Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 30: 2219-2224, 1992.
29. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. Journal of Microbiological Methods 65: 247-257, 2006.
30. Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roed B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. Molecular and Cellular Probes 19: 111-117, 2005.
31. Priya CG, Hoogendijk KT, Berg MVD, Rathinam SR, Ahmed A, Muthukkaruppan VR, Hartskeerl RA. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. Journal of Postgraduate Medicine 53: 236-240, 2007.

32. Querino AMV, Delbem ACB, Oliveira RC, Silva FG, Müller EE, Freire RL, Freitas JC. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina, Paraná. *Semina Ciências Agrárias* 24: 27-34, 2003
33. Reitstetter RE. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS Microbiology Letters* 264: 31-39, 2006.
34. Riedemann S, Zamora J, Cabezas X. Leptospirosis en roedores silvestres capturados en la ciudad de Valdivia: Diagnostico por serologia y tincion immunoquimica. *Agro-Ciencia* 10: 127-132, 1994.
35. Rodrigues CG, Müller EE, Freitas JC. Leptospirose bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brazil. *Ciência Rural* 29: 309-314, 1999.
36. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during na urban epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 605-610, 2002
37. Songer JG, Chilelli CJ, Reed RE, Trautman RJ. Leptospirosis in rodents from an arid environment. *American Journal of Veterinary Research* 44: 1973-1976, 1983.
38. Taylor KD, Turner LH, Everard JD. Leptospire in *Rattus* spp on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 94: 102-103, 1994
39. Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and enviromental characteristics in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 60: 227-235, 2003.
40. Vasconcellos SA, Barbarini Júnior O, Umehara O, Morais ZM, Cortez A, Pinheiro SR, Ferreira F, Fávero ACM, Ferreira Neto JS. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de

Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul no período de janeiro a abril de 1996. Arquivos do Instituto Biológico 64:7-15, 1997.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

- A prevalência da leptospirose nos ratos capturados nos locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos de Londrina, de maio a dezembro de 2006, foi de 18,23% (33/181).
- Há necessidade de controle da população de roedores nos locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos.
- A nested-PCR confirmou a presença de *Leptospira* spp patogênica nos rins dos roedores da espécie *Rattus rattus*.
- É necessária a associação de técnicas diretas e indiretas para o diagnóstico da leptospirose em *Rattus rattus*.
- Não houve associação entre os sorovares de *Leptospira* spp observados na SAM em ratos e em cães.

ANEXO A: Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 57/2006

Londrina, 30 de agosto de 2006.

Prezada Pesquisadora

O CEEA/UEL, reunido aos 22 de agosto do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Leptospira* sp, anti-*Leishmania* sp, endoparasitas, ectoparasitas e hemoparasitas em roedores urbanos capturados na cidade de Londrina-PR**", registrado no CEEA sob o nº 28/06, projeto de Dissertação junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, desenvolvido sob sua responsabilidade e orientação. Esclarecido o aspecto metodológico solicitado, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,


Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa
Coordenador do CEEA/UEL

**Ilma. Sra.
Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Coordenadora do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias**

ANEXO B: Normas de Publicação do periódico *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*



REVISTA DA
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MEDICINA TROPICAL

ISSN 0037-8682 *versão
impressa*
ISSN 1678-9849 *versão on-line*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivo e política editorial
- Preparação de originais

Objetivo e política editorial

A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** destina-se à publicação de trabalhos científicos relacionados às doenças infecciosas e parasitárias, medicina preventiva, saúde pública e assuntos correlatos.

A revista tem periodicidade bimestral e aceitará trabalhos de pesquisadores brasileiros ou estrangeiros desde que obedeçam às normas e que sejam aprovados pelos relatores indicados pelos Editores.

1. Além de **Artigos**, a revista publica **Comunicações** para a divulgação de resultados de ensaios terapêuticos, notas prévias, relatórios técnicos, relatos de casos, cartas ao editor, fatos históricos, resenhas bibliográficas e resumos de teses. Artigos de revisão e editoriais serão publicados por solicitação do Corpo Editorial.

2. Os trabalhos devem ser originais e inéditos, digitados em espaço duplo, deixando margem de 3 cm à esquerda e remetidos em três vias ao endereço abaixo, sendo uma a original. Após revisão, pede-se que os trabalhos sejam enviados em disquete, devidamente acompanhados de uma cópia impressa da versão revisada.

Preparação de originais

3. Normas para enviar trabalhos, após revisão, em meio eletrônico; obedecer os seguintes requisitos:

a) podem ser utilizados disquetes MS-DOS compatíveis nos formatos 3 1/2" ou 5 1/4". Disquetes de Macintosh no formato 3 1/2" também serão aceitos. Elimine dos disquetes todos os arquivos não pertinentes ao artigo enviado. Escreva na etiqueta do disquete: título do artigo, nome do autor, nome do arquivo, editor de texto utilizado e nome dos arquivos acessórios (folhas de estilos, gráficos, tabelas etc);

b) envie artigos compatíveis com os seguintes processadores de texto: Word para Windows (versão 6.0 ou anterior), Word para Mac (versão 6.0 ou anterior), outros formatos podem ser aceitos mediante consulta prévia. Nunca envie artigos em

formato ASCII (só texto/"text only");

c) ao redigir o texto, o comando de retorno de linha ("Enter") deve ser utilizado exclusivamente no final dos parágrafos. Não adicione espaços extras ou "tabs" ao texto para obter recuo da primeira linha ou centralização de títulos na página. Tampouco retornos ("enters") adicionais para espaçar os parágrafos. Para obter esses efeitos, utilize apenas os comandos de formatação de parágrafo, disponíveis em todos os editores de texto acima;

d) podem ser incluídas tabelas, desde que montadas no próprio editor de texto. Observações e notas de rodapé devem ser, preferencialmente, colocadas após o final do artigo, devidamente numeradas e referenciadas;

e) ilustrações, tabelas e gráficos produzidos em outros programas e "importados" para inclusão no texto devem ser enviados em arquivos anexos, em formatos universais de fácil compatibilidade (TIFF, BMP, PICT, GIF etc). Evite formatos não-padronizados (EPS, WMF etc) e arquivos que só podem ser abertos por programas específicos. De qualquer forma, envie sempre uma cópia bem impressa do gráfico, tabela ou ilustração para eventual reprodução.

4. Os trabalhos devem ser redigidos preferencialmente em português, embora sejam também aceitos trabalhos em inglês e espanhol. A linguagem deve ser clara e precisa, e o texto conciso normalmente não ultrapassando 12 páginas digitadas para **Artigos** e 6 para **Comunicações**.

5. A seguinte seqüência deve ser observada:

a) **título** original e traduzido e nome dos autores em letras minúsculas. No rodapé, instituição onde foi realizado o trabalho, filiação dos autores, quando for o caso, órgão financiador e o endereço completo para correspondência, inclusive telefone, fax e e-mail;

b) **resumo**: máximo de 150 palavras para os artigos e 50 para as comunicações e relatos de casos. Deve ser informativo e não indicativo, apresentando o objetivo do trabalho, como foi realizado, os resultados alcançados e a conclusão. Não usar abreviaturas ou citações bibliográficas. Citar 4 ou 5 palavras-chave, que expressem com precisão o conteúdo do trabalho;

c) **abstract**: inserido logo após o resumo, deve ser a tradução fiel do mesmo, seguido pelas key-words;

d) **introdução**: clara, objetiva, contendo informações que justifiquem o trabalho, restringindo as citações ao necessário;

e) **material e métodos**: descrição concisa, sem

omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser referidos por citação;

f) **resultados**: sempre que necessário devem ser acompanhados por tabelas, figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. Texto e documentação devem ser complementares. Quando aplicáveis, os dados deverão ser submetidos à análise estatística. O conteúdo deve ser informativo, não interpretativo;

g) **discussão**: limitar aos resultados obtidos e conter somente as referências necessárias. O conteúdo deve ser interpretativo e as hipóteses e especulações formuladas com base nos achados;

h) **agradecimentos**: limitados ao indispensável;

i) **referências bibliográficas**: digitadas em minúsculas, sem ponto entre as abreviaturas, em espaço duplo, numeradas e organizadas em ordem alfabética pelo último sobrenome do autor; citar todos os autores de cada referência. Quando houver mais de uma citação do mesmo autor, seguir a ordem cronológica. As citações devem ser referidas no texto pelos respectivos números, acima da palavra correspondente, sem vírgula e sem parênteses; na lista de referências, deve seguir o seguinte estilo e pontuação:

Artigos em periódicos (os títulos dos periódicos devem aparecer por extenso):

Coura JR, Conceição MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Baarbosa no diagnóstico da esquistossomose mansoni. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 8:153-158, 1974.

Livros:

Chandra RK, Newberne PM. Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions. Plenum, New York, 1977.

Capítulos de livros:

Fulton JD. Diagnosis of protozoal diseases. In: Gell PGH, Coombs RRA (ed) Clinical aspects of immunology, 2nd edition, Blackwell, Oxford, p.133-136, 1968.

Resumos de congressos:

Daher RH, Almeida Netto JC, Pereira LIA. Disfunção hepática na malária grave. Estudo de 161 casos. In: Resumos do XXXI Congresso da Sociedade Brasileira

de Medicina Tropical, Brasília p.16, 1995 .

Teses:

Tavares W. Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*. Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do bacilo tetânico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1975.

Somente deverão ser citados os trabalhos publicados. Dados não publicados ou comunicações pessoais devem ser referidos no texto da seguinte forma: (AB Figueiredo: comunicação pessoal, 1980) e (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados).

6. Tabelas: numeradas em algarismos arábicos e dotadas de título descritivo conciso. Manter seu número ao mínimo necessário e lembrar que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em folhas separadas, sem linhas verticais e as unidades referidas no título de cada coluna. Todos os dados das tabelas, inclusive o título, devem ser em minúsculas, exceto as siglas.

7. Ilustrações: de boa qualidade e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Além das fotografias, os gráficos, quadros etc. devem ser referidos no texto como Figuras. Anotar no verso com lápis o número da figura e o nome do autor e trabalho. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada e em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário.

8. Comitê de ética: no trabalho de pesquisa envolvendo seres humanos, deverá constar o nome do Comitê de Ética que o aprovou.

9. Permissão dos autores: anexar carta com o ciente de todos os autores concordando com a publicação.

[[Home](#)] [[Sobre a revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]

© 2009 SBMT

Praça Thomaz Uihôa, 706
Caixa Postal 118
38001-970 Uberaba MG Brasil
Tel.: +55 34 3318-5287
Fax: +55 34 3318-5279



rsbmt_fmtm@mednet.com.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)