



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ISABELLA QUEIROZ COSTA

**IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-LEPTOSPIRA EM CÃES NA ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE
CASOS HUMANOS NO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA

2020



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ISABELLA QUEIROZ COSTA

**IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-LEPTOSPIRA EM CÃES NA ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE
CASOS HUMANOS NO DISTRITO FEDERAL**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Lucas Edel Donato

BRASÍLIA

2020

RESUMO

A Leptospirose é uma zoonose endêmica transmitida principalmente por roedores. Ela é capaz de causar quadros febris, agudos, com comprometimento renal e hemorragias em humanos e cães, sendo encontrada principalmente em regiões subtropicais e tropicais, com aumento de casos no período de maior índices de chuva. Portanto, é de extrema importância o conhecimento da circulação dos anticorpos anti-leptospira em cães e a realização de testes rápidos, levando em consideração a possibilidade destes animais serem responsáveis pela manutenção da circulação da bactéria. Sendo assim, o trabalho é um estudo retrospectivo das amostras de soro de cães coletadas pela Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal em 2019. Essas amostras são de áreas com transmissão de casos de leptospirose de acordo com Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Foram analisadas 120 amostras de soro canino escolhidas de forma aleatória, disponibilizadas pela Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal. Para identificação do anticorpo (IgG) anti-leptospira foi utilizado o teste ImunnoComb produzido pelo laboratório Biogal Galed Laboratories Acs Ltd. Os resultados demonstraram que das 120 amostras distribuídas entre 27 Regiões Administrativas do Distrito Federal, 26 foram reagentes e 94 não reagentes para a doença. Concluiu-se que há circulação de anticorpos IgG anti-leptospira em cães nas áreas de transmissão humana da doença, participando assim do ciclo de transmissão da doença para o homem. E o teste ImmunoComb pode ser considerado uma alternativa na triagem destes inquéritos sorológicos, se apresentando como útil para fazer a triagem dos animais positivos e oportunizando a realização de um manejo terapêutico correto.

Palavras-Chave: Leptospirose. ImunnoComb. ELISA. Diagnóstico.

SUMÁRIO

I.	
INTRODUÇÃO.....	3
.....	
II.JUSTIFICATIVA.....	5
.....	
III. FUNDAMENTAÇÃO	
TEÓRICA.....	6
IV.	
METODOLOGIA.....	11
.....	
V. RESULTADOS	
ESPERADOS.....	
14	
VI. RESULTADOS E	
DISCUSSÃO.....	14
VII.	
CONCLUSÃO.....	19
.....	
VIII.CRONOGRAMA.....	19
.....	
IX. PLANO DE	
TRABALHO.....	20
....	
X.	
REFERÊNCIAS.....	21
.....	

I. INTRODUÇÃO

Historicamente, a fixação do ser humano na terra, gerando resíduos alimentares e o crescimento dos povoados e cidades por conta do êxodo rural causaram uma grande urbanização que não foi auxiliada por um planejamento territorial e ambiental, gerando consequências negativas que ainda não foram resolvidas (BRASIL, 2002; ALVES et al., 2018).

Com isso, entre as principais doenças infecciosas relacionadas a falta de saneamento, destaca-se a leptospirose, que é uma zoonose endêmica transmitida principalmente por roedores. Causando quadros febris, agudos, com comprometimento renal e hemorragias. Ademais, os fatores que favorecem a persistência do agente etiológico em questão são principalmente: Grau elevado da variação antigênica, sobrevivência em ambientes com ausência de hospedeiros e ampla variedade de vertebrados suscetíveis, que estão aptos a serem hospedeiros do microrganismo (ARAUJO, 2000).

Essa doença geralmente está presente em roedores, que não a manifestam, mas têm colonização renal a longo prazo e organismos excretados na urina, o que é essencial para o ciclo de vida da leptospirose (FOUTS et al., 2016).

Com isso, a leptospirose apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita, porém é favorecida em locais de climas tropicais ou subtropicais. Essa doença possui taxas maiores de ocorrência nas épocas quentes e chuvosas do ano, apesar de também estar presente durante todas as estações. Portanto, no Brasil essa zoonose apresenta uma alta importância no ponto de vista social e econômico por conta da sua grande incidência em humanos, percentual expressivo das internações, alto custo de tratamentos hospitalares e por sua letalidade. (ARAUJO, 2000; BRASIL, 2014; MIRAGLIA et al.; 2015).

Estudos relataram que houve 29 casos confirmados de leptospirose entre 2011 e 2012 no DF, além de em 2011 serem constatadas 10 regiões como prováveis locais de infecção, sendo as com maior número de casos Sobradinho e Riacho Fundo, porém, também em Brasília, Brazlândia, Planaltina, Paranoá, Lago Norte, Águas Claras e Jardim Botânico. Entretanto, em um estudo feito entre 2011 a 2015 verificou-se que a leptospirose humana no DF teve predominância em áreas urbanas com circunstâncias sanitárias adequadas, acesso à rede de esgoto, a água tratada e a serviços de coleta de lixo. Evidenciando uma grande associação da doença com os roedores sinantrópicos em locais de infecção. Ademais, existem estudos que identificam o cão como fonte de infecção devido ao seu

relacionamento com o ser humano (SILVA, 2013; SANTOS,2016; CASTRO et al., 2010; BATISTA et al., 2004).

Visto isso, no ano de 2017 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 3.039 casos de leptospirose no país. Por ser uma zoonose esta doença apresenta uma grande importância social e econômica, devido a elevada incidência em determinadas áreas, alto custo hospitalar e perdas de dias de trabalho, como também por sua letalidade, que pode chegar a 40%, nos casos mais graves.

Sendo assim, a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) é um método de referência para fazer a análise sorológica da leptospirose, também sendo utilizada para propósitos epidemiológicos. Ela apresenta uma sensibilidade superior à ação de soroaglutinação macroscópica e alta especificidade. O título de MAT é conquistado através de testes feitos a partir de inúmeras diluições de soro com o sorovar positivo, partindo do princípio de que o sorovar que reagir com o soro do paciente é o sorovar infectante. (SOARES et al.,2012; CHINTANA et al.,2014)

Entretanto, outros diagnósticos são utilizados, levando em consideração as informações obtidas nos sinais clínicos, anamnese e exames gerais feitos no indivíduo. (HAGIWARA et al, 2015)

Com isso, diante do exposto é de extrema importância a realização de testes rápidos e acessíveis, a fim de promover o diagnóstico precoce do cão e posteriormente tomar os devidos cuidados para que a doença não se dissemine por meio da urina do animal, podendo chegar a acometer humanos.

II.JUSTIFICATIVA

No ano de 2017 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 3.039 casos de leptospirose no país. Por ser uma zoonose esta doença apresenta uma grande importância social e econômica, devido elevada incidência em determinadas áreas, alto custo hospitalar e perdas de dias de trabalho, como também por sua letalidade, que pode chegar a 40%, nos casos mais graves. Ademais sua ocorrência está relacionada às precárias condições de infraestrutura sanitária e alta infestação de roedores infectados. As inundações propiciam a disseminação e a persistência do agente causal no ambiente, facilitando a ocorrência de surtos.

Diante do exposto, o Distrito Federal apresenta áreas de transmissão da doença, e é de extrema importância um diagnóstico rápido e barato, a fim de adiar o manejo terapêutico do paciente, reduzindo o risco de evolução para desfechos mais graves.

OBJETIVO GERAL

Identificar a presença de anticorpos (IgG) anti-leptospira em cães oriundos de áreas com histórico de transmissão humana no Distrito Federal.

ESPECÍFICOS

Obter o conhecimento da circulação dos anticorpos anti-leptospira em cães por meio da realização de testes rápidos, levando em consideração a possibilidade destes animais serem responsáveis pela manutenção da circulação da bactéria.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O saneamento básico é indispensável para a prevenção de doenças, oferecendo uma condição de vida satisfatória para as pessoas. No entanto, no Brasil, a deficiência desse saneamento básico, altos índices pluviométricos, aglomerações urbanas de baixa renda, a infestação de roedores e os cães errantes que frequentemente andam de um lugar para o outro nas cidades contribuem para a disseminação de doenças (FERREIRA & GARCIA, 2017; BRASIL, 2011; BATISTA et al., 2014).

A identificação do agente etiológico da leptospirose foi realizada por Inada e Ido, no ano de 1915 no Japão, e Uhlenhuth Fromme na Alemanha por meio de estudos independentes, porém em 1918, Noguchi reclassificou o agente, fazendo assim a criação do gênero leptospira. No Brasil, os primeiros trabalhos realizados a respeito sobre a leptospira foram no ano de 1917, sendo publicados por Aragão, tendo o primeiro relato da doença em cães realizado por Hafer, em 1850 (ARAUJO, 2000).

As leptospiros são microrganismos helicoidais finos, com diâmetro variável entre 6 à 20 mm, também são aeróbicos estritos, apresentando uma ou ambas as extremidades encurvadas ou também podem se apresentar em forma de gancho. Se desenvolvem bem entre 28° à 30°C, tendo seu tempo de geração variando entre 7 e 12 horas. Já a sobrevivência da bactéria em questão na água depende das condições em que se encontra o pH, temperatura, salinidade e grau de poluição, sendo todas as leptospiros sensíveis ao pH ácido de 6,8 ou menos. (SIMÕES & LUCIANA; 2016).

Elas também se manifestam em diferentes aspectos de patogenicidade agregados à invasão dos hospedeiros e o dano nos tecidos dos animais. Visto isso, o gênero da leptospira foi dividido em duas espécies: *L. interrogans sensu lato*, que apresenta todas as cepas patogênicas e *Leptospira biflexa sensu lato*, que apresenta todas as cepas saprófitas do ambiente. Além disso, a leptospira é formada por parede celular que é comum em bactérias grã negativas, apesar de não se corar por métodos habituais de anilina e nem por corantes à base de Romanowsky. Ainda, vale ressaltar que a parede celular da leptospira possui um envoltório externo repleto de mucopéptido e lipopolissacarídeos, das quais a alteração determina os diferentes sorovares e a formação de anticorpos por parte dos hospedeiros (GREENE, 2015; MEGID et al., 2016).

Nos dias atuais, a classificação da *Leptospira* é diferenciada por antigênica e gênica. A classificação antigênica é baseada na diferenciação dos antígenos de superfície das espécies de *Leptospira*, tendo os sorovares que apresentam antígenos em comum caracterizados em sorogrupos, sendo conhecidos 24 sorogrupos que apresentam aproximadamente 250 sorovares. Já a classificação gênica é baseada de acordo com a homologia do DNA, de maneira que o gênero *Leptospira* começou a ser classificado em genoespécies, apresentando 20 espécies e em cada espécie identificadas vários sorovares. Essas espécies são agrupadas em não patogênicas, intermediárias e patogênica, sendo que na leptospirose canina a *L. interrogans* é a espécie com maior importância e prevalência por que engloba os grupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* que apresentam os sorovares que afetam os cães (MEGID et al.,2016)

Com isso, a leptospirose apresenta uma distribuição mundial, porém ocorre com mais frequência em países ou regiões tropicais e subtropicais, por conta da alta pluviosidade. Nesses lugares essa doença costuma demonstrar variações de acordo com as estações do ano, apresentando maiores ocorrências na época em que há altos índices pluviométricos (MEGID et al.,2016).

Ademais, como já foi citado anteriormente, um dos principais reservatórios da doença são os ratos, entre eles estão os chamados sinantrópicos que se relacionam com o ser humano por terem seus territórios prejudicados pelas ações do próprio ser humano. Dentre essas espécies estão a ratazana (*Rattus norvegicus*), o rato de telhado (*Rattus rattus*) e o camundongo (*Mus musculus*) que são importantes por terem uma vasta distribuição e serem os culpados pela maior parte dos danos econômicos e sanitários. (BRASIL, 2002; BRASIL,2014)

A ratazana, também chamada de rato de esgoto, rato marrom, etc., é a espécie mais frequente na faixa litorânea brasileira, vivendo em colônias nas quais o tamanho varia de acordo com o espaço disponível e o alimento no local habitado. Apesar dessa espécie poder transitar em grandes distâncias em situações de urgência, esses ratos apresentam um raio de atividade em um curto território, dificilmente ultrapassando os 50 metros (BRASIL,2002).

Já o rato de telhado, também chamado de rato preto, rato de forro, rato de navio, etc., é um roedor que têm sua predominância em grande parte do interior do Brasil e, além das diversidades morfológicas, os ratos de telhado apresentam costumes, comportamentos e territórios bem diferentes da ratazana e por ser uma espécie rural, os ratos de telhado

ainda mantêm a prática de viver nos lugares altos, onde constroem seus ninhos e vivem em colônias com indivíduos com laços parentais, descendo à superfície quando precisam procurar comida e água (BRASIL,2002).

E por fim, temos o camundongo, também chamado de mondongo, catita, rato caseiro, rato de gaveta, etc., é a espécie que alcança o mais elevado nível de distribuição, sendo avistada em praticamente todas as regiões geográficas e climáticas do planeta (BRASIL,2002).

Visto isso, essa doença prejudica cães sem diferenciar sexo, raça e faixa etária e sua transmissão se dá de forma direta e indireta. A transmissão direta acontece, normalmente pelo contato com a urina e, eventualmente, por meio do sangue de animais doentes, tal como transmissão venérea, via placentária e ingestão de tecidos contaminados por conta da predação, fazendo a leptospira alcançar a corrente sanguínea por meio da mucosa da boca, olhos ou tecidos feridos, mas ainda é capaz de atravessar a pele para infectar a mucosa independentemente (MEGID et al.,2016; FILHO et al., 2015).

A patogenia da bactéria é relacionada à penetração da mesma pelas mucosas, pele estratificada ou íntegra. Tendo estas barreiras vencidas, tem-se o início da leptospiremia, que significa a multiplicação de leptospiras no espaço intersticial, no sangue, linfa e líquido, sendo este um quadro agudo da doença. As primeiras lesões estão relacionadas à ação do microrganismo nas células endoteliais de revestimento vascular, que causa um rompimento dos vasos, causando hemorragias, trombose e bloqueio de aporte sanguíneo nas áreas acometidas. Esta fase da leptospira cessa quando os anticorpos opsonizantes surgem na corrente sanguínea, por volta de dez dias após a infecção, eliminando as bactérias da corrente sanguínea e órgãos prejudicados, porém, as leptospiras presentes em locais protegidos do sistema imune podem prevalecer, sendo estes o trato genital e rins. Contudo, sua forma mais severa é constituída de principais sintomas como manifestações renais e hepáticas e icterícia, que é uma importante manifestação de disfunção hepáticas, porém este mecanismo não permanece completamente elucidado (SIMÕES & LUCIANA; 2016).

Assim, constantemente a leptospirose varia em gravidade, indo desde uma febre suave e moderada até uma doença fatal que ameaça a vida. Quando essa doença surge, uma vasta quantidade de órgãos podem ser acometidos, refletindo o caráter sistêmico da infecção. E, por consequência disso, os sintomas da leptospirose apresentam várias formas e

constantemente pode ser confundida com diversos outros fatores que levam à síndrome febril aguda (HAAKE & LEVETT, 2015).

Visto isso, em cães com leptospirose os sintomas de gravidade da manifestação clínica dependem da virulência do sorovar infectante, da imunidade do animal, da vacinação em dia e a idade, visto que animais muito jovens e idosos são mais vulneráveis à doença de maior gravidade e o diagnóstico é reservado (MEGID et al.,2016).

Portanto, o tratamento da Leptospirose em cães é dependente de um diagnóstico prematuro da doença, porque uma terapia na fase inicial oferece maior chance de resultados positivos na melhora do animal. Nesse tratamento algumas metas principais devem ser obtidas, como: Inativação do causador da patogenia e restauração da função hepática e renal. (MEGID et al.,2016).

A fim de alcançar esse tratamento, o diagnóstico da leptospirose leva em conta as características epidemiológicas, sinais clínicos e os exames laboratoriais , incluindo os moleculares , patológicos e necróticos para confirmação do indivíduo positivo. De modo que, a utilização de métodos para a identificação da leptospira se dá por cultura bacteriana, que é feita a partir da isolamento de amostras desse microrganismo, a fim de aumentar o entendimento acerca da epidemiologia da leptospirose; exame microscópico como o exame em campo escuro, que é utilizado para o reconhecimento rápido das leptospiros viáveis, levando em consideração que não dá para corar esse agente por métodos habituais com corantes de anilina; imunodeteção, que expõem técnicas de aglutinação-adsorção e que faz uso de anticorpos monoclonais e, por fim, também há o meio da detecção gênica, que proporciona a definição mais específica das cepas. (MARTINS et al, 2016; MEGID et al.,2016; GREENE,2015).

Entretanto, grande parte dos casos de leptospirose são diagnosticados por sorologia, sendo os exames mais utilizados, a Soroaglutinação microscópica (MAT) e o ELISA. O ELISA é um exame capaz de detectar anticorpos de IgG e IgM anti-leptospira, estes anticorpos são detectados pelo exame semanas após a o início da infecção do indivíduo, sendo aparentes entre um a duas semanas, chegando no maior título em duas semanas no caso do IgM, e no IgG o título máximo é na quarta semana sendo detectável ao teste entre duas a três semanas pós-infecção, este diagnóstico é mais sensível e específico para os sorogrupos. Já a Soroaglutinação microscópica (MAT) é um método indicado pela Organização mundial da Saúde (OMS), sendo um exame padrão ouro utilizado para o diagnóstico da doença em

animais e humanos. Este exame sorológico demanda a utilização de leptospiras vivas com o objetivo de avaliar a formação de antígenos em conjunto com os anticorpos que estariam presentes no soro do animal suspeito, esta técnica é elaborada em duas etapas, a primeira etapa, consiste na triagem dos soros dos animais testados em conjunto com dos sorovares específicos em proporção de diluição de 1:100, após esta etapa, os soros que reagiram na diluição, serão diluídos novamente na segunda etapa em razão dois sucessivamente, serão considerados positivos soros que aglutinam 50% ou mais de antígenos presentes na diluição. O MAT é um método com boa especificidade e sensibilidade, sendo capaz de identificar imunoglobulinas do tipo IgG e IgM, que normalmente é mais ativo no processo de aglutinação, todavia, poucos laboratórios no Brasil podem efetuar esse teste, sobretudo, por precisar de um laboratório bem estruturado, além de poder ocorrer a presença de reações falso positivos em soros de animais recentemente infectados ou na utilização de antígenos de sorogrupos que normalmente não são encontrados naquele local (MEGID et al.,2016; HAGIWARA et al, 2015; MARTINS et al., 2016).

Entretanto, um impasse característico da leptospirose é a característica clínica semelhante a outras enfermidades juntamente com a ausência de uma técnica de diagnóstico laboratorial veloz, sensível e de baixo custo, já que os meios habituais requer um longo período de tempo e trabalho (ZAHORCAK,2011).

Visto isso, o immunoComb é um ELISA adaptado, que pode ser caracterizado como uma enzima marcada com “ensaios de pontos” que identifica o grau de anticorpo no soro, plasma ou sangue total. Seu kit apresenta cada um dos reagentes essenciais para desempenhar o teste, o qual obtém resultado em 23 minutos. Entretanto não é um teste designado para distinguir sorotipos específicos e monitorar a vacinação (BIOGAL GALED LABORATORIES,2018)

Esse teste apresenta 2 itens principais: Um cartão de plástico em forma de pente que apresenta 12 dentes, o qual será suficiente para 12 testes; e um compartimento com várias placas de revelação. Cada dente deverá ser colocado em uma determinada coluna de poços da placa de compartimento, podendo ser realizado de maneira coletiva ou individual. Sendo assim, a parte inferior do dente do pente é destinado a amostra teste e a parte superior é destinado ao controle positivo. (BIOGAL GALED LABORATORIES,2018)

A profilaxia da leptospirose inclui o controle de ratos em canis, limpeza do ambiente a fim de deixar mais difícil a sobrevivência da bactéria, isolar animais infectados, remover diariamente restos de alimentos e limpeza diária de bebedouros e comedouros dos animais, dificultando o acesso dos ratos aos alimentos oferecidos aos cães. Além disso, para que um plano de controle de ratos dê resultados positivos deve-se seguir parâmetros de saneamento básico, portanto, em um local onde não haja recolhimento de lixo não há fundamento para a execução imediata do controle de roedores sem primeiro instaurá-lo, exceto em casos de ameaça à saúde pública (GREENE,2015; MEGID et al.,2016; BRASIL,2002).

IV. METODOLOGIA

Área de estudo

A área de estudo compreende o Distrito Federal que é uma das 27 unidades federativas do Brasil. Situado na Região Centro-Oeste, é a menor unidade federativa brasileira e a única que não tem municípios, sendo dividida em 31 regiões administrativas, totalizando uma área de 5 779,999 km². Em seu território, está localizada a capital federal do Brasil, Brasília, que é também a sede de governo do Distrito Federal. O clima predominantemente é o tropical sazonal, com uma estação chuvosa e quente (verão), normalmente compreendida entre outubro e março, e outra fria e seca (inverno), compreendida entre abril e setembro. Os índices de umidade giram em torno de 25% no inverno e 68% no verão, o que culmina em um clima típico do cerrado. A temperatura média é muito agradável, na maior parte do ano, com variações que vão de 13 até 27 graus celsius, constituindo uma temperatura média anual que gira em torno de 20 graus celsius. A média das precipitações anuais ficam entre 1.200 e 1800 milímetros. A inclusão do Distrito Federal neste estudo deve-se a relatos de casos de leptospirose diagnosticados ao longo dos últimos anos, da alta densidade populacional encontrada neste município e do acelerado desenvolvimento com intensa migração de pessoas e animais, gerando risco de expansão da doença para outras localidades. Até o presente momento, não existem artigos sobre a eficácia do teste diagnóstico apresentado.

Desenho do estudo e amostragem

Trata-se de um estudo de cunho retrospectivo.

Foram selecionados de forma aleatória amostras de 120 soros disponibilizados pela Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal (DIVAL) coletada durante o ano de 2019.

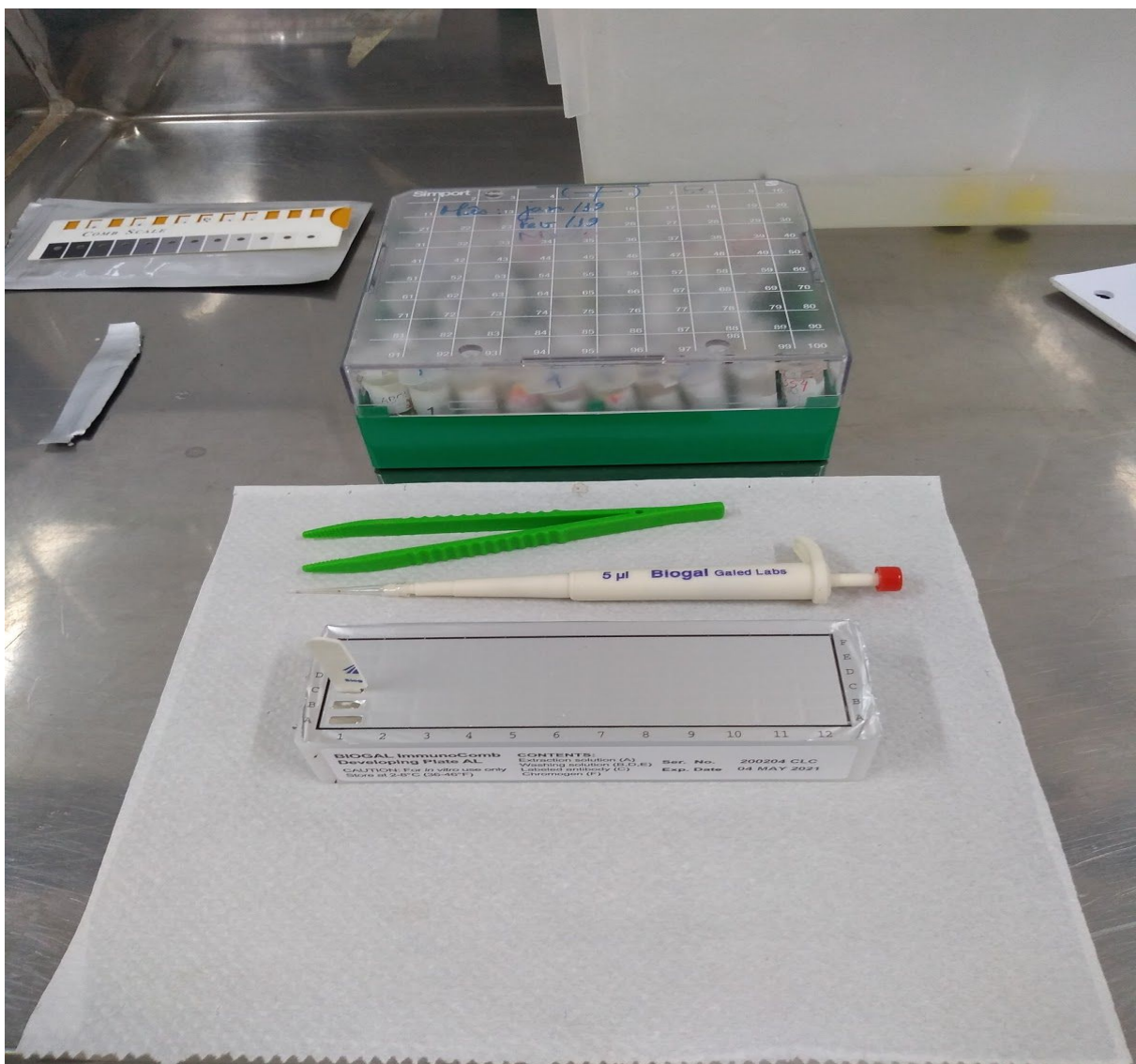
Teste ImunnoComb

Trata-se de um teste imunológico capaz de identificar anticorpos IgG anti-leptospira em sangue total ou presentes na composição de soro ou plasma. Para se iniciar o teste, a placa de desenvolvimento, juntamente com as amostras e os outros itens do kit devem ser deixados em temperatura ambiente para a realização do exame. As amostras de sangue devem ser coletadas e inseridas em tubos anticoagulantes ou em composição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, os reagentes da placa devem ser misturados lentamente balançando a placa de desenvolvimento antes da utilização de maneira sutil.

A pinça (um dos componentes do kit) será utilizada para violar a tampa de alumínio do poço da primeira fileira (A) e deposite 5µl do soro ou amostra de plasma nos primeiros 12 poços da placa de desenvolvimento, se em casos de uso do sangue completo, utilizar 10µl, levantando o êmbolo da pipeta várias vezes na intenção de misturar com o conteúdo da placa. Não se deve romper a tampa de alumínio nas fileiras ou poços que não serão manuseados de imediato. Abra a embalagem que está presente o pente, evitando o contato com as pontas do mesmo, utilizando as 12 pontas ou se necessário cortar o cartão se for manusear menor quantidade de amostras presente no pente. Em seguida, insira o pente no poço da fila A e deslize para os poços seguintes de B a F em um período de tempo cronometrado em cada poço, sendo estes de 5 minutos a 2 minutos dependendo do poço e posteriormente deixando para secar por 5 minutos antes de visualizar o resultado. Vale ressaltar que todas as vezes que foi necessário transitar entre as linhas A a F deve-se retirar o excesso de líquido dos dentes do pente em papel toalha em cada linha retirada e movimentá-lo de cima para baixo de 2 a 3 vezes dentro da placa em intervalo de tempo

correspondente a fim de alcançar uma melhor mistura e proporcionar melhor resultado, tendo cuidado para não ocorrer contaminação. Após todo o processo, utilize a Calibrated CombScale para a visualização dos resultados de acordo com a tonalidade do cinza- purpura, sendo o primeiro ponto, a referência positiva com um cinza-púrpura mais destacado e em baixo a marca de teste que apresentara a mesma cor na presença de anticorpos IGG, comparando a cor de ambos, se apresentar uma cor acinzentada mais forte é uma amostra reagente e um cinza mais fraco também pode indicar um reagente inicial. A metodologia descrita segue toda a orientação do fabricante.

Foto 1 : Teste ImmunoComb durante a realização das análises.



Fonte: Própria do autor.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados oriundos do banco de dados da Diretoria de vigilância ambiental (DIVAL) foram compilados em planilhas de excel. Estas informações contidas nesta planilha agrupam dados laboratoriais (mês, regiões administrativas e resultados dos diagnósticos sorológicos).

Foram coletados de maneira coletiva 24 amostras do mês de janeiro, fevereiro e março, das seguintes regiões administrativas: Asa Norte, Asa sul, Cruzeiro, Jardim Botânico, Lago Norte, Lago Sul, Paranoá, Samambaia, São Sebastião, Sol nascente e sobradinho. Os dados do mês de março, abril, maio e junho foram coletados das em: Asa Norte, Ceilândia, Jardim Botânico, Lago Norte, Lago Oeste, Noroeste, Octogonal, Paranoá, Planaltina, Recanto das Emas, São Sebastião e Sobradinho. Já no mês de agosto e setembro foram incluídas: Brazlândia, Fercal, Lago Norte, Park Way, Planaltina, Riacho Fundo, Samambaia, São Sebastião e Sobradinho e, por fim os meses de novembro e dezembro, que incluíram as regiões administrativas da: Asa Norte, Gama, Guará, Jardim Botânico, Lago Norte, Paranoá, São Sebastião e Sobradinho.

Os dados foram compilados por meio de dupla digitação por pessoas diferentes com intuito de minimizar erros.

ASPECTO ÉTICO

O projeto foi submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa atendendo à Resolução nº 466/12 e a Resolução n. 510/16 e ao Conselho de Ética na Utilização de Animais segundo Lei nº 11.794/08 e resolução normativa, de 09 de julho de 2010. Número do Parecer: 3.749.758.

V. RESULTADOS ESPERADOS

Identificar presença de anticorpos IgG anti-leptospira em soro de cães oriundos de áreas com histórico de transmissão de leptospirose humana.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre todas as regiões administrativas de Brasília,DF foram analisadas amostras aleatórias de 27 Regiões Administrativas do DF, de maneira aleatória (Quadro 1). Sendo coletadas 1 amostra de Arniqueira, 5 da Asa Norte, 2 da Asa Sul, 3 de Brazlândia, 1 de Ceilândia, 1 do Cruzeiro, 4 das fercal, 1 do Gama, 1 do Guar´a, 1 do Itapoã, 8 do Jardim Botânico, 14 do Lago Norte, 1 do lago oeste, 6 do Lago Sul, 1 do Noroeste, 1 do Octogonal, 18 do Parano´a, 3 do Park Way, 3 de Planaltina, 1 do Recanto das Emas, 1 do Riacho Fundo, 3 de Samambaia, 5 de Sˆao Sebastiˆao, 32 em Sobradinho, 1 no Sol Nascente, 1 no Sudoeste e 1 em Taguatinga, totalizando 120. As amostras biol´ogicas de soro foram coletadas pela DIVAL, fruto das a¸oes de inq´eritos sorol´ogicos para o diagn´ostico da leishmaniose visceral em cˆoes. Portanto era de conhecimento que a quantidade de amostras a serem selecionadas aleatoriamente seriam maiores nas ´reas em que foram realizadas mais a¸oes contra leishmaniose no territ´orio.

Quadro 1: Regiões administrativas em que foram analisadas as amostras de soro.

Região Administrativa	Amostras
ARNIQUEIRAS	1
ASA NORTE	5
ASA SUL	2
BRAZLˆANDIA	3
CEILˆANDIA	1
CRUZEIRO	1
FERCAL	4
GAMA	1
GUAR´A	1
ITAPOˆA	1
JARDIM BOTˆANICO	8
LAGO NORTE	14

LAGO OESTE	1
LAGO SUL	6
NOROESTE	1
OCTOGONAL	1
PARANOÁ	18
PARK WAY	3
PLANALTINA	3
RECANTO DAS EMAS	1
RIACHO FUNDO	1
SAMAMBAIA	3
SÃO SEBASTIÃO	5
SOBRADINHO	32
SOL NASCENTE	1
SUDOESTE	1
TAGUATINGA	1
Total	120

Fonte: Própria do autor.

O registro das Regiões Administrativas que obtiveram resultado reagente para leptospirose estão descritas no quadro 2, obtendo-se um total de 26 reagentes.

esse teste não é capaz de identificar o sorotipo de cada leptospira, sendo o teste ImmunoComb apropriado para verificar um acréscimo de anticorpos por conta da infecção dos sorovares *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa* e *L. pomona*. (BIOGAL GALED LABORATORIES, 2018; KARP, 2005).

Quadro 2: Regiões administrativas que testaram animais reagentes para leptospirose.

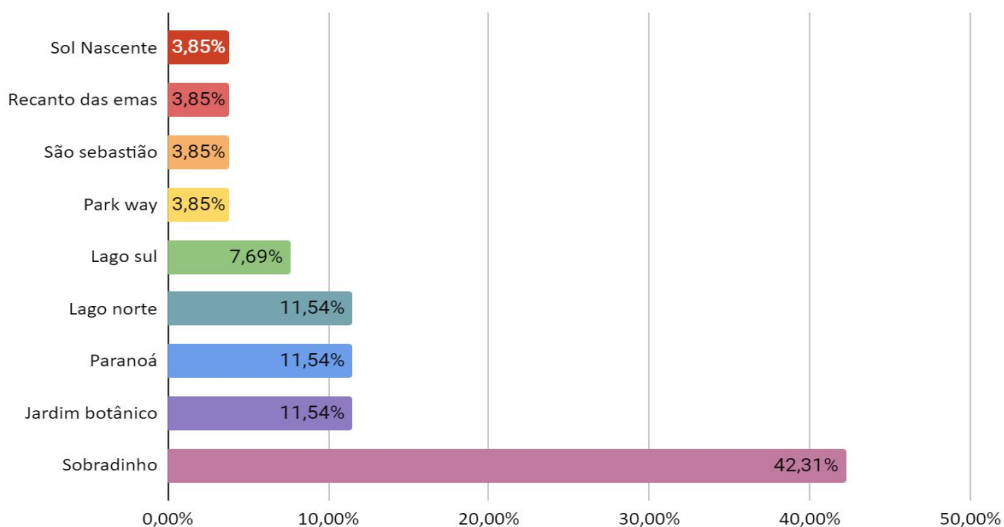
Regiões Administrativas	Número
-------------------------	--------

Sol Nascente	1
Recanto das Emas	1
São sebastião	1
Park way	1
Lago sul	2
Lago norte	3
Paranoá	3
Jardim botânico	3
Sobradinho	11
Total	26

Fonte: Própria do autor.

A porcentagem de positividade de amostras a leptospirose estão representadas abaixo na figura 1, e a Região Administrativa de Sobradinho apresentou maior número de amostras reagentes, seguido por Lago Norte, Paranoá, Jardim botânico e Lago Sul, e em menor porcentagem Sol Nascente, Recanto das Emas, São Sebastião e Park Way.

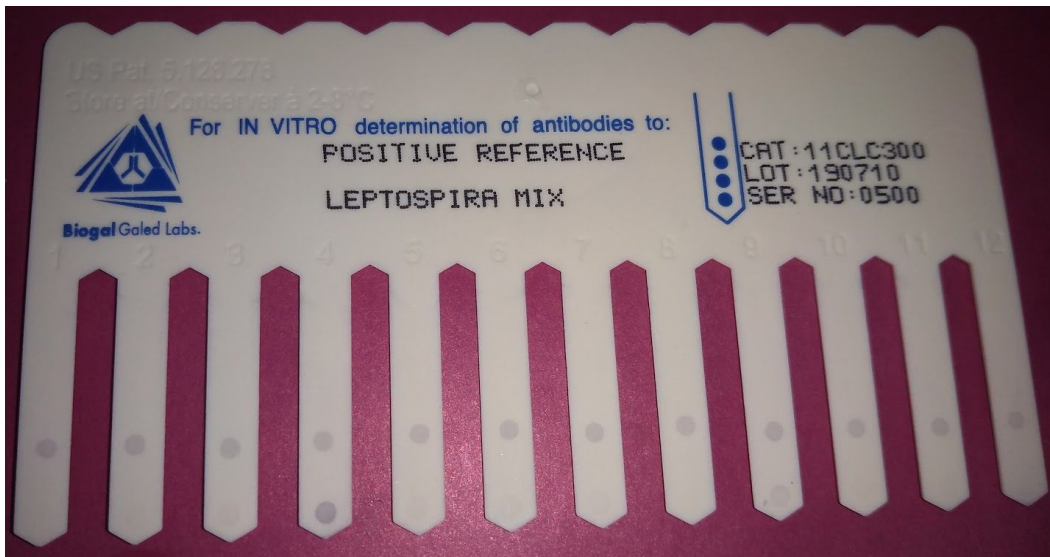
Figura 1: Porcentagem de positividade de animais reagentes distribuídos por Regiões Administrativas do DF.



Fonte: Própria do autor.

E na foto 2, está presente um pente, que apresenta resultados reagentes a doença, estando em tons de cinza mais escuro, no pente 4, representando um animal com titulação maior e um cinza mais fraco no pente 9, indicando uma titulação mais baixa de anticorpo, (BIOGAL GALED LABORATORIES, 2018)

Foto 2: Pente do teste ImmunoComb com amostras reagentes e não reagentes.



Fonte: Própria do autor.

Evidenciando também, que a leptospirose é uma enfermidade que acontece todo ano e que as infecções caninas são vistas sobretudo por cães que se aventuram a caçar animais selvagens, ou cães que entram em lugares com florestas. Além disso, a água estagnada é o ambiente natural de *Leptospira*, tendo a capacidade de ficar meses ou até um ano em solos mais úmidos, em água paradas com pH neutro e sem radiação solar, sendo resistente ao frio e congelamento. Sendo assim, em algumas regiões administrativas que tiveram animais reagentes há unidades de conservação, reservas ecológicas, parques ambientais, córregos como o Lago Sul, Paranoá, Lago Norte, Park Way, São Sebastião, Recanto das Emas, Sobradinho. E entre outras regiões em que há a presença de animais silvestres portadores ou contém água parada, de modo que, a infecção canina acontece por meio do contato direto com a urina contaminada, placenta e rotas venéreas. Também pode ser infectado indiretamente por meio do contato com água, vegetação, solo ou alimentos contaminados. sendo semelhante com a via de contaminação humana que ocorre por meio das via direta e indiretas com a urina de animais doentes (BIOGAL GALED LABORATORIES, 2018;BRASIL,

2009; BRASILa, 2020; BRASILb, 2020; BRASILc, 2020; BRASILd, 2020; BRASILE, 2020; BRASILf, 2020; BRASILg, 2020; MEGID,2016).

Neste estudo há limitações referentes ao histórico dos animais, por exemplo, não se tem informação de como os animais reagentes foram expostos ao microrganismo, o quadro clínico, histórico de vacinação e em qual condição o mesmo se encontrava, podendo ser animais domiciliados ou semi-domiciliados. E não foi observado a prevalência da circulação do anticorpos anti-leptospira em cães somente a positividade.

VII. CONCLUSÃO

Na pesquisa não se tem confirmação se estes animais infectados transmitem a bactéria aos seus tutores ou a outros animais, entretanto se sabe que em casos de leptospirose humana, o cão é um dos reservatórios de grande importância na propagação e manutenção da circulação da bactéria no meio urbano ao seres humanos, em virtude do contato íntimo entre estas espécies, fomentando assim na transmissão da leptospirose (CASTRO et al, 2010;BRASIL, 2009). Concluiu-se que há circulação de anticorpos IgG anti-leptospira em cães nas áreas de transmissão humana da doença. E o teste ImmunoComb pode ser considerado uma alternativa na triagem destes inquéritos sorológicos, tendo em vista que é um teste rápido e pouco trabalhoso.

VIII.CRONOGRAMA

Atividade	Data Início	Data Fim
Submeter o estudo ao Conselho de Ética (humano e animal)	Ago/2018	Out/2018

Solicitar informações a DIVAL para realizar o cálculo amostral	Out/2018	Out/2019
Processamento das amostras	Outubro/2020	Outubro/2020
Análise e interpretação dos dados	Outubro/2020	Outubro /2020
Redação do relatório parcial	Outubro/2020	Outubro/2020
Redação do relatório final	Outubro/2020	Outubro /2020
Redação do artigo científico	Outubro/2020	Outubro/2020

IX. PLANO DE TRABALHO

Fazer a testagem das amostras coletadas pela DIVAL, alimentar e organizar o banco de dados em planilhas de excel; redigir os relatórios parcial e final, redigir o artigo.

X. REFERÊNCIAS

Alves, Lorrane Barbosa; Medeiros, Rafael Brugnolli; Silva, Charlei Aparecido; Berezuk, André Geraldo. **A relação entre leptospirose, precipitação e ação pública no estado do Mato Grosso do Sul**. Revista Eletrônica da Associação dos Geógrafos Brasileiros, V.1, nº 28, 2018. ISSN 1808-2653. Disponível em: <<http://seer.ufms.br/index.php/RevAGB/article/download/6698/5135> > Acesso em: 14 abr. 2019.

ARAUJO, Manoel Francisco Martins. **LEPTOSPIROSE E TRABALHO**. Florianópolis, SC, Maio de 2000. Disponível em:<

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/104999/Leptospirose%20e%20trabalho.pdf?sequencia=1>>.

BATISTA, Carolina de Sousa Américo; AZEVEDO, Sérgio Santos de; ALVES, Clebert José; VASCONCELLOS, Silvio Arruda; MORAIS, Zenaide Maria de; CLEMENTINO, Inácio José; LIMA, Fabiano de Silva; NETO, José Othon de Araújo. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, 2014.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle de roedores**. Brasília: Ministério da saúde, Fundação Nacional de saúde, 2002. Disponível em: Acesso em: 14 abr. 2019.

BRASIL. **GEOGRAFIA**. Governo do Distrito Federal. Disponível em: <<http://www.df.gov.br/333/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILa. **CONHEÇA A RA V**. Administração Regional de Sobradinho. Disponível em: <<http://www.sobradinho.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILb. **CONHEÇA A RA**. Administração Regional do Lago Sul. Disponível em:<<http://www.lagosul.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILc. **CONHEÇA A RA**. Administração Regional do Paranoá. Disponível em:<<http://www.paranoa.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILd. **CONHEÇA A RA**. Administração Regional do Lago Norte. Disponível em:<<http://www.lagonorte.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILE. **CONHEÇA A RA**. Administração Regional do Park Way. Disponível em:<<http://www.parkway.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILf. **CONHEÇA A RA**. Administração Regional do Recanto das Emas. Disponível em:<<http://www.recanto.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASILg. **CONHEÇA A RA**. Administração Regional de São Sebastião. Disponível em:<<http://www.saosebastiao.df.gov.br/category/sobre-a-ra/conheca-a-ra/>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. ed 7. Brasília: Ministério da saúde, 2009. Disponível em: <<http://www.ammabarbacena.com.br/files/a7341de89b43294954a4ebdbd75be42d.pdf>>. Acesso em: 1 novembro 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Leptospirose: Diagnóstico e manejo clínico**. 1ª ed. Brasília, DF. 2014. Disponível em: <portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/02/Miolo-manual-Leptospirose-17-9-2014>. Acesso em: 1 maio.2019.

BRASIL. Secretaria Executiva. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento. **Plano Nacional de Saúde-PNS: 2012- 2015**. Ministério da Saúde. 1ª ed. Brasília, 2011.

BIOGAL GALED LABORATORIES (org.). **ImmunoComb: CANINE LEPTOSPIRA ANTIBODY TEST KIT**. 14 Feb 2018.

CASTRO, Jacqueline Ribeiro de; SALABERRY, Sandra Renata Sampaio; NETO, Antônio Bertolino Cardoso; ÁVILA, Diego Fernando de; SOUZA, Mariana Assunção de; RIBEIRO, Anna Monteiro Correia Lima. Leptospirose canina - Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V.4, N.31, Ed 136, Art.919,2010.

CHINTANA, Chirathaworn; INWATTANA, Rajada; POOVORAWAN, Yong; SUWANCHAROEN, Duangjai. **Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and soroprevalence**. Thailand: The Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014.

FERREIRA, Mateus de Paula; GARCIA, Mariana Silva Duarte. Saneamento básico: meio ambiente e dignidade humana. **Dignidade Re-Vista**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 12, 2017. ISSN 2525-698X. Disponível em: . Acesso em: 03 maio 2019.

FILHO, João; NAZÁRIO, Nazzaré; FREITAS, Paulo; PINTO, Araújo; SCHLINDWEIN, Aline. **Temporal analysis of the relationship between leptospirosis, rainfall levels and seasonality**, Santa Catarina, Brazil, 2005-2015. Santa Catarina (SC), 2015. Disponível em: <<http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=1f93f85a-db96-4ba8-ab37-845e17f2e950%40sdc-v-sessmgr02>>.

FOUTS, Derrick.E; MATTHIAS, Michael A; ADHIKARLA, Haritha et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. United States, p. 3-57, 10 feb. 2016. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0004403&type=printable> >. Acesso em: 15 abr. 2019.

GREENE, Craig. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsmb&AN=edsmb.000006987&lang=pt-br&site=eds-live>>. Acesso em: 3 maio. 2019.

HAAKE, David A; LEVETT, Paul N. **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin: Springer, 2015

HAGIWARA, M. K; et al. Leptospirose. In: JERICÓ, M. M; et al. **Tratado de Medicina interna de cães e gatos**. ed 1. Rio de Janeiro: Roca, 2015

KARP, G. **Biologia celular e molecular**. 3ª. ed. Barueri, SP: Editora Manole Ltda, 2005.

MARTINS, Milton de Arruda; CARRILHO, Flair José, ALVES, Venâncio Avancini Ferreira, CASTILHO, Euclides Ayres de; GUIDO, Giovanni. **CLÍNICA MÉDICA**. 2. ed. Manole, 2015. 868 p. v. 7. ISBN 9788520437452

MEGID, Jane; RIBEIRO, Márcio Garcia; PAES, Antonio Carlos. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro, RJ: GUANABARA KOOGAN LTDA, 2016.

MIRAGLIA, Fabiana. **Characterization of leptospira serovar Pomona isolated from swine in Brazil**. São Paulo (SP), 2015. Disponível em:<

<http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=10&sid=bd5c5eac-f880-488dbae0-7e643ad9cbe%40sdc-v-sessmgr03>>. Acesso em: 3 maio 2019

SANTOS, Ivanildo de Oliveira Correia. **Caracterização ecoepidemiológica da Leptospirose Humana no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 64p. Tese de Doutorado.

SIMÕES, Senna, Luciana;. **Leptospirose - Revisão**. São Paulo (SP), 2016.

SILVA, Alice. **LEPTOSPIROSE NO DISTRITO FEDERAL: Perfil epidemiológico e caracterização dos prováveis locais de infecção dos casos humanos autóctones confirmados em 2011 e 2012**. Brasília, DF, 2013.

SOARES, José Luiz Moller Flôres; ROSA, Daniela Dornelles; LEITE, Veronia Ruttkay da Silva, PASQUALOTTO, Alessandro Comarú. **Métodos diagnósticos: Consulta rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZAHORCAK, Dayane Rafaela Ferreira Vaz; DE CHRISTO, Daniel. Relato de caso de paciente com provável quadro de leptospirose: Difícil diagnóstico. **Cadernos da escola de Saúde**, v. 1, n. 5, 2011.