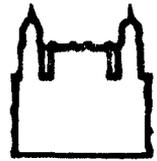




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

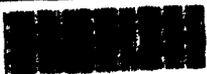
Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS
PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE
NA FASE AGUDA**

BALBINO LINO DOS SANTOS

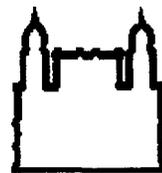
**Salvador - Bahia - Brasil
2006**





UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE NA FASE AGUDA**

MESTRANDO: BALBINO LINO DOS SANTOS

ORIENTADOR: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

CO-ORIENTADOR: ALBERT ICKSANG KO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia (UFBA/FIOCRUZ) como requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil

2006



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Santos, Balbino Lino dos
S237a Avaliação de testes sorológicos para o diagnóstico da leptospirose na
fase aguda. [manuscrito]/ Balbino Lino dos santos. - 2006.
76f. : ils. : 30 cm.

Datilografado (fotocópia)
Dissertação (mestrado) – Universidade federal da Bahia. Faculdade de
Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.
Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis. Laboratório de
Patologia e Biologia Molecular.

1. Leptospirose. 2. Diagnóstico. 3. Sorologia. I. Título.

CDU 616.986:616-071

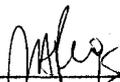
PHL
MTU 2668
003377

LILDBI

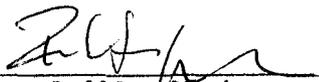
616.986-071
5237a

BALBINO LINO DOS SANTOS

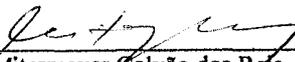
**FOLHA DE APROVAÇÃO
COMISSÃO EXAMINADORA**



Dr. Marco Antônio Vasconcelos Rêgo
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Professor Associado
UFBA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido estar na hora certa, com pessoas certas e poder aproveitar a oportunidade que Ele estava me oferecendo.

Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pesquisador titular e diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ-BA, e ao Dr. Albert Icksang Ko, pesquisador visitante do CPqGM, por terem creditado confiança ao meu trabalho e pela orientação prestada nas etapas de desenvolvimento deste projeto.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Patologia, pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

Ao Dr. Alan McBride, pesquisador visitante do CPqGM, pela valiosa colaboração e atenção dispensada no desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Dr. Marcos Antônio Medeiros, biotecnologista do Núcleo de Biologia Molecular / Vice-diretor de desenvolvimento tecnológico da Biomanguinhos, pela atenção dispensada no desenvolvimento deste projeto.

Ao colega Adriano Queiroz, mestrando do CPqGM, pela orientação prestada no desenvolvimento da técnica de microaglutinação (MAT) e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas Everton Fagonde da Silva, Flávia McBride, João Gabriel, Josilene Lima, Andréia Santos Carvalho, Déborah Fraga, Cleiton Santos Silva, pelo apoio técnico na realização dos testes e, acima de tudo, pela amizade.

Ao colega Renato Reis pelo apoio no desenvolvimento de gráficos e pela amizade.

À Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia - HEMOBA, pela colaboração na doação de soros de doadores sadios contra doenças infecciosas utilizados neste trabalho.

Aos pacientes internados no Hospital Couto Maia, categorizados como casos, que consentiram em participar desta pesquisa.

A Biomanguinhos / FIOCRUZ, pelo fornecimento do “kit” EIE-IgM-Leptospirose-Biomanguinhos utilizado neste projeto.

Às fabricantes Panbio, Zephyr e Biomeriêux, pelo fornecimento dos kits: ELISA IgM Lepto Panbio; Dip-S-Tick Panbio; Lateral Flow da Zephyr e Dri-Dot da Biomeriêux.

A todos os que fazem o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular – LPBM/CPqGM, pela convivência e amizade firmada.

A Ana Maria Fiscina e demais integrantes da biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ, pela dedicação e apoio prestado na padronização da versão final desta dissertação, e principalmente pela amizade

À coordenação de pós-graduação em Patologia do CPqGM – FIOCRUZ: Dona Rosália, Rosângela e Taíse, pela atenção e apoio prestado durante o curso de mestrado.

Aos colegas de Mestrado, pela convivência e amizade firmada através dos momentos que percorremos juntos.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pelo apoio em disponibilizar o ambiente e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro prestado durante a realização deste trabalho.

A você, que provavelmente eu possa ter esquecido, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	06
LISTA DE QUADROS	07
LISTA DE FIGURAS	08
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEPTOSPIROSE HUMANA	11
1.2 ASPECTOS DA BIOLOGIA E ASPECTOS TAXONÓMICOS	13
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS	17
1.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	19
1.5 PROTEÍNAS DE MEMBRANA	22
1.6 DIAGNÓSTICO	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. DESENHO DO ESTUDO	28
4.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO	28
4.2.1 Caracterização da população	29
4.3 DEFINIÇÃO SOROLÓGICA DE CASOS	30
4.3.1 Teste de microaglutinação (MAT)	30
4.3.2 Ensaio imunoenzimático (EIE) IgM para leptospirose da Biomanguinhos	30
4.3.3 Ensaio imunoenzimático (EIE) IgM para leptospirose da Panbio	31
4.3.4 Teste qualitativo para detecção de anticorpos classe IgM anti-leptospira – Dipstick test IgM da Panbio	31
4.3.5 Teste rápido para detecção de anticorpos da classe IgM anti-leptospira – Leptocheck Lateral flow test IgM da Zephyr	31

4.3.6 Teste rápido de aglutinação em Látex – Lepto Tek Dri Dot da Biomeriêux	32
4.4 PROCESSAMENTO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS	32
4.5 ENSAIOS SOROLÓGICOS	32
4.6 PRINCÍPIOS DOS ENSAIOS SOROLÓGICOS	33
4.6.1 Elisa IgM anti-leptospira da Biomanguinhos	33
4.6.2 Elisa IgM anti-leptospira da Panbio	33
4.6.3 Dipstick test IgM da Panbio	34
4.6.4 Leptocheck Lateral flow test IgM da Zephyr	34
4.6.5 Lepto tek Dri Dot da Biomeriêux	35
4.7 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS PARA ANÁLISE DOS DADOS.....	36
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	62
8 LIMITAÇÕES	63
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
10 ANEXOS	72
10.1 MODELO DE QUESTIONÁRIO SOBRE DADOS PESSOAIS DO PACIENTE	72
10.2 MODELO DE QUESTIONÁRIO SOBRE APRESENTAÇÃO CLÍNICA	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sorogrupos e alguns sorovares da espécie <i>L. interrogans</i> sensu lato.	15
Tabela 2 Genomoespécies de <i>Leptospira</i> e distribuição de sorogrupos.	16
Tabela 3 Número de soros avaliados pelos ensaios sorológicos.	39
Tabela 4 Dados sobre sexo, idade, sintomas e sinais, achados laboratoriais e hospitalização dos casos confirmados para leptospirose	41
Tabela 5 Número de reações positivas observadas em cinco ensaios para detecção de anticorpos contra leptospira, estratificadas por grupo de estudo	42
Tabela 6 Sensibilidade e especificidade de cinco ensaios para detecção de anticorpos contra leptospira, calculadas usando tabela de contingência 2x2.	45
Tabela 7 Concordância dos ensaios sorológicos com MAT na fase aguda da doença.	54
Tabela 8 Concordância entre ensaios sorológicos na detecção de anticorpos contra <i>Leptospira</i>	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Validade de um teste diagnóstico.	36
Quadro 2 Determinação da concordância entre testes diagnósticos.	37
Quadro 3 Escala de concordância do <i>Kappa</i>	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fases que caracterizam a Leptospirose e aspectos relevantes dos estágios da doença.	21
Figura 2 Testes rápidos avaliados	35
Figura 3 Sensibilidade dos ensaios sorológicos para o diagnóstico de Leptospirose aguda durante a primeira semana da doença.	46
Figura 4 Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Biomanguinhos na placa 1.	47
Figura 5 Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Biomanguinhos na placa 2.	48
Figura 6 Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Biomanguinhos na placa 3.	49
Figura 7 Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Panbio na placa 1.	50
Figura 8 Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Panbio na placa 2.	51
Figura 9 Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Panbio na placa 3.	52
Figura 10 Scatter gráfico comparando a mensuração de anticorpos IgM anti-leptospira pelo ELISA de captura IgM da Panbio (EIE PB) e pelo ELISA IgM da Biomanguinhos (EIE BM) ..	53
Figura 11 Aumento gradativo da sensibilidade no decorrer dos dias de sintomas	60

RESUMO

AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE NA FASE AGUDA. BALBINO LINO DOS SANTOS. A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial. A leptospirose grave pode estar associada com alta letalidade, caso não seja tratada adequadamente. O diagnóstico da doença é geralmente realizado por métodos sorológicos, e o teste de microaglutinação (MAT) é o ensaio sorológico preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como teste padrão ouro no diagnóstico da leptospirose. Entretanto, este teste consome tempo e requer equipamentos caros e treinamento especializado. Um grande número de testes rápidos para triagem de casos de leptospirose tem sido desenvolvido e avaliado. Avaliar o desempenho de cinco testes para o diagnóstico da leptospirose aguda: um ELISA IgM da Biomanguinhos (EIE BM); um ELISA IgM da Panbio (EIE PB); um lateral flow da Zephyr (LF); um dri-dot da Biomeriêux (Dot) e um dip-s-tick da Panbio (DPS). O desempenho de cada teste foi comparado com o corrente teste padrão ouro. Um painel de 188 soros de 138 casos confirmados para leptospirose e um painel de 80 soros de indivíduos sadios foram testados pelos ensaios. Dentro do painel de soros dos casos de leptospirose, 138 soros representavam a fase aguda e 50 soros a fase convalescente. Dentre os soros de fase aguda, 72 tinham menos que sete dias de sintomas e 66 tinham sete dias ou mais de sintomas. As amostras dos casos pertenciam a pacientes com suspeita de leptospirose, admitidos em hospital de referência em Salvador, no período de janeiro de 2000 à junho de 2005. Os soros de indivíduos sadios foram fornecidos pelo hemocentro de Salvador. Os ensaios foram realizados seguindo o protocolo elaborado pelo fabricante do teste. A sensibilidade e especificidade de cada ensaio foram calculados usando tabela de contingência dois por dois, com 95% de intervalo de confiança, usando o software Epi Info versão 6.04. A concordância entre os ensaios foi determinada pelo índice kappa (k). Considerando os soros de fase aguda randomizados, sensibilidade obtida para detecção de casos de Leptospirose foi de 84,2 para o LF; 80% para o Dot; 72,3% no DPS; 79,2% no EIE BM; 87,5% no EIE PB e 68,8% no MAT. Nos soros de fase aguda precoce (< 7 dias de sintomas), a sensibilidade foi de 71,4% para o LF; 50% para o Dot; 32,9% para o DPS; 54,2% para o EIE BM; 66,7% para o EIE PB e 45,8% para o MAT. A especificidade encontrada foi de 95% para os testes LF, Dot e EIE BM; 100% para o DPS e MAT; e 87,5% para o EIE PB. Todos os testes apresentaram boa concordância quando comparados com o MAT na fase aguda randomizada, entretanto o DPS foi o único teste que mostrou pobre concordância na fase aguda precoce. Nas amostras analisadas, o LF mostrou melhor sensibilidade como ensaio de triagem na fase aguda precoce da doença, e foi o único teste que apresentou a melhor concordância quando comparado ao teste padrão ouro nesta mesma fase. Os testes avaliados, com exceção do EIE PB, apresentaram boa especificidade (>90%). É importante ressaltar que os resultados apresentados neste estudo são válidos apenas para amostras provenientes da região de Salvador-Ba, destacando assim, a importância de se avaliar os testes no cenário onde eles serão utilizados.

PALAVRAS-CHAVE Leptospirose, Diagnóstico, Sorologia.

ABSTRACT

EVALUATION OF SEROLOGY TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF ACUTE PHASE LEPTOSPIROSIS. BALBINO LINO DOS SANTOS. Leptospirosis is a zoonosis with a worldwide distribution. Severe leptospirosis is associated with a high mortality when not treated. Diagnosis of the disease is generally through serological methods and the microagglutination test (MAT) is the serology assay recognised by the World Health Organisation (WHO) as the gold standard for diagnosis of leptospirosis. However, this test is time consuming and requires expensive equipment and specialist training. A large number of rapid tests for screening leptospirosis cases have been developed and evaluated. To evaluate the performance of five tests for the diagnosis of acute phase leptospirosis: the Bio-Manguinhos EIE-IgM-Leptospirase ELISA (EIE BM); the Panbio IgM ELISA (EIE PB); the Zephyr lateral flow (LF); the Biomeriêux Dri-Dot (Dot) and the Panbio Dip-S-tick dot ELISA (DPS). The performance of each test was compared to the gold standard MAT. A panel of 189 sera from 139 confirmed cases of leptospirosis and a panel of 80 sera from healthy individuals were tested with each of the assays. In the sera from leptospirosis cases there were 139 acute phase sera and 50 sera from the convalescent phase. Within the acute phase sera group 72 had less than 7 days of symptoms and 66 had 7 or more days of symptoms. The samples relating to leptospirosis cases came from patients admitted to the reference hospital in Salvador during the period January 2000 to June 2005. The sera from healthy individuals were supplied by the Salvador Blood bank. The sensitivity and specificity for each assay were calculated using 2 x 2 contingency tables, with 95% confidence intervals using Epi Info software version 6.04. the concordance between tests was determined using the kappa index (*k*). Based on randomised acute phase sera, sensitivity obtained for the detection of leptospirosis cases was 84.2% for the LF; 80% for the Dot; 72.3% for the DPS; 79.2% for the EIE BM; 87.5% for the EIE PB and 68.8% by the MAT. In early acute phase sera (<7 days of symptoms), the sensitivity was 71.4% for the LF; 50% for the Dot; 32.9% for the DPS; 54.2% for the EIE BM; 66.7% for the EIE PB and 45.8% for the MAT. The specificity was 95% for the LF, Dot and EIE BM tests; 100% for the DPS and the MAT; and 87.5% for the EIE PB. All of the tests presented good concordance when compared to the MAT with randomized acute phase sera however, the DPS was the only test that demonstrated poor concordance in early acute phase sera. In the samples analyzed the LF demonstrated the best sensitivity of an assay for screening in the early acute phase of the illness and was the only test with a good concordance with the gold standard during the same phase. The tests evaluated, with the exception of the EIE PB, presented good specificity (>90%). It is important to emphasize that the results presented in this study are valid only for samples for the region of Salvador, Bahia, stressing the importance of evaluating tests in the scenario where they will be utilized.

KEYWORDS Leptospirosis; Diagnosis; Sorology.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEPTOSPIROSE HUMANA

A leptospirose é uma antropozoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que apresenta uma ampla distribuição mundial, sendo atualmente reconhecida como uma doença infecciosa emergente (WHO 1999; VIJAYACHARI *et al.* 2002). Ela comumente ocorre em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em zonas rurais, embora atualmente já tenha sido relatado um crescente aumento no número de casos em áreas urbanas. A *Leptospira interrogans* “senso lato” é a espécie patogênica que tem afetado o homem em todos os continentes. O espectro da leptospirose no homem é extremamente amplo, variando desde uma infecção subclínica até uma síndrome grave com envolvimento de vários órgãos e alta letalidade (FARR 1995; KO *et al.* 1999; LEVETT 2001; NASCIMENTO *et al.* 2004; NATARAJASEENIVASAN *et al.* 2004).

A transmissão para o homem pode ocorrer através do contato direto ou indireto com urina de animais infectados. Os animais, incluindo o homem, são classificados dentro de dois grupos de hospedeiros: os hospedeiros de manutenção, nos quais a infecção é endêmica e é usualmente transmitida de animal para animal por contato direto com a urina contaminada. Neste grupo, a infecção é usualmente adquirida em idade precoce, e os animais mantêm naturalmente uma infecção crônica nos túbulos renais. O outro grupo compreende os hospedeiros acidentais ou incidentais (tal como o homem), que são infectados pelo contato indireto com os hospedeiros de manutenção. Os hospedeiros crônicos podem ser animais selvagens ou animais domésticos, especialmente os roedores e pequenos marsupiais, gados, porcos, ovelhas e cães. A extensão com que a infecção é transmitida depende de muitos fatores, incluindo o clima, a densidade populacional e o grau de contato entre os grupos de hospedeiros (LEVETT 2001).

A gravidade da doença varia principalmente com o sorovar de *Leptospira* infectante. As mais importantes associações conhecidas no mundo são os sorovares Hardjo com gados; Pomona com porcos, gados e roedores; e os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Bataviae, Autumnalis, Australis e Javanica com ratos e pequenos roedores. A importância de determinada espécie animal como reservatório varia de acordo com o padrão epidemiológico de transmissão,

no entanto, o rato é considerado globalmente o reservatório mais importante (FAINE 1999; LEVETT 2001).

Os períodos de chuva associados às enchentes e condições precárias de saneamento contribuem significativamente para surgimento de casos de leptospirose em regiões endêmicas. A infecção pode estar relacionada às exposições ocupacionais, recreacionais ou mesmo cotidianas (FAINE 1999; LEVETT 2001; MAJED *et al.* 2005). Em países desenvolvidos, embora considerada uma doença rara, a leptospirose está muito associada às atividades recreacionais, como a prática de esportes aquáticos, incluindo natação, canoagem entre outros. Em 1998 na região de Springfield – Illinois, foi relatada a ocorrência de casos de leptospirose entre competidores de *triathlon*, onde cerca de 5% dos participantes foram laboratorialmente confirmados para a doença (HAAKE *et al.* 2002; MORGAN *et al.* 2002). Entretanto, nas regiões onde a doença é comum, as atividades ocupacionais, sobretudo aquelas associadas à pobreza, são consideradas um significativo fator de risco para o homem (KO *et al.* 1999; MCBRIDE *et al.* 2005). O contato direto com animais infectados é responsável pela maioria das infecções em profissionais da área veterinária e fazendeiros. Por outro lado, o contato indireto tem sido relacionado com a infecção de trabalhadores da área agrícola, pesqueira, da mineração, militares e aqueles envolvidos na manutenção de canais de esgotos (LEVETT 2001). Nos países em desenvolvimento, por exemplo, onde a ocorrência de epidemias da doença está muito relacionada a estações chuvosas e enchentes, têm sido relatadas fortes associações das atividades ocupacionais com a ocorrência de infecções, principalmente nas populações que moram em favelas, que somado às precárias condições de saneamento, têm criado um novo ambiente favorável à transmissão da leptospirose. Além disso, o crescente aumento demográfico, principalmente com a migração de pessoas do campo para as cidades, tem contribuído fortemente para o crescimento do número de favelas, fornecendo condições ótimas para a proliferação de roedores e conseqüente aumento do risco de exposição. Atividades cotidianas, como jardinagem e andar com os pés descalços também representam fatores de risco importantes para adquirir leptospirose (PLANK *et al.* 2000; LEVETT 2001; NATARAJASEENIVASAN *et al.* 2004).

Surtos da doença têm sido relatados em vários países no mundo, como Índia, Coréia, China, Nicarágua (TREVEJO *et al.* 1998; BHARADWAJ *et al.* 2002; VIJAYACHARI *et al.* 2004), e em importantes cidades brasileiras como Salvador, Rio de Janeiro, São Paulo, Belo

Horizonte e Florianópolis (KO *et al.* 1999; KUPEK *et al.* 2000; BARCELLOS *et al.* 2001; COSTA *et al.* 2001; DE FIGUEIREDO *et al.* 2001; ROMERO *et al.* 2003).

Cerca de um bilhão de pessoas no mundo residem em favelas urbanas (MCBRIDE *et al.* 2005), onde as precárias condições sanitárias fornecem um ambiente propício à proliferação de roedores, que são importantes reservatórios na transmissão da doença. Cerca de 10.000 casos de leptospirose são notificados por ano em todas as grandes metrópoles do mundo (KO *et al.* 1999). No Brasil, durante o período de 1985 a 1997, foram notificados cerca de 35.400 casos de leptospirose, com uma taxa de letalidade média igual a 12,5%. No ano de 1996, ocorreram duas grandes epidemias da doença, afetando os municípios do Rio de Janeiro com 1732 casos notificados e 51 óbitos, e a cidade de Salvador, que apresentou uma incidência de 12,5 casos por 100.000 habitantes (KO *et al.* 1999; TASSINARI *et al.* 2004; MCBRIDE *et al.* 2005).

O aumento do número de surtos de leptospirose no mundo, principalmente as grandes epidemias urbanas, que têm atingido importantes cidades da América Latina, é preocupante. Poucos trabalhos têm apresentado propostas preventivas que sejam capazes de diminuir o impacto da doença (TASSINARI *et al.* 2004).

1.2 ASPECTOS DA BIOLOGIA E ASPECTOS TAXONÔMICOS

A Leptospirose é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, que são as únicas espiroquetas patogênicas que podem viver livremente no ambiente fora dos animais. Morfologicamente, este gênero é composto por organismos helicoidais, usualmente medindo de 6 a 20µm de comprimento, e 0,1µm de diâmetro. Estas possuem ganchos em uma ou ambas as extremidades; dois filamentos axiais (flagelos periplásmicos) com inserções polares localizados no espaço periplásmico; e são visualizadas por microscopia de campo escuro. As leptospiras têm tipicamente uma estrutura de membrana dupla compartilhada com outras espiroquetas, onde a membrana plasmática e a parede celular de peptidoglicano estão intimamente associadas com uma membrana externa. O lipopolissacarídeo (LPS) das leptospiras é similar àquele das bactérias gram-negativas, porém é menor a atividade endotóxica. São organismos aeróbicos obrigatórios, que apresentam um ótimo crescimento em temperaturas que variam de 28 a 30° C, e em pH que varia entre 7,2 a 7,6. Produzem catalase e oxidase e seu crescimento ideal leva de 6 a 14 dias,

sendo variável em meio líquido. Ácidos graxos de cadeia longa são única fonte de carbono utilizada, e são metabolizados por beta-oxidação (LEVETT 2001).

A taxonomia das leptospiras evolui com implicações para o diagnóstico e epidemiologia. A classificação é feita com base fenotípica, que é clinicamente a mais usada, e genotípica. Na classificação fenotípica, as leptospiras são divididas em sorovares, sendo estes definidos de acordo com o teste que envolve absorção de aglutininas utilizando antígenos e anti-soros fornecidos pelos centros de referência da Organização Mundial de Saúde. Existem mais de 250 sorovares de leptospiras, sendo algumas delas saprófitas, pertencentes a espécie *L. biflexa*, que compreende as leptospiras não patogênicas para o homem e outros animais. Mais de 200 sorovares são de leptospiras patogênicas, pertencentes a espécie *L. interrogans*, que infectam o homem e outros mamíferos. Os sorogrupos e sorovares da *L. interrogans* são mostrados na **tabela 1**. Antigênicamente, estes sorovares estão agrupados em 24 sorogrupos. Embora os sorogrupos não tenham reputação taxonômica, eles são úteis na compreensão da epidemiologia (VINETZ 2001). A classificação genotípica divide as Leptospiras em 17 genomo-espécies baseadas na hibridização de DNA que mostra a heterogeneidade genética entre espécies (**tabela 2**). Assim, sorovares patogênicos e não patogênicos da classificação fenotípica podem ocorrer dentro de uma mesma espécie na classificação genotípica. A classificação por genotipagem é taxonomicamente correta e fornece um bom fundamento para uma nova classificação. No entanto, o modelo molecular é incompatível com o sistema de sorogrupos que têm sido normalmente usado por clínicos e epidemiologistas (LEVETT 2001; VINETZ 2001).

Tabela 1. Sorogrupos e alguns sorovares da espécie *L. interrogans* sensu lato. Adaptado de Levett (2001).

Sorogrupo	Sorovares
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panama	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Tabela 2. Genomoespécies de *Leptospira* e distribuição de sorogrupos. Adaptado de Levett (2001).

Espécies	Sorogrupos
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii</i>	Codice
<i>L. biflexa</i>	Semarang, Andamana
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi,
<i>L. weilii</i>	Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
<i>L. inadai</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
<i>L. parvac</i>	Turneria
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A leptospirose é uma zoonose que apresenta um amplo espectro de sintomas, variando desde uma forma discreta e /ou assintomática até a forma grave da doença, que envolve múltiplos órgãos e apresenta alta letalidade. Geralmente o período de incubação varia entre 5 a 14 dias. A doença apresenta normalmente duas fases, sendo a primeira septicêmica com leptospiremia, durando cerca de uma semana, e uma segunda fase imune com produção de anticorpos e leptospiúria (LEVETT 2001).

A leptospirose caracteriza-se por sintomas tais como febre, cefaléia, mialgia, calafrios, sufusão conjuntival e menos frequentemente por meningites, erupção cutânea, icterícia e insuficiência renal (FARR 1995). O curso subsequente da doença depende do sorovar infectante, do número de *Leptospiras* infectantes (inóculo), do estado de nutrição do paciente e da imediata atenção médica disponível. Cerca de 5% a 15% dos casos progredem com complicações graves, com uma razão de letalidade de 5% a 40% para os casos graves. Em humanos, a leptospirose grave é frequentemente causada pelos sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, embora outros sorovares também estejam envolvidos. O sorovar específico envolvido na infecção depende largamente da localização geográfica e da ecologia local dos hospedeiros de manutenção (LEVETT 2001). Já foi relatado que sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, que têm como seu hospedeiro portador o rato, são usualmente responsáveis por infecções na Europa, enquanto que no sudeste da Ásia, o sorovar Lai é o responsável predominante. A variabilidade das manifestações pode ser explicada em parte pela virulência intrínseca dos diferentes sorovares (FAINE 1999; VINETZ 2001; NASCIMENTO *et al.* 2004).

A maioria das infecções por leptospiras caracteriza-se por uma apresentação subclínica ou com um quadro clínico muito discreto, conhecido como Leptospirose anictérica, no qual são geralmente observados sinais e sintomas como cefaléia, mialgia, dor abdominal, náuseas e vômito, sufusão conjuntival e com menos frequência, a erupção na pele. Entretanto, a maioria dos casos apresenta uma doença febril de início súbito. No início da doença, os sintomas são muito semelhantes aos que ocorrem em muitas outras doenças agudas febris, incluindo influenza, dengue, hepatites e várias outras doenças agudas de origem viral. A forma anictérica da doença dura cerca de uma semana, e sua resolução coincide com o aparecimento de anticorpos. A taxa de letalidade é muito baixa na forma anictérica, entretanto, são relatados alguns casos em que a

letalidade atingiu índices altos, como na epidemia que ocorreu na China em 1965, onde cerca de 2,4% dos pacientes que apresentaram forma anictérica morreram de hemorragia pulmonar (HALOTA *et al.* 1992; WHO 1999; LEVETT 2001).

No quadro grave da doença, representado pela leptospirose icterica, o curso clínico é rapidamente progressivo. As complicações graves da leptospirose apresentam caráter multisistêmico, e estão associadas com a localização de leptospiros dentro dos tecidos durante a fase imune, que ocorre geralmente durante a 2ª semana da doença. Em 1886, foi descrita por Adolf Weil uma complicação grave da doença, conhecida como “Síndrome de Weil”. Esta forma é caracterizada por suas manifestações clássicas como febre, icterícia e insuficiência renal (FARR 1995; FAINE 1999; LEVETT 2001). A insuficiência renal na doença grave pode ocorrer dentro de três a quatro dias após início da doença, onde os pacientes freqüentemente apresentam um rápido aumento na creatinina e uréia sanguínea, que acompanha o aumento nos níveis de fosfato, ácido úrico e potássio no sangue. Cerca de 16% a 40% dos pacientes que apresentam insuficiência renal aguda (IRA), tem como causa comum a Leptospirose. A icterícia que ocorre na Leptospirose, não está associada com a necrose hepatocelular, mas ocorre devido hemólise e destruição de eritrócitos em áreas de hemorragia, e a função hepática retorna ao normal após recuperação. O aumento dos níveis de bilirrubina sérica com níveis normais das transaminases é altamente sugestivo de Leptospirose (FAINE 1999; VINETZ 2001).

Outro importante aspecto clínico da leptospirose é a síndrome de hemorragia pulmonar grave, que apesar de não ser muito comum, é causa importante de óbito em algumas regiões e independe da presença de icterícia, tendo sido reconhecida em todo o mundo como uma grave manifestação da doença e difundido problema de saúde pública (TREVEJO *et al.* 1998; MAROTTO *et al.* 1999; VIJAYACHARI *et al.* 2004; MCBRIDE *et al.* 2005; SEGURA *et al.* 2005). Na Nicarágua, uma epidemia que ocorreu entre outubro e novembro de 1995, cerca de 0,7% dos acometidos morreram de hemorragia pulmonar (TREVEJO *et al.* 1998). O envolvimento pulmonar tem sido previamente observado em outros países como China e Coréia, onde os casos foram associados à infecção pelo sorovar Lai do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Recentemente na Índia, casos de hemorragia pulmonar foram relatados em pacientes infectados com o sorovar Valbuzzi do sorogrupo Grippotyphosa (VIJAYACHARI *et al.* 2003). Os Sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Australis também têm sido relatados em casos de hemorragia

pulmonar na China, na Coréia e na Austrália (SIMPSON *et al.* 1998; VIJAYACHARI *et al.* 2003; VIJAYACHARI *et al.* 2004).

O envolvimento cardíaco com miocardite fatal foi primeiramente descrito em 1935. Atualmente, a taxa de letalidade por miocardite na leptospirose grave chega a 54%. Manifestações oculares como a sufusão conjuntival, também têm sido relatadas na leptospirose grave. Leptospiras podem penetrar no humor aquoso durante a fase septicêmica e podem persistir por vários meses, levando ao desenvolvimento de uveíte latente crônica recorrente (LEVETT 2001; VINETZ 2001).

A forma grave freqüentemente apresenta-se tarde no curso da doença e contribui para a alta taxa de letalidade que varia de 5% a 15%. Cerca de 5% a 10% de todos os pacientes com leptospirose possui a forma ictérica da doença (FAINE 1999; LEVETT 2001).

1.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A leptospirose apresenta basicamente duas fases clínicas (**figura 1**), sendo a primeira septicêmica, que dura cerca de uma semana, e em seguida a fase imune caracterizada pela produção de anticorpos sorogrupo específicos e excreção de leptospiras na urina (LEVETT 2001; HAAKE *et al.* 2002). A produção de complexos imunes além de ser importante no processo inflamatório, está também correlacionada com a gravidade da doença (LEVETT 2001).

A imunidade na leptospirose é predominantemente humoral, sendo fortemente restrita para sorovares homólogos, ou a sorovares fortemente relacionados a este antigenicamente. Na imunidade humoral, anticorpos específicos opsonizam as leptospiras para a fagocitose por macrófagos e neutrófilos. As leptospiras são digeridas nos vacúolos dos macrófagos, e a fagocitose pelos polimorfonucleares (PMNs) é aumentada pela opsonização com os anticorpos (CINCO *et al.* 1981; CINCO *et al.* 1996; SAMBSIAVA *et al.* 2003). A resposta humoral é clássica, com pico inicial de anticorpos da classe IgM, seguido de rápida elevação de anticorpos da classe IgG que pode persistir por muito mais tempo em relação ao IgM. Níveis elevados de IgM podem ser observados durante os primeiros dois meses da doença. Resposta para IgG em Leptospirose é frequentemente irregular e ocasionalmente não é detectada. Anticorpos da classe IgA aparecem cerca de 15 dias após manifestação clínica da doença e podem persistir por cerca

de nove meses, podendo servir como marcador soroepidemiológico. Anticorpos gênero específicos aparecem primeiro, mas têm rápido declínio, enquanto que os anticorpos sorovar específicos aparecem tardiamente e têm longa persistência (SAMBSIAVA *et al.* 2003).

A especificidade do sorovar é basicamente conferida pelo LPS (Lipopolissacarídeo de membrana) e por glicoproteínas. Outros antígenos gênero específicos também têm sido amplamente descritos, como as OMPs (proteínas de superfície de membrana) de leptospiras, que têm sido identificadas recentemente em vários trabalhos. Duas destas proteínas, OmpL1 e LipL41, são altamente conservadas sendo, portanto, fortes candidatas para desenvolvimento de vacinas, podendo gerar ampla proteção cruzada (HAAKE *et al.* 2000; LEVETT 2001). As OMPs de leptospiras patogênicas, principalmente a LipL32, têm sido associadas com o aumento da expressão de TLR2 e com a estimulação e liberação de uma proteína quimioatratadora de monócitos (CCL2/MCP-1) em células de túbulos proximal de rins de camundongos, sugerindo assim que o TLR2 inicia a resposta inflamatória causada por leptospiras patogênicas em células epiteliais de túbulos renais (HAAKE *et al.* 2000; YANG *et al.* 2006).

A resposta imune mediada por células ainda tem sido descrita na leptospirose, entretanto existem relatos que afirmam existir um tipo de supressão desta resposta com diminuição dos linfócitos CD4⁺ (LEVETT 2001). Na resposta mediada por células, as células B e T são estimuladas após a entrada da bactéria no hospedeiro. Estudos têm mostrado que a ativação dos macrófagos na resposta imune inata ocorre através do CD4 e do Toll-Like receptor 2 (VERNEL-PAUILLAC *et al.* 2006). As leptospiras são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos de diferentes animais tais como camundongos, coelhos e porcos da Índia (FAINE 1999). Entretanto, estudos realizados em gados, camundongos e outros animais têm mostrado que a imunidade contra a leptospirose não é exclusivamente humoral (ALTAVA *et al.*). Em trabalho realizado com gados, foi mostrada evidência de forte resposta imune do tipo Th1, com altos níveis de produção de IFN- γ e envolvimento de células T $\gamma\delta$, quando a resposta foi induzida por vacina monovalente do sorovar Hardjo (BROWN *et al.* 2003; VERNEL-PAUILLAC *et al.* 2006). Alguns trabalhos mostraram significativo aumento nos níveis de TNF- α em pacientes com Leptospirose, sendo os níveis plasmáticos associados com a gravidade da doença (TAJIKI *et al.* 1996; VERNEL-PAUILLAC *et al.* 2006). Em 2005, foi mostrado por Dorigatti *et al.* que monócitos humanos produzem Interleucina 6 (IL-6) quando estimulados com glicolipoproteínas (GLP) de *L. interrogans* (DORIGATTI *et al.* 2005). FOSTE *et al.* em 2003 mostraram

experimentalmente em sangue total humano, que *L. interrogans* sorovar Rachmati induzia a produção de IFN- γ , e que a interleucina 12 (IL-12) derivada de macrófagos era uma das citocinas responsáveis pelo controle desta produção (DE FOST *et al.* 2003). O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por células T ativadas e por células NK, e desempenha uma importante função da defesa contra microorganismos intracelulares, entretanto, foi mostrado no trabalho de Foste *et al* em 2003, uma elevada produção desta citocina contra a leptospira, que como tem sido relatado, trata-se de um patógeno extracelular. Sabe-se que a função da imunidade mediada por células na defesa do hospedeiro contra a leptospirose ainda é pobremente conhecida. Tem sido sugerida a participação de fatores de ambos, hospedeiro e patógeno, no desenvolvimento das lesões provocadas nas células dos tecidos colonizados pelas leptospiros. Assim, os achados acima contribuem para reforçar a hipótese de que a resposta imune mediada por células também participa na defesa do hospedeiro contra a leptospirose.

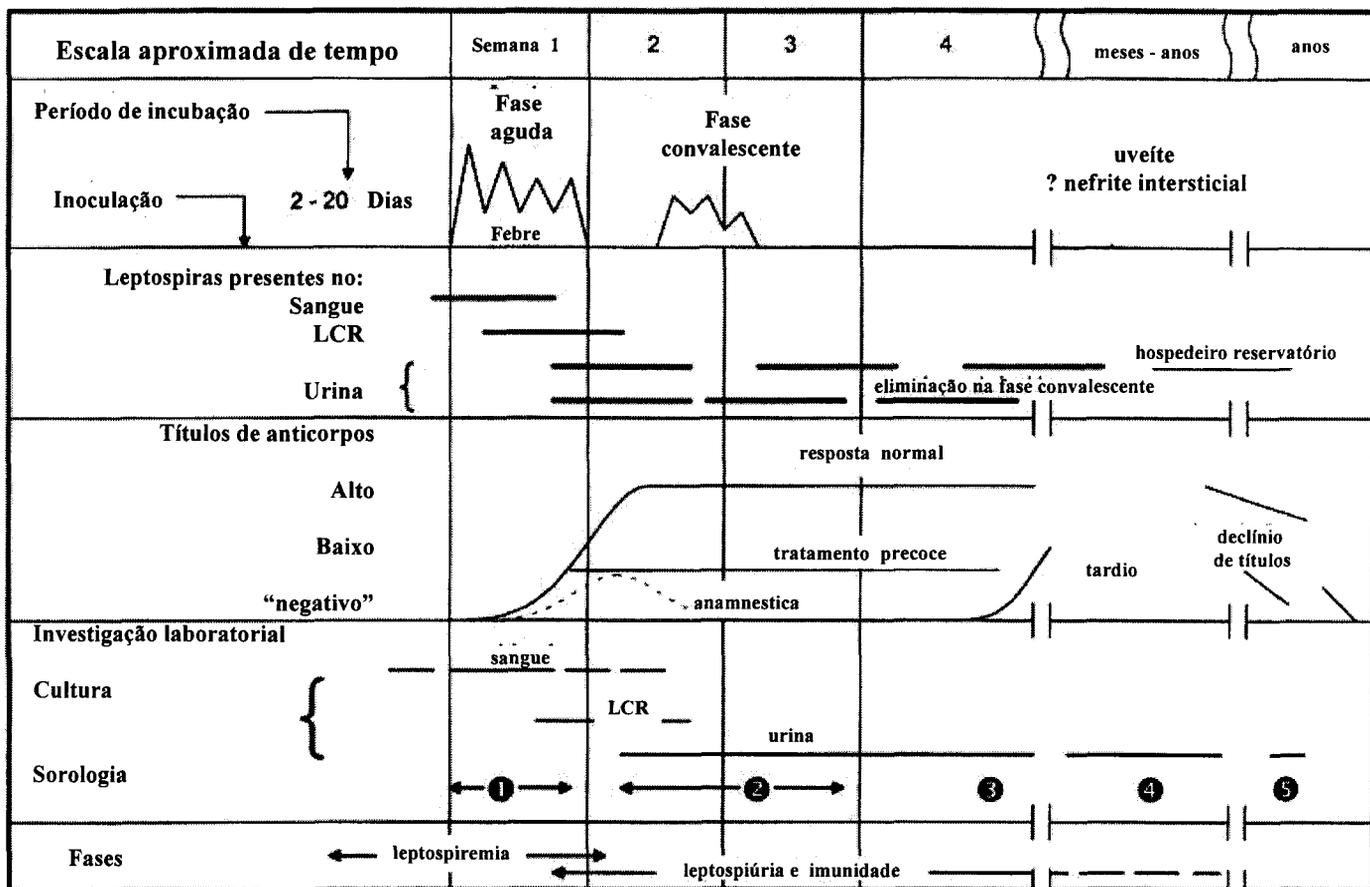


Figura 1. Fases que caracterizam a Leptospirose e aspectos relevantes dos estágios da doença. Adaptado de Levett (2001).

1.5 PROTEÍNAS DE MEMBRANA

A membrana externa de leptospiros contém lipopolissacarídeos (LPS) e várias lipoproteínas de membrana externa (outer membrane proteins - OMP). O LPS é altamente imunogênico e responsável pela especificidade do sorovar (HAAKE 2000; LEVETT 2001). Várias OMPs são altamente conservadas entre as leptospiros, levando conseqüentemente a uma ampla reatividade cruzada na resposta imune.

A habilidade de sobrevivência como organismo livre no ambiente é única entre as espiroquetas invasivas, e presumivelmente reflete expressão diferencial de proteínas envolvidas na adaptação para o ambiente exterior a hospedeiros mamíferos. As proteínas expressas por leptospiros *in vitro* podem ser ou não expressas durante infecção. O entendimento das proteínas expressas durante infecção pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da leptospirose, bem como para o desenvolvimento de novos métodos para o sorodiagnóstico e estratégias de imunoproteção (HAAKE *et al.* 2000; GUERREIRO *et al.* 2001).

O LPS tem sido muito estudado como antígeno de leptospiros, entretanto, variação na porção de carboidratos deste antígeno é responsável pela diversidade antigênica observada a cerca de sorovares de leptospiros, dos quais cerca de 250 já foram identificados. Desta forma, em vacinas que utilizam extratos de certos sorovares (bacterinas), o LPS não tem tido muito êxito em garantir imunoproteção cruzada contra sorovares não incluídos na vacina. Além disso, a variabilidade antigênica do LPS é também um fator limitante para o sorodiagnóstico (GUERREIRO *et al.* 2001; HAAKE *et al.* 2002; NATARAJASEENIVASAN *et al.* 2004).

Recentes estudos de caracterização molecular têm determinado importantes proteínas da superfície celular de leptospiros, tais como: GroEL, DnaK, a porina OmpL1, e a lipoproteína LipL41 e LipL32/MOMP. Estudos têm relatado que a LipL32 é a mais importante proteína de membrana externa expressa durante a fase precoce da infecção, tendo sido considerada como antígeno protéico imunodominante reconhecido por resposta humoral durante infecção natural. A lipoproteína LipL36 também é um componente de membrana externa da leptospira, mas só foi identificada até então, em cultura de organismos “*in vitro*” (HAAKE 2000; HAAKE *et al.* 2000; NATARAJASEENIVASAN *et al.* 2004). A OmpL1 é uma proteína transmembrânica que possui atividade de porina e tem sido mostrada como um importante imunógeno. GroEL e DnaK, são

proteínas de choque térmico que são reguladas pela elevada temperatura encontrada em hospedeiros mamíferos. Estas proteínas também têm apresentado boa reatividade com amostras agudas de indivíduos com leptospirose, entretanto, a GroEL e DnaK têm apresentado significativa reatividade cruzada com amostras de indivíduos saudáveis. A LipL41 é uma lipoproteína exposta na superfície de membrana de leptospiros patogênicas e tem se comportado também como alvo para a resposta imune humoral durante infecção (HAAKE *et al.* 2000). A combinação de LipL41 e OmpL1 quando usados na imunização de Hamsters tem conferido ampla proteção para estes animais, sendo indicados como potenciais candidatos para vacinas (HAAKE 2000; VINETZ 2001).

Muitos testes têm sido avaliados para o diagnóstico sorológico precoce da leptospirose, entretanto, muitos têm mostrado baixa sensibilidade durante a fase aguda da doença. Desta forma, o desenvolvimento de testes para o sorodiagnóstico precoce da leptospirose requer a identificação de proteínas expressas durante a fase aguda e durante a fase convalescente da doença (NATARAJASEENIVASAN *et al.* 2004).

1.6 DIAGNÓSTICO

A leptospirose apresenta manifestações clínicas polimórficas, que na maioria das vezes dificultam o diagnóstico da doença. Em decorrência disso, os exames laboratoriais são extremamente importantes na elucidação diagnóstica. Comumente, os materiais biológicos usados nos exames laboratoriais são amostras de sangue, urina, líquido cefaloraquidiano (LCR), saliva, tecidos e exsudato peritoneal e pleural. Na fase septicêmica da doença, as leptospiros podem ser encontradas no sangue, LCR e na maioria dos tecidos. Na fase imunológica, ocorre o aparecimento de anticorpos específicos circulantes e eliminação de leptospiros na urina. Desta forma, na escolha do exame laboratorial, deve ser considerado este comportamento bifásico que a doença apresenta (CAMARGO *et al.* 1992).

Os métodos laboratoriais aplicados no diagnóstico da leptospirose apóiam-se na demonstração direta dos antígenos (leptospiros íntegras), ou na demonstração indireta, onde são detectados anticorpos específicos contra diferentes epítomos antigênicos presentes nas leptospiros (VINETZ 2001). O uso da microscopia de campo escuro na investigação direta de leptospiros em amostras de sangue e urina tem sido ainda defendido em algumas regiões, particularmente na

Índia, apesar de sua baixa sensibilidade e especificidade (FAINE 1999; VINETZ 2001). O isolamento e cultura de leptospiras são considerados como padrão ouro no diagnóstico direto da doença, entretanto a necessidade de meios específicos de cultura e o lento crescimento das leptospiras nestes meios tornam a metodologia inadequada para a instituição de terapêutica. Um teste promissor candidato a substituir a detecção direta do agente em amostras humanas é o diagnóstico molecular pelo PCR (reação de polimerização em cadeia). Numerosos estudos têm relatado sua alta sensibilidade e especificidade, bem como sua habilidade para diagnosticar leptospirose em fase aguda. Entretanto, esta técnica ainda não tem sido amplamente avaliada em muitos países onde a leptospirose é endêmica, necessitando ser validada em diferentes condições (BROWN *et al.* 1995; FAINE 1999; PLANK *et al.* 2000; OOTEMAN *et al.* 2006).

Como método indireto na detecção de anticorpos específico contra leptospiras, o teste de microaglutinação (MAT) é considerado padrão ouro (FARR 1995; FAINE 1999; PLANK *et al.* 2000; LEVETT 2001), e até o momento é o teste preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Estudos prévios têm mostrado que o MAT possui alta sensibilidade (média de 98%) e alta especificidade (97%). Outra importante vantagem deste teste é sua capacidade de presumir o sorovar ou sorogrupo envolvido na infecção. Por outro lado, o MAT é uma técnica difícil de padronizar e requer um painel de leptospiras de diferentes cepas, para promover uma cobertura adequada da diversidade antigênica representada em determinada área testada. Além disso, o MAT consome tempo, requer amostras pareadas (uma amostra na fase aguda e outra cerca de 15 dias após início dos sintomas) e profissionais treinados com conhecimento especializado (LEVETT *et al.* 1998; LEVETT *et al.* 2001; BAJANI *et al.* 2003; BHARTI *et al.* 2003). Apesar da alta sensibilidade e especificidade, o MAT não é uma metodologia adequada para o diagnóstico precoce da leptospirose, pois além de requerer amostras pareadas para confirmação de soroconversão, pode não detectar anticorpos específicos na primeira semana, após o início dos sintomas (VOLINA *et al.* 1990; LUCCHESI *et al.* 2004; PALANIAPPAN *et al.* 2005; OOTEMAN *et al.* 2006).

Ensaio no formato imunoenzimático (ELISA) e outros testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM específicos anti-leptospira têm sido descritos. Estes testes têm sido desenvolvidos como um método alternativo para o sorodiagnóstico de leptospirose, embora o MAT seja ainda o teste requerido para confirmação de casos da doença (CAMARGO *et al.* 1992; CINCO *et al.* 1992; FLANNERY *et al.* 2001; LEVETT *et al.* 2001; VITALE *et al.* 2004). Em estudo realizado

por BAJANI e cols, em 2003, foi mostrado que um teste comercial ELISA IgM apresentou sensibilidade de 86,5%, e especificidade de 97% quando comparado com o MAT. Ensaio como o Lepto DipStick, Lepto Lateral Flow e Lepto Dri Dot têm sido avaliados como teste de triagem rápida para leptospirose e têm mostrado alta concordância quando comparados ao MAT e ao ELISA IgM. Estes ensaios não requerem eletricidade, possuem baixo custo e podem fornecer resultados em curto período de tempo. Muitos destes ensaios têm utilizado como antígenos o lisado bruto de célula total de leptospiras, e mais recentemente, proteínas recombinantes da superfície celular têm sido também utilizadas como antígeno (PLANK *et al.* 2000; LEVETT *et al.* 2001; VIJAYACHARI *et al.* 2002; BAJANI *et al.* 2003; BHARTI *et al.* 2003; SEHGAL *et al.* 2003; HULL-JACKSON *et al.* 2006).

A sensibilidade do sorodiagnóstico para amostras de fase aguda é muito importante, e pode contribuir para o correto direcionamento do paciente, mas ainda é preciso um maior entendimento a respeito de proteínas expressas durante as fases aguda e convalescente da doença (YERSIN *et al.* 1999; EFFLER *et al.* 2000; BAJANI *et al.* 2003; SEHGAL *et al.* 2003; NATARAJASEENIVASAN *et al.* 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A leptospirose é uma doença infecciosa emergente, que tem afetado o homem em todos os continentes, nas áreas rurais e recentemente em áreas urbanas. Ela freqüentemente causa um amplo espectro de manifestações clínicas no homem podendo comprometer múltiplos órgãos e, na sua fase aguda, os sintomas e sinais são indistinguíveis de outras infecções bacterianas e virais. Outras doenças infecciosas, como dengue, malária, influenza e hepatites virais, por exemplo, podem mimetizar a leptospirose. Assim, a leptospirose se não diagnosticada em seu estágio precoce, pode comprometer outros sistemas e causar complicações fatais, tais como a hemorragia pulmonar, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda, etc (LEVETT 2001; BHARTI *et al.* 2003).

A necessidade de um novo procedimento diagnóstico, que seja rápido, apresente boa sensibilidade e especificidade na fase aguda da doença e que possa ser usado no diagnóstico laboratorial de rotina para detectar casos suspeitos de leptospirose, torna-se muito importante no panorama atual da doença, tanto em áreas altamente endêmicas como nas regiões de baixa endemicidade. Além disso, um ensaio deste tipo irá certamente contribuir para o correto direcionamento do paciente.

Muitos modelos de ensaio têm sido adotados para o diagnóstico de leptospirose. Como exemplo, o teste de microaglutinação (MAT), considerado padrão ouro, o isolamento e cultura em meios específicos e os ensaios imunoenzimáticos como os ELISAs e Dot-ELISAs. Entretanto, alguns destes modelos têm alto custo, e requerem uma série de diluições, longos períodos de incubação e treinamento técnico especializado. Além disso, a infra-estrutura laboratorial adequada e equipamentos sofisticados são exigidos por estes modelos.

Alguns modelos imunocromatográficos, que utilizam antígenos brutos e/ou recombinantes da bactéria, oferecem vantagens devido à sua simplicidade metodológica, ao curto tempo de execução e a rapidez proporcionada na leitura dos resultados, além de apresentarem satisfatória sensibilidade e especificidade relatada na fase precoce da doença.

Portanto, propõe-se neste trabalho, avaliar o desempenho de cinco modelos de teste, sendo dois testes rápidos (lateral flow e dri-dot), um teste no formato dipstick e dois ELISAs IgM, para triagem de casos de leptospirose na fase aguda.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar o desempenho de cinco ensaios sorológicos para o diagnóstico presuntivo de leptospirose na fase aguda, utilizando amostras provenientes de um banco de soros da população de Salvador, Bahia.

3.2. ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de imunoglobulinas IgM específicas contra antígenos de leptospiras em amostras de soro, utilizando os testes de ELISA de captura IgM desenvolvido pela PANBIO e ELISA IgM desenvolvido pela Biomanguinhos - FIOCRUZ.
- Determinar as probabilidades de desempenho para os testes *Lateral Flow*, *Dri Dot*, *DipSTick* e *ELISAs* na triagem de casos de leptospirose na fase aguda e na fase convalescente da doença, utilizando amostras de soro coletadas durante vigilância hospitalar e controles de doadores sadios de banco de sangue da cidade de Salvador – BA.
- Comparar os resultados obtidos pelos testes avaliados com os resultados do teste de microaglutinação (MAT), considerando o título de 1:100 como critério de triagem de casos agudos pelo MAT.
- Determinar a concordância para os testes avaliados na triagem de casos agudos de leptospirose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto integra a colaboração entre o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - BA (LPBM / CPqGM) e o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos / FIOCRUZ - RJ.

O CPqGM, local de execução do projeto, é uma das unidades da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada no município de Salvador-BA. Este órgão do Ministério da Saúde desenvolve importantes pesquisas na área da saúde. Os cursos de especialização e pós-graduação deste centro contribuem para a formação de pesquisadores e professores do mais alto nível. O CPqGM forneceu todo suporte laboratorial requerido para execução deste projeto.

A Biomanguinhos, também unidade da Fundação Oswaldo Cruz, está localizada na cidade do Rio de Janeiro-RJ. Esta unidade tem como prioridade a pesquisa para desenvolvimento de vacinas e reagentes para diagnóstico. A participação de Biomanguinhos neste projeto, foi com o fornecimento da quantidade necessária de Kits ELISA IgM da Biomanguinhos para diagnóstico de leptospirose.

Os outros testes diagnósticos avaliados neste projeto foram doados pelas empresas produtoras ZEPHYR Ltd, Verna Goa, Índia; BIOMERIEUX Ltd, Beseind, Boxtel, The Netherlands e PANBIO Ltd, Brisbane, Queensland, Austrália.

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo de avaliação de ensaios de triagem (*screening*), usando amostras de casos confirmados para leptospirose e amostras de indivíduos sadios como controle negativo.

4.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Neste projeto foram utilizados dois grupos distintos de amostras. O primeiro grupo foi composto por amostras de casos confirmados para leptospirose, contidas num banco de soros, pertencentes a pacientes que participaram de vigilância epidemiológica ativa, que vêm sendo mantida num Hospital de referência para Leptospirose, localizado na cidade de Salvador, desde

janeiro de 2000. Para este grupo de amostras, foram selecionados randomicamente soros de pacientes confirmados laboratorialmente com leptospirose, obedecendo aos seguintes critérios de inclusão:

- a) Amostras de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2000 e julho de 2005.
- b) Apresentação clínica compatível com leptospirose.
- c) Pacientes confirmados laboratorialmente pelo teste de microaglutinação (MAT). Para este teste, os critérios de confirmação são:
 - c.1) Uma única amostra de soro que tenha apresentado no MAT um título $\geq 1:800$.
 - c.2) Aumento de 4 vezes ou mais no título entre as amostras pareadas. As amostras de soros pareadas foram coletadas da seguinte forma: a primeira amostra coletada na fase aguda, ou seja, na admissão do paciente no hospital, e a segunda amostra coletada na fase tardia da doença ou fase convalescente, que corresponde ao fim da hospitalização.
 - c.3) Presença de soroconversão entre as amostras pareadas, definido como um título negativo no MAT ($< 1:100$) na amostra de fase aguda, e um título $\geq 1:200$ na amostra de fase tardia ou convalescente.

Neste primeiro grupo de amostras, foram selecionadas randomicamente da soroteca, 99 soros de fase aguda, 39 soros de fase aguda de pacientes que apresentaram menos de sete dias de sintomas e 50 soros de fase tardia ou convalescente, que obedeciam os critérios de inclusão acima. Dentro do grupo de 99 soros de fase aguda, 50 deles formavam pareamento com os 50 soros de fase tardia ou convalescente.

O segundo grupo foi composto de amostras de soro de voluntários sadios, fornecidas pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia – HEMOBA. Neste grupo, foram selecionadas randomicamente 80 amostras de um banco de 153 soros.

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

A caracterização da população foi baseada em alguns dados epidemiológicos, alguns sinais, sintomas e achados laboratoriais que foram obtidos através de entrevista (**Anexo I**) realizada durante vigilância hospitalar e através de consulta de dados dos pacientes cadastrados no hospital. Os questionários aplicados durante entrevista apresentavam perguntas relevantes ao diagnóstico clínico da leptospirose.

Para análise destes dados, usou-se o teste paramétrico *t*-Student's para comparação das médias e das proporções das variáveis consideradas entre os grupos de amostras com menos de sete dias de sintomas e com sete dias ou mais de sintomas. Resultados significantes foram admitidos para uma probabilidade inferior a 5% ($p < 0.05$).

4.3. DEFINIÇÃO SOROLÓGICA DE CASOS

4.3.1. TESTE DE MICROAGLUTINAÇÃO (MAT)

Na confirmação laboratorial de infecção por leptospirose pelo MAT, é importante a realização do teste para amostras pareadas, onde a primeira amostra deve ser coletada na fase aguda da doença, que corresponde ao início dos sintomas, e a segunda amostra coletada numa fase mais tardia ou convalescente, cerca de 15 dias após início dos sintomas. Os critérios para confirmação de caso são:

- a) Título no MAT $\geq 1:800$ em pelo menos uma amostra de soro.
- b) Aumento de 4 vezes ou mais no título entre as amostras pareadas.
- c) Presença de soroconversão entre as amostras pareadas, definido como um título negativo no MAT ($< 1:100$) na amostra de fase aguda, e um título $\geq 1:200$ na amostra de fase tardia ou convalescente.

4.3.2. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) IGM PARA LEPTOSPIROSE, DA BIOMANGUINHOS.

Os casos positivos pelo ELISA IgM foram determinados pela comparação das densidades óticas (DO) das amostras com o valor da DO obtida para o *cut of* dos soros controles de IgM. Assim, a amostra foi definida como positiva quando apresentava a razão DO amostra / DO *cut of* $\geq 1,2$ vezes o valor da DO *cut of*, e negativa quando esta razão foi $< 1,2$.

4.3.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) ELISA IGM PARA LEPTOSPIROSE, DA PANBIO.

Os casos positivos pelo ELISA IgM PANBIO foram determinados pela comparação das densidades óticas (DO) das amostras com o valor da DO obtida para o *cut of* dos soros controles de IgM. Assim, a amostra foi definida como positiva quando apresentava a razão DO amostra / DO *cut of* $\geq 1,1$ vezes o valor da DO *cut of*, e negativa quando esta razão foi $< 1,1$.

4.3.4. TESTE QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CLASSE IgM ANTI-LEPTOSPIRA – DIPSTICK TEST IGM DA PANBIO.

Na infecção por leptospirosas, a presença de anticorpos IgM específicos em amostras de sangue ou soro, promove o aparecimento de cor na área do teste que corresponde aos dots de antígenos provenientes de *L. biflexa*. Assim, o desenvolvimento de dots roxo-azulados na área do teste que contém os antígenos foi indicativo de amostra reagente, e a ausência de cor na área dos dots foi indicativo de amostra não reagente (negativa). O dot referente ao controle positivo deve apresentar desenvolvimento de cor em ambas as situações, reagente e não reagente, para a validação do ensaio.

4.3.5. TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LEPTOSPIRA – LEPTOCHECK LATERAL FLOW TEST IGM DA ZEPHYR.

Na infecção por leptospirosas, a presença de anticorpos IgM específicos em amostras de sangue ou soro, promove o aparecimento de cor na área do teste que corresponde a banda IgM. Assim, o desenvolvimento de bandas róseas na área do teste foi indicativo de amostra reagente, e a ausência de cor na área da banda IgM foi indicativo de amostra não reagente (negativa). A banda referente ao controle deve apresentar desenvolvimento de cor em ambas as situações, reagente e não reagente, para a validação do ensaio.

4.3.6. TESTE RÁPIDO DE AGLUTINAÇÃO DE LÁTEX – LEPTO TEK DRI-DOT DA BIOMÉRIEUX.

A presença de anticorpos específicos em amostras de soro promove aglutinação das partículas de látex. O grau de aglutinação das partículas depende do grau de especificidade dos anticorpos, do estágio da doença e de outros fatores. Assim, uma forte aglutinação visível após 30 segundos foi altamente consistente com a corrente ou recente infecção por leptospiras.

4.4. PROCESSAMENTO LABORATORIAL

As amostras de sangue, coletadas em Vacutainer® sem anticoagulantes, foram centrifugadas a cerca de 1500rpm por 10 minutos. O soro obtido foi aliqotado em tubos eppendorfs de 1,5mL, e posteriormente congeladas em freezer à -20°C.

4.5. ENSAIOS SOROLÓGICOS

As amostras de soros foram descongeladas a temperatura ambiente para realização dos ensaios sorológicos. Estes ensaios foram realizados seguindo protocolo pré elaborado e as instruções de cada fabricante (Biomanguinhos, PANBIO, BIOMERIEUX e ZEPHYR).

As amostras de soro escolhidas para este trabalho foram analisadas pelos testes ELISA IgM anti-leptospira da Biomanguinhos (EIE BM), ELISA IgM anti-leptospira da PANBIO (EIE PB), LATERAL FLOW TEST IgM da ZEPHYR (LF), LEPTO TEK DRI-DOT da BIOMERIEUX (Dot) e DIPSTICK TEST da PANBIO (DPS). A leitura dos ELISAs foi realizada em espectrofotômetro modelo LR 88026 da Molecular Devices, com filtro ajustado para 450nm.

4.6. PRINCÍPIO DOS ENSAIOS SOROLÓGICOS

4.6.1. ELISA IGM ANTI-LEPTOSPIRA DA BIOMANGUINHOS.

Neste ensaio, os anticorpos da classe IgM, quando presentes no soro, reagem com antígenos de *L. interrogans* adsorvido à fase sólida (superfície de poliestireno da placa). A seguir, adiciona-se as amostras de soro a serem testadas e os soros controles, devidamente diluídas. Caso as amostras testadas tenham anticorpos específicos, estes se ligarão ao antígeno da fase sólida. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti-imunoglobulina IgM humana marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos IgM caso estejam presentes. A presença desta reação será revelada após adição de uma substância cromógena, tetrametilbenzidina / peróxido de hidrogênio (TMB/H₂O₂), que irá formar uma coloração azul turquesa nos micropoços reativos.

Finalmente, a adição de um composto ácido, geralmente ácido sulfúrico, irá parar a reação e os micropoços reativos irão apresentar coloração amarela, em decorrência da reação ácido – TMB. O desenvolvimento de cor nos micropoços é indicativo da presença de anticorpos IgM anti-leptospira na amostra de ensaio. A leitura das microplacas deverá ser realizada em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 450nm.

4.6.2. ELISA IGM ANTI-LEPTOSPIRA DA PANBIO.

Neste ensaio, os anticorpos séricos da classe IgM, quando presentes no soro, reagem com antígenos de leptospira adsorvido à fase sólida (superfície de poliestireno da placa). O soro residual é removido por lavagem e é adicionada anti-IgM humana conjugada a peroxidase (HRP). A presença da reação antígeno-anticorpo será revelada após adição de uma substância cromógena, tetrametilbenzidina complexada com o peróxido de hidrogênio (TMB/H₂O₂), que irá formar uma coloração azul nos micropoços reativos.

Finalmente, a adição de um composto ácido, geralmente ácido sulfúrico, irá parar a reação e os micropoços reativos irão apresentar coloração amarela, em decorrência da reação ácido – TMB. O desenvolvimento de cor nos micropoços é indicativo da presença de anticorpos IgM anti-leptospira na amostra de ensaio.

4.6.3. DIPSTICK TEST IGM DA PANBIO.

O DipSTick foi obtido pela Panbio Ltd, Windsor - Austrália. O ensaio foi realizado de acordo com protocolo de fabricação da Panbio. Este teste utiliza uma técnica de Dot-ELISA, onde antígenos de *L. biflexa* sorovar Patoc 1 são impregnados em dot nas fitas de nitrocelulose (**figura 2a**). As amostras são diluídas (1:200) e incubadas a 50°C por 10 minutos com a fita de nitrocelulose, em cubetas contendo solução diluente que acompanham o kit. Em seguida, a fita é lavada em solução tampão, e incubada em mais 3 cubetas diferentes contendo solução que acelera a reação (*enhancer*), conjugado e uma solução reveladora. O tempo total de incubação foi de aproximadamente 43 minutos. Ao final do período de incubação, a fita dipstick é lavada em tampão e secada ao ar, para depois proceder-se a leitura. A intensidade da mancha (Dot) revelada na fita é comparada com um padrão de intensidade que varia de 1+ a 4+. Uma intensidade $\geq 2+$ é considerada positiva.

4.6.4. LEPTOCHECK LATERAL FLOW TEST IGM DA ZEPHYR.

Este teste utiliza o princípio imunocromatográfico, com um único duplo sítio de imunoensaio numa membrana (**figura 2b**). A amostra testada flui através da membrana montada no dispositivo apropriado. Uma solução de conjugado anti-IgM humano forma um complexo com anticorpos da classe IgM na amostra. Este complexo se move na membrana para a janela do dispositivo que contém o antígeno gênero específico de leptospiros immobilizado na membrana, e que é amplamente reativo com o complexo anticorpo – conjugado. A reação irá desenvolver uma banda de coloração vermelha púrpura na região T dos dispositivos, confirmando um resultado positivo. Os complexos que não se ligaram especificamente ao antígeno, continuam a correr através da membrana, e irão se ligar na região C do dispositivo, que contém immobilizado na membrana anti-anticorpos de coelho, formando também uma banda de coloração vermelha púrpura. A banda formada na região C é o controle, e deverá desenvolver coloração em ambas as situações, reagente e não reagente, para validação do ensaio.

4.6.5. LEPTO TEK DRI-DOT DA BIOMÉRIEUX.

O Lepto Tek Dri Dot consiste de partículas de látex coloridas ativadas com um antígeno de leptospira amplamente reativo, que é secado sobre um cartão de aglutinação (**figura 2c**). O ensaio é baseado na ligação de anticorpos específicos anti-leptospira, presentes na amostras de soro, com o antígeno, causando uma fina e granular aglutinação que tende a depositar-se na borda da gota da amostra usada. A aglutinação é indicativo de amostra positiva. Quando anticorpos não específicos estão presentes, a suspensão fica homogênea e não ocorre aglutinação. Neste caso a amostra é negativa.

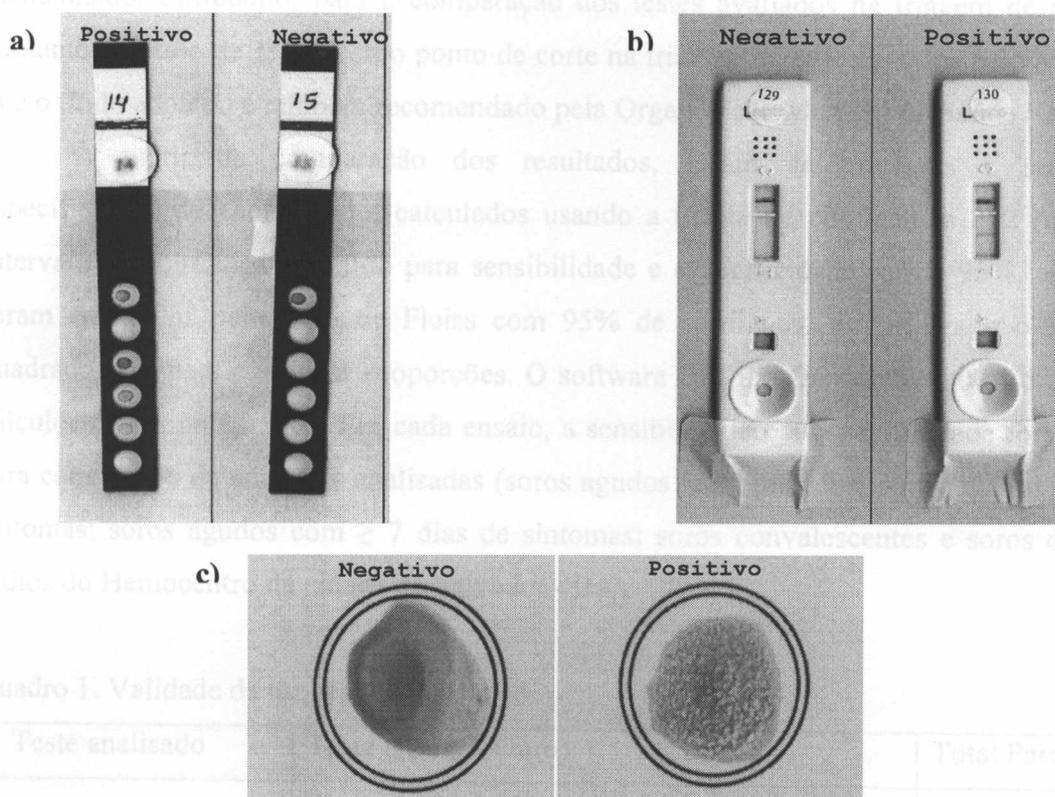


Figura 2. Testes rápidos avaliados: a) DipStick, mostrando a esquerda um teste positivo e a direita um teste negativo para anticorpos anti-leptospira; b) Lateral Flow, mostrando a esquerda um teste negativo e a direita um teste positivo para anticorpos anti-leptospira; c) Teste de macroaglutinação em Látex, que mostra a esquerda ausência de aglutinação e a direita a presença de aglutinação.

4.7. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS PARA ANÁLISE DOS DADOS

O desempenho de um teste diagnóstico depende da sua validade ou acurácia, ou seja, do grau em que o teste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido.

Para determinar a validade dos testes rápidos, os resultados destes testes foram comparados com os resultados do teste de microaglutinação (MAT), considerado o teste “Padrão-Ouro”. Os ELISAs analisados neste trabalho também foram comparados com o padrão ouro. Como mencionado anteriormente neste capítulo, as amostras de casos de leptospirose foram confirmadas laboratorialmente pelo MAT, baseado nos critérios de confirmação do teste também mencionado. Entretanto, para a comparação dos testes avaliados na triagem de casos agudos, adotamos o título de 1:100 como ponto de corte na triagem de casos agudos pelo MAT. Ressalto que o título adotado é também recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

A partir da comparação dos resultados, foram determinadas a sensibilidade e especificidade de cada ensaio, calculados usando a tabela de contingência 2x2 (**quadro 1**). O intervalo de confiança admitido para sensibilidade e especificidade foi de 95%, e os intervalos foram estimados pelo teste de Fleiss com 95% de confiança. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) para comparar proporções. O software EPI INFO6 versão 6.04 foi usado para os cálculos destes parâmetros. Em cada ensaio, a sensibilidade e a especificidade foram calculadas para cada grupo de amostras analisadas (soros agudos randomizados; soros agudos com < 7 dias sintomas; soros agudos com ≥ 7 dias de sintomas; soros convalescentes e soros de indivíduos sadios do Hemocentro da cidade de Salvador - BA).

Quadro 1. Validade de um teste diagnóstico.

Teste analisado	Teste (Padrão-Ouro)		Total Parcial
	Presente	Ausente	
+	VP (verdadeiro positivo)	FP (Falso positivo)	VP+FP
-	FN (Falso negativo)	VN (verdadeiro negativo)	FN+VN
Total Parcial	VP+FN	FP+VN	Total

- A sensibilidade ($VP / VP+FN$) é definida como a capacidade do teste em detectar os indivíduos verdadeiramente positivos.
- A especificidade ($VN / FP+VN$) é definida como a capacidade do teste em detectar os verdadeiros negativos.

O índice de concordância Kappa (k) foi utilizado para determinar a concordância entre os ensaios avaliados (**quadro 2**). O software EPI INFO 6 versão 6.04 foi usado para calcular o índice Kappa. O valor de kappa superior a 0.61 indica boa concordância entre os testes, enquanto o valor inferior a 0.41 indica pobre concordância (**quadro 3**). O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi calculada usando o software Bioestat 3.0, para avaliar o grau de correlação existente entre os ELISAs da Biomanguinhos e da Panbio.

Quadro 2. Determinação da concordância entre testes diagnósticos.

Teste			Total Parcial
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total Parcial	a+c	b+d	(a+b+c+d)

O índice Kappa (k) é uma medida muito utilizada para expressar a confiabilidade de um teste, por ser um indicador de concordância ajustada, pois leva em consideração, a concordância devido à chance (LANDIS *et al.* 1977; KRAEMER *et al.* 1988).

O índice Kappa é estimado como:

$k = P_o - P_e / 1 - P_e$, sendo:

P_o = Proporção de concordâncias observadas: $a+d / a+b+c+d$.

P_e = Proporção de concordâncias esperada: $[(a+b)(a+c)] + [(c+d)(b+d)] / (a+b+c+d)^2$.

Os valores de (k) e suas respectivas interpretações são mostradas na **quadro 3** abaixo.

Quadro 3. Escala de concordância do *Kappa*.

Kappa	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Adaptado de Landis & Koch, Biometrics, 1977 (LANDIS et al. 1977).

5. RESULTADOS

Neste estudo avaliamos o desempenho de cinco ensaios sorológicos (01 Lateral Flow, 01 Dri-Dot, 01 DipStick e 02 ELISAs IgM) para o diagnóstico de Leptospirose aguda. O número de soros avaliados para cada ensaio sorológico está apresentado na **tabela 3**. Para os ELISAs Biomanguinhos e Panbio, foram avaliados todos os soros disponíveis. Entretanto, devido ao volume insuficiente de soros, foi avaliado para os testes rápidos Lateral Flow, Dri-Dot e DipStick, apenas 136, 136 e 135 soros de fase aguda, respectivamente. As amostras de soros dos casos de Leptospirose foram coletadas de pacientes com suspeita da doença e que foram internados num hospital de referência da cidade de Salvador – BA. Como controle negativo, 80 soros de doadores sadios do banco de sangue da cidade de Salvador – BA, foram inclusos no estudo. Para o ensaio DipStick, foi avaliado somente 79 soros do grupo de controles sadios, pois uma alíquota de soro foi insuficiente (**tabela 3**).

Tabela 3. Número de soros avaliados pelos ensaios sorológicos.

Grupo de soros testados (n°)	N° testado					
	^a LF	^a Dot	^a DPS	^a EIE BM	^a EIE PB	^a MAT
Fase aguda (n=138)	136	136	135	138	138	138
Fase convalescente (n=50)	50	50	50	50	50	50
Doadores sadios do banco de sangue (n=80)	80	80	79	80	80	80

^a LF: Lateral Flow da Zephyr; Dot: Dri-Dot da Biomeriêux; DPS: DipStick da Panbio; EIE BM e EIE PB: ELISAs IgM da Biomanguinhos e da Panbio, respectivamente; MAT: teste “padrão ouro” de microaglutinação.

Nos grupos de fase aguda e de doadores sadios, algumas amostras de soro foram insuficientes para serem avaliadas com todos os testes. Contudo, a diferença entre o número de amostras testadas entre os ensaios para um mesmo grupo não foi significativa ($p > 0,05$).

Pudemos coletar e analisar neste trabalho alguns dados epidemiológicos (sexo e idade), sinais, sintomas e os achados laboratoriais dos casos confirmados para leptospirose (**tabela 4**). Acerca dos 138 pacientes casos confirmados para a doença, cerca de 91% representavam o sexo masculino com média de idade de 33 (\pm 12) anos (**tabela 4**). Para as mulheres, a média de idade foi de 41 (\pm 14) anos (dado não mostrado na tabela 4), diferindo estatisticamente da média encontrada nos homens ($p=0,0279$). Estratificando os 138 casos em amostras agudas em grupos com menos de 7 dias de sintomas e \geq 7 dias de sintomas, observamos que em ambos os grupos o sexo masculino prevaleceu ($>85\%$) em relação ao sexo feminino e a média de idade foi superior a 30 anos (**tabela 4**). A média de idade nestes grupos para o sexo feminino foi de 27 (\pm 15) anos e 46 (\pm 11) anos para os indivíduos com menos de 7 dias de sintomas e \geq 7 dias de sintomas, respectivamente (dados não mostrados na tabela 4). No grupo com menos de 7 dias de sintomas não houve diferença estatística entre as médias de idade comparadas ($p=0,6309$), enquanto que no grupo com 7 dias ou mais de sintomas, as médias de idade entre os sexos diferiram estatisticamente ($p=0,0296$).

Com relação aos sintomas e sinais apresentados pelos 138 pacientes com leptospirose, febre (95%) e icterícia (83%) foram os sintomas mais frequentes (**tabela 4**). Apenas 5% dos 138 casos de leptospirose apresentaram hemorragia pulmonar e 45% de 98 casos da doença apresentaram sufusão conjutival (**tabela 4**). A média de dias de sintomas para os 138 casos de leptospirose foi de 7 (\pm 4) dias, sendo que para o grupo com menos de 7 dias, a média foi de 4,8 (\pm 1) dias, e para o grupo \geq 7 dias, a média foi de 10 (\pm 3) dias (**tabela 4**).

Os achados laboratoriais avaliados aqui foram a contagem de leucócitos, os níveis das transaminases (TGO e TGP), os níveis de uréia sérica e creatinina sérica. Em 136 casos de leptospirose, os leucócitos apresentaram média de $13,9 \times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue. Nos grupos com menos de 7 dias e \geq 7 dias de sintomas, a média na contagem de leucócitos foi de $13,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $14,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue, respectivamente (**tabela 4**). Os níveis médios de TGO e TGP foram respectivamente iguais a 105,9 (\pm 142) UI/L e 74,1 (\pm 97) UI/L. A uréia e creatinina séricas apresentaram níveis médios de 111,8 (\pm 67) mg/dL e 3,3 (\pm 2) mg/dL, respectivamente (**tabela 4**). Dentre os pacientes hospitalizados, 16% foram submetidos a diálise intraperitoneal, 98% se recuperaram (tiveram alta do hospital) e apenas 2 (1%) casos foram a óbito (**tabela 4**).

Tabela 4. Dados sobre sexo, idade, sintomas e sinais, achados laboratoriais e hospitalização dos casos confirmados para leptospirose.

	Agudos com < 7 dias de sintomas (n=72)		Agudos com ≥ 7 dias de sintomas (n=66)		^a n	Total (n=138)
	^a n	Número (%) ou média ^b (DP)	^a n	Número (%) ou média ^b (DP)		
Sexo e Idade						
Masculino	72	69 (96)	66	57 (86)	138	126 (91)
Idade	72	30,3 (±11)	66	36,5 (±12)	138	33,0 (±12)
Sintomas e sinais						
Dias com sintomas	72	4,8 (±1)	66	10,0 (±3)	138	7 (±4)
Febre	71	68 (96)	66	63 (95)	137	131 (95)
Icterícia	72	57 (79)	66	58 (88)	138	115 (83)
Hemorragia pulmonar	72	5 (7)	66	2 (3)	138	7 (5)
Sulfusão conjutival	50	21 (42)	48	23 (48)	98	44 (45)
Achados laboratoriais						
Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	70	13,3 (±5)	66	14,7 (±6)	136	13,9 (±6)
^c TGO (UI/L)	71	114,6 (±155)	65	96,3 (±125)	136	105,9 (±142)
^c TGP (UI/L)	71	78,3 (±101)	65	69,5 (±92)	136	74,1 (±97)
Uréia (mg/dL)	24	103,9 (±66)	18	122,3 (±76)	42	111,8 (±67)
Creatinina (mg/dL)	24	2,9 (±2)	18	3,8 (±2)	42	3,3 (±2)
Resultado da hospitalização						
Recuperado	71	69 (97)	* 66	65 (98)	137	134 (98)
Óbito	71	2 (3)	66	0 (0)	137	2 (1)
Diálise	71	12 (17)	66	10 (15)	137	22 (16)

^a Número total de observações.

^b (DP)= Desvio padrão.

^c TGO e TGP: Transaminases

*1 indivíduo foi transferido para outra unidade hospitalar.

O número de soros reativos para os ensaios sorológicos avaliados, é mostrado na **tabela 5**. Dentre os 96 soros randomizados de fase aguda, 95 foram testados pelos ensaios Lateral Flow (LF) e Dri-Dot (Dot), sendo 80 e 76 soros reativos respectivamente; 94 pelo DipStick (DPS), sendo 68 soros reativos; e 96 pelos ELISAs Biomanguinhos (EIE BM) e Panbio (EIE PB), sendo 76 e 84 soros reativos respectivamente. Os 50 soros de fase convalescente foram testados pelos 5 ensaios avaliados, sendo 41 reativos para o Lateral Flow, 42 para o Dri-Dot, 40 para o DipStick, 48 para o ELISA da Biomanguinhos e 46 para o ELISA da Panbio. No grupo de doadores do banco de sangue, 4 amostras foram reativas para o Lateral Flow, Dri-Dot e ELISA da Biomanguinhos, e 10 foram reativas para o ELISA da Panbio. Mesmo sabendo que o MAT é considerado o teste sorológico padrão ouro para a confirmação de casos da doença, observou-se que em amostras sorológicas de fase aguda, ao considerarmos como ponto de corte o título de 1:100, apenas 66, 33 e 54 amostras foram positivas para os soros agudos randomizados (n=96), agudos com < 7 dias de sintomas (n=72) e agudos com ≥ 7 dias de sintomas (n=66), respectivamente.

Tabela 5. N° de reações positivas observadas em cinco ensaios para detecção de anticorpos contra leptospira, estratificado por grupo de estudo.

Grupo de estudo (N° de soros)	N° de amostras de soros reagentes / total n° soros testados (% positivos)					
	^b MAT	^a LF	^a Dot	^a DPS	^a EIE BM	^a EIE PB
Fase aguda						
• Randomizados (n= 96).	66/96 (69)	80/95 (84)	76/95 (80)	68/94 (72)	76/96 (79)	84/96 (87)
• < 7 dias de sintomas (n= 72)	33/72 (46)	50/70 (71)	35/70 (50)	23/70 (33)	39/72 (54)	48/72 (67)
• ≥ 7 dias de sintomas (n= 66)	54/66 (82)	58/65 (89)	60/65 (92)	57/64 (89)	61/66 (92)	63/66 (95)
Fase Convalescente (n= 50)	50/50 (100)	41/50 (82)	42/50 (84)	40/50 (80)	48/50 (96)	46/50 (92)
Doadores sadios de banco de sangue (n= 80)	0/80 (0)	4/80 (5)	4/80 (5)	0/79 (0)	4/80 (5)	10/80 (12)

^a LF: Lateral Flow da Zephyr; Dot: teste de aglutinação em Látex Dri-Dot da Biomeriêux; DPS: teste imunocromatográfico DipStick da Panbio; EIE BM: ELISA Biomanguinhos IgM; EIE PB: ELISA IgM da Panbio.

^b O título do MAT considerado contra um ou mais sorovares, excluindo Patoc, foi $\geq 1:100$.

A sensibilidade e a especificidade dos ensaios sorológicos analisados são mostradas na **tabela 6**. Considerando os soros randomizados de fase aguda, a sensibilidade dos ensaios avaliados variou desde 72,3% (IC 95%: 62 - 80,8) no DipSTick até 87,5% (IC 95%: 78,8 - 93,1) no ELISA da Panbio, enquanto que a sensibilidade no MAT nesta fase foi de 68,8% (IC 95%: 58,4 - 77,6), considerando no MAT o título 1:100 como ponto de corte para triagem de casos agudos.

Quando os soros de fase aguda foram estratificados por dias de sintomas após início da doença (< 7 dias de sintomas e \geq 7 dias de sintomas), a sensibilidade variou desde 32,9% (IC 95%: 22,4 - 45,2) no DipSTick a 71,4% (IC 95%: 59,2 - 81,3) no Lateral Flow para soros com menos que 7 dias de sintomas desde o início da doença, e 89,1% (IC 95%: 78,2 - 95,1) no DipSTick a 95,5% (IC 95%: 86,4 - 98,8) no ELISA Panbio para os soros com mais que 7 dias de sintomas desde o início da doença (**tabela 6**).

O MAT apresentou baixa sensibilidade quando comparado aos ensaios rápidos avaliados, variando desde 45,8% (IC 95%: 34,2 - 57,9) para soros de fase aguda com menos que 7 dias de sintomas, até 81,8% (IC 95%: 70,0 - 89,9) em soros agudos com mais de 7 dias de sintomas após início da doença (**tabela 6**).

Nos soros de fase aguda randomizados, as sensibilidades dos ensaios Lateral Flow, Dri-Dot, DipSTick e ELISAs Biomanguinhos e Panbio não diferiram estatisticamente ($p=0,092$). Entretanto, o DipSTick apresentou significativamente baixa sensibilidade em relação ao Lateral Flow e o ELISA Panbio ($p=0,019$ e 95% IC). Na fase aguda com menos que 7 dias de início dos sintomas, o Lateral Flow foi significativamente mais sensível em relação ao Dri-Dot, DipSTick e ELISA Biomanguinhos ($p<0,001$), mas não diferiu estatisticamente quando comparado com o ELISA Panbio ($p=0,539$).

Quando estratificamos a fase aguda com < 7 dias em intervalos de dias de sintomas (2 a 4 dias; 5 a 7 dias; 8 a 10 dias e 11 dias ou mais), o Lateral Flow, o Dri-Dot e o ELISA Panbio apresentaram melhor sensibilidade, 50%, 50% e 52% respectivamente, para o intervalo de 2 a 4 dias, entretanto, apenas o Lateral Flow e o ELISA Panbio mostraram melhor sensibilidade no intervalo de 5 a 7 dias de sintomas, 86,2% e 78% respectivamente (**figura 3**). No intervalo de 8 a 10 dias de sintomas, a sensibilidade foi superior a 91% para todos os testes. Ambos os testes Lateral Flow e ELISA Panbio diferiram significativamente dos testes Dri-Dot, DipSTick e ELISA Biomanguinhos ($p<0,05$) no intervalo de 5 a 7 dias de sintomas. Entretanto, a

sensibilidade entre os testes nos intervalos de 2 a 4 dias, 8 a 10 dias e 11 dias ou mais de sintomas, não diferiu significativamente ($p>0,05$) (**figura 3**).

O MAT foi significativamente o teste menos sensível na fase aguda randômica ($p<0,05$), embora não tenha diferido significativamente do DipSTick, do Dri-Dot e do ELISA Biomanguinhos, na fase aguda com menos que 7 dias de sintomas ($p=0,220$), ($p=0,619$) e ($p=0,317$), respectivamente.

Em soros de fase convalescente, a sensibilidade foi alta, variando desde 80% (IC 95%: 65,9 - 89,5) no DipSTick, até 96% (IC 95%: 85,1 - 99,3) no ELISA da Biomanguinhos, enquanto que para o MAT a sensibilidade foi de 100% (IC 95%: 91,1 - 100,0) (**tabela 6**). Nesta fase, o DipSTick foi significativamente o teste menos sensível quando comparado com o ELISA da Biomanguinhos ($p=0,014$) e com o MAT ($p=0,037$). A sensibilidade não diferiu significativamente entre os ELISAs ($p=0,674$) e nem entre o MAT e os ELISAs ($p=0,701$), embora o ELISA Biomanguinhos tenha apresentado a maior sensibilidade 96% (IC 95%: 85,1 - 99,3) na fase convalescente.

A especificidade encontrada variou desde 87,5% (IC 95%: 77,8 - 93,5) para o ELISA da Panbio, até 100% (IC 95%: 94,2 - 100,0) para o DipSTick. A especificidade encontrada para o MAT foi de 100% (IC 95%: 94,2 - 100,0) (**tabela 6**). O ELISA Panbio foi significativamente menos específico do que o MAT ($p=0,001$) e do que o DipSTick ($p=0,003$). A especificidade entre os ensaios Lateral Flow, Dri-Dot, DipSTick, ELISA Biomanguinhos e MAT, não diferiram significativamente ($p=0,0846$), embora o MAT e o DipSTick tenham apresentado maior especificidade 100% (**tabela 6**).

Tabela 6. Sensibilidade e especificidade de cinco ensaios para detecção de anticorpos contra leptospira, calculado usando tabela de contigência 2x2.

	% Sensibilidade (IC 95%)				% Especificidade (IC 95%)
	Agudo randomizados	Agudo < 7 dias	Agudo ≥ 7 dias	Convalescente	
^{a,b} MAT	68,8 (58,4 - 77,6)	45,8 (34,2 - 57,9)	81,8 (70,0 - 89,9)	100,0 (91,1 - 100,0)	100,0 (94,3 - 100)
^a LF	84,2 (75,0 - 90,6)	71,4 (59,2 - 81,3)	89,2 (78,5 - 95,2)	82,0 (68,1 - 91,0)	95,0 (87,0 - 98,4)
^a Dot	80,0 (70,3 - 87,2)	50,0 (37,9 - 62,1)	92,3 (82,2 - 97,1)	84,0 (70,3 - 92,4)	95,0 (87,0 - 98,4)
^a DPS	72,3 (62,0 - 80,8)	32,9 (22,4 - 45,2)	89,1 (78,2 - 95,1)	80,0 (65,9 - 89,5)	100,0 (94,2 - 100)
^a EIE BM	79,2 (69,4 - 86,5)	54,2 (42,1 - 65,8)	92,4 (82,5 - 97,2)	96,0 (85,1 - 99,3)	95,0 (87,0 - 98,4)
^a EIE PB	87,5 (78,8 - 93,1)	66,7 (54,5 - 77,1)	95,5 (86,4 - 98,8)	92,0 (79,9 - 97,4)	87,5 (77,8 - 93,5)

^a LF: Lateral Flow da Zephyr; Dot: Dri-Dot Látex da Biomeriêux; DPS: DipSTick da Panbio; EIE BM e EIE PB: ELISA IgM da Biomanguinhos e ELISA IgM da Panbio, respectivamente; MAT: teste “padrão-ouro” de microaglutinação.

^b O título do MAT considerado contra um ou mais sorovares, excluindo Patoc, foi $\geq 1:100$.

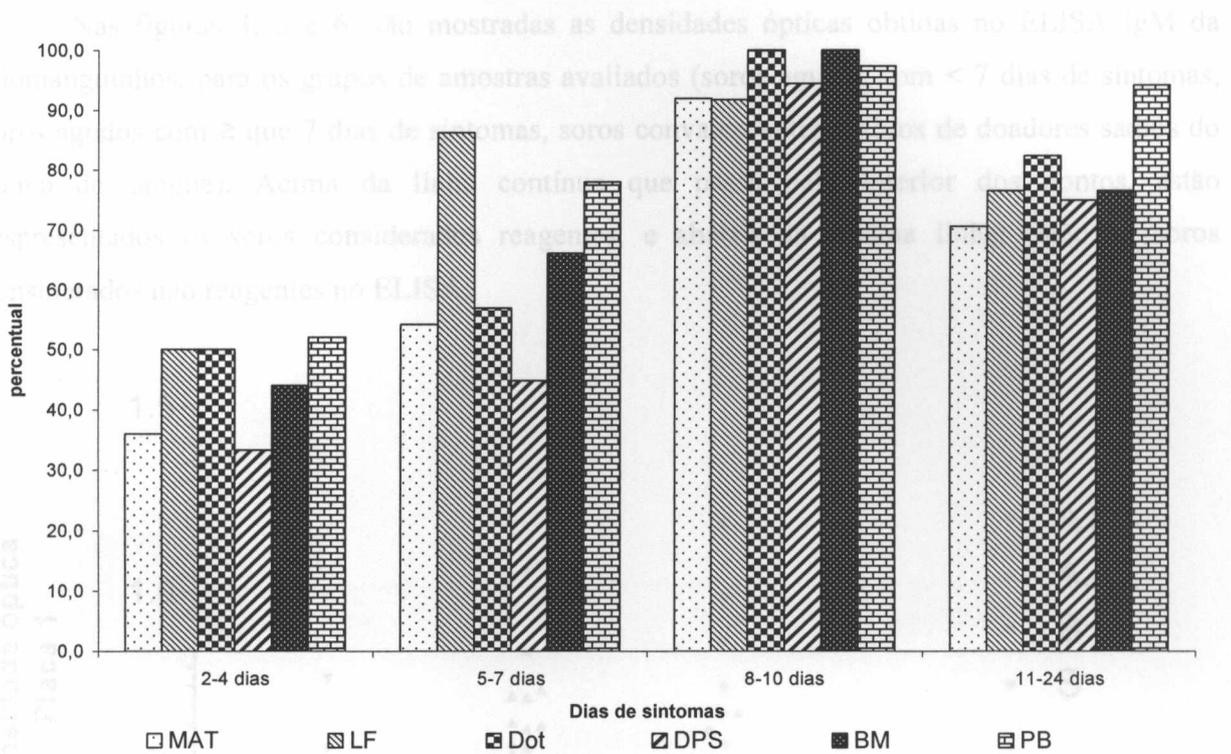


Figura 3. Sensibilidade dos ensaios sorológicos para o diagnóstico de Leptospirose aguda durante a primeira semana da doença.

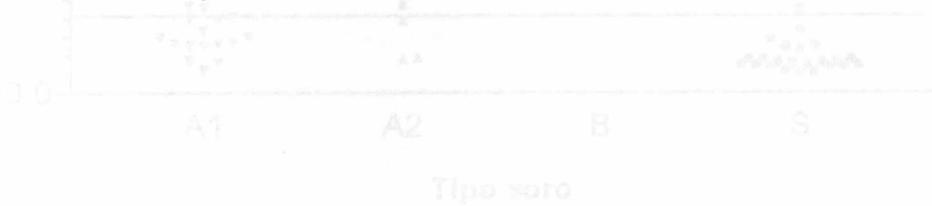


Figura 4. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA 1eM da Biomanguinhos na placa 1. A linha contínua no interior dos pontos representa o *cut-off* $\times 1,2$ do ensaio. A1: soros agudos < de 7 dias de sintomas; A2: soros agudos ≥ 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e soros de indivíduos sadios de banco de sangue.

Nas figuras 4, 5 e 6, são mostradas as densidades ópticas obtidas no ELISA IgM da Biomanguinhos, para os grupos de amostras avaliados (soros agudos com < 7 dias de sintomas, soros agudos com ≥ 7 dias de sintomas, soros convalescentes e soros de doadores sadios do banco de sangue). Acima da linha contínua que passa pelo interior dos pontos, estão representados os soros considerados reagentes, e abaixo da mesma linha, estão os soros considerados não reagentes no ELISA.

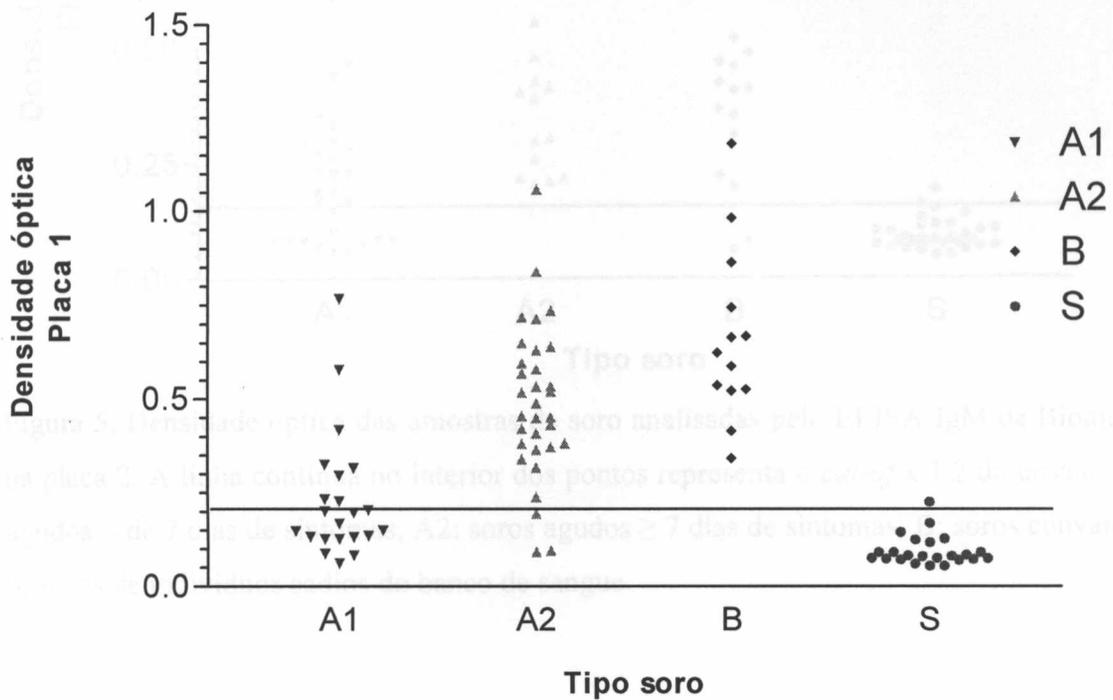


Figura 4. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Biomanguinhos na placa 1. A linha contínua no interior dos pontos representa o *cut-of* x 1.2 do ensaio. A1: soros agudos $<$ de 7 dias de sintomas; A2: soros agudos ≥ 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e S: soros de indivíduos sadios do banco de sangue.

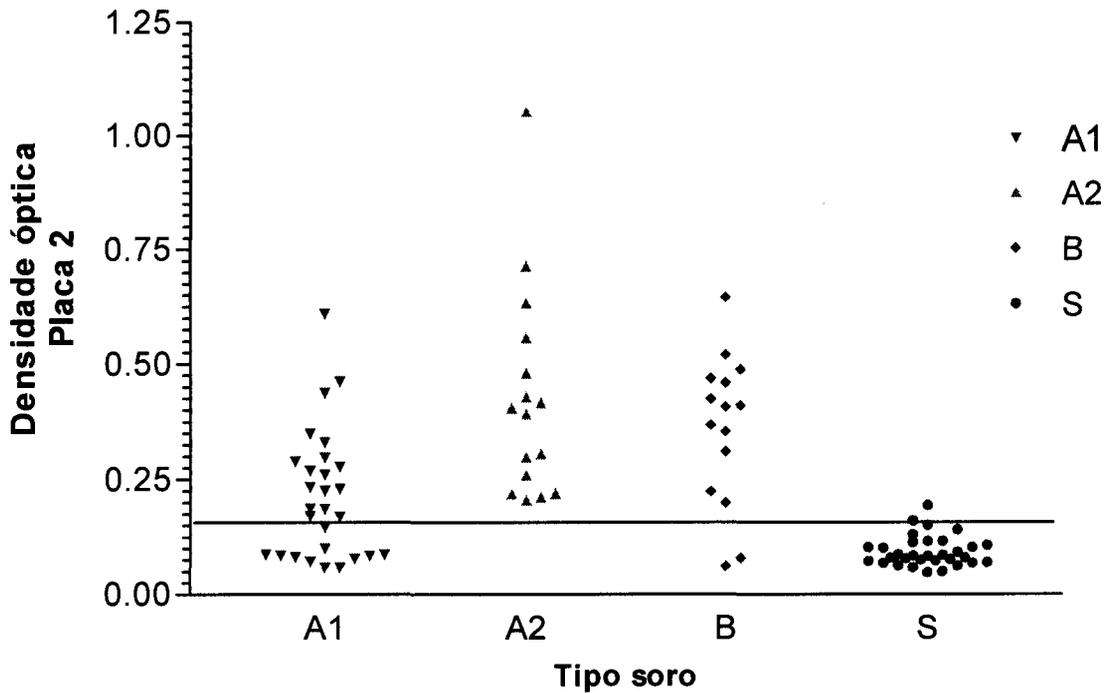


Figura 5. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Biomanguinhos na placa 2. A linha contínua no interior dos pontos representa o *cut-of* x 1.2 do ensaio. A1: soros agudos < de 7 dias de sintomas; A2: soros agudos \geq 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e S: soros de indivíduos sadios do banco de sangue.

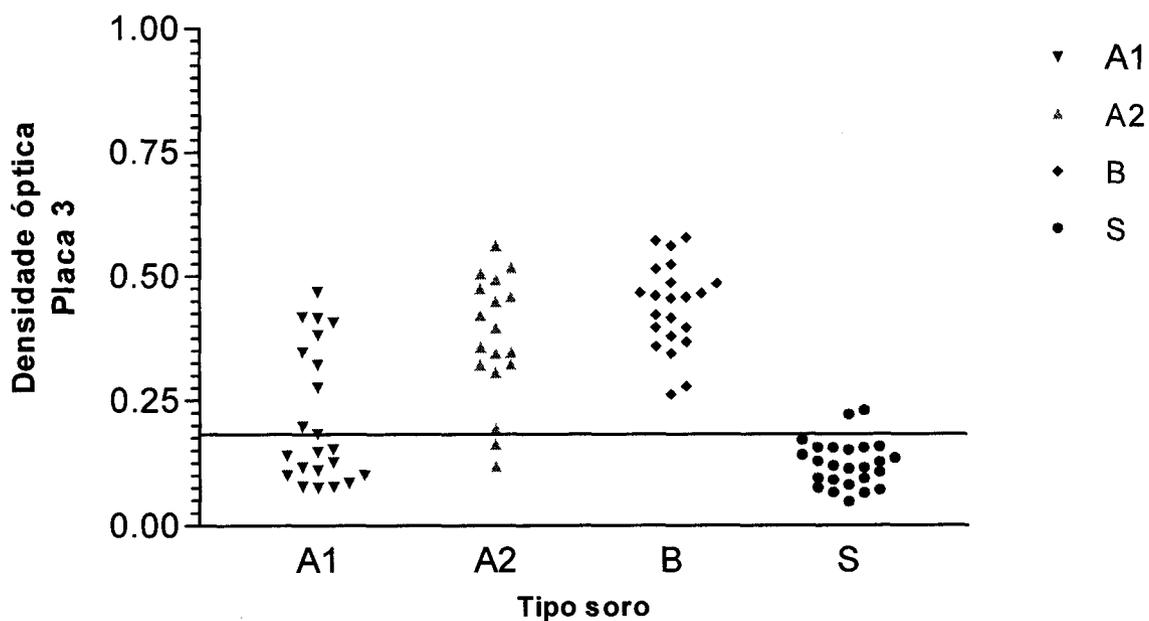


Figura 6. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Biomanguinhos na placa 3. A linha contínua no interior dos pontos representa o *cut-of* x 1.2 do ensaio. A1: soros agudos < de 7 dias de sintomas; A2: soros agudos \geq 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e S: soros de indivíduos sadios do banco de sangue.

Nas figuras 7, 8 e 9, são mostradas as densidades ópticas obtidas no ELISA IgM da Panbio, para os grupos de amostras avaliados (soros agudos com < 7 dias de sintomas, soros agudos com \geq 7 dias de sintomas, soros convalescentes e soros de doadores sadios do banco de sangue). Acima da linha contínua que passa pelo interior dos pontos, estão representados os soros considerados reagentes, e abaixo da mesma linha, estão os soros considerados não reagentes no ELISA.

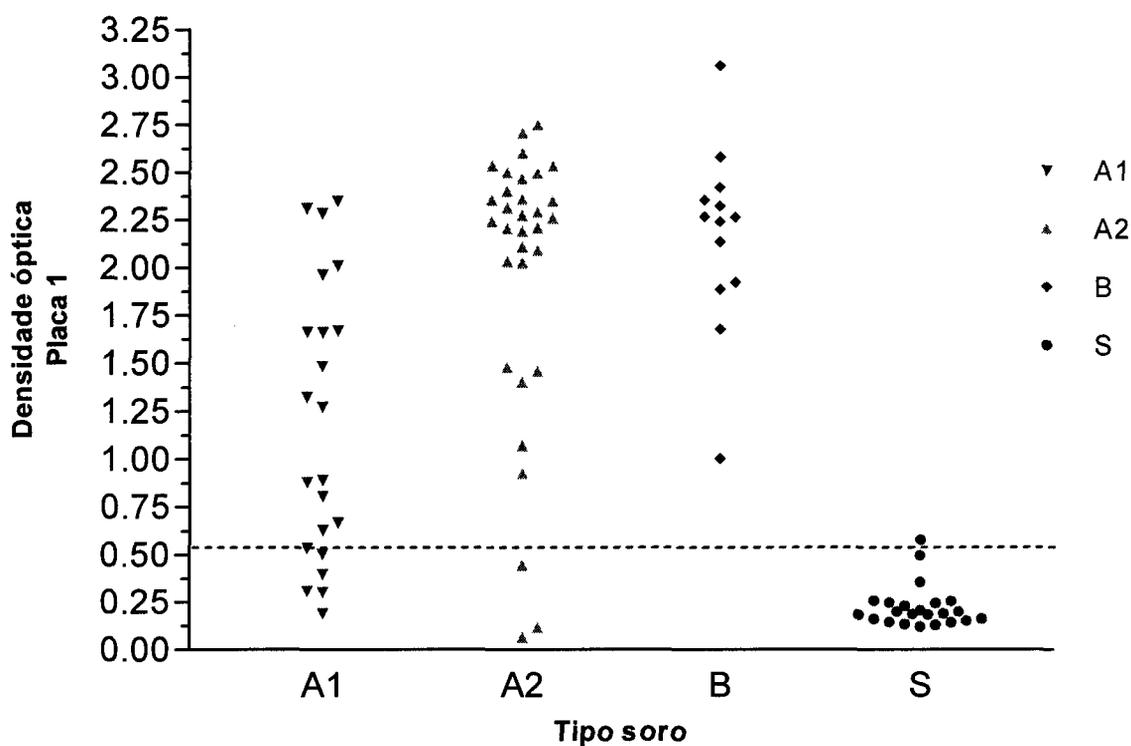


Figura 7. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Panbio na placa 1. A linha tracejada no interior dos pontos representa o *cut-off* x 1.1 do ensaio. A1: soros agudos < 7 dias de sintomas; A2: soros agudos \geq 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e S: soros de indivíduos sadios do banco de sangue.

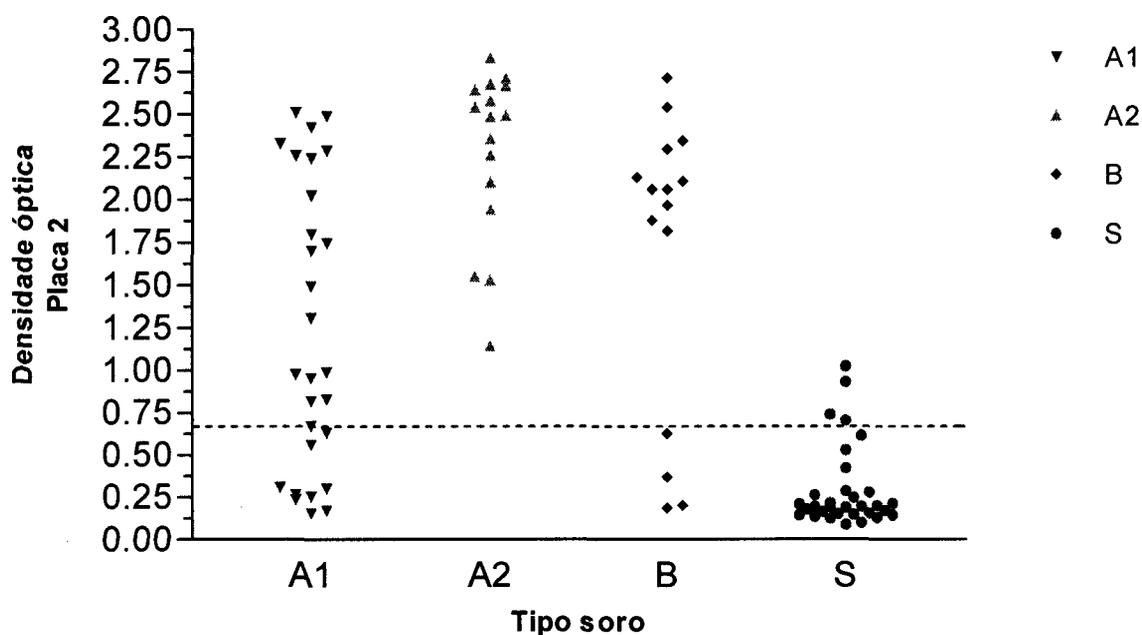


Figura 8. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Panbio na placa 2. A linha tracejada no interior dos pontos representa o *cut-off* $\times 1.1$ do ensaio. A1: soros agudos $<$ de 7 dias de sintomas; A2: soros agudos \geq 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e S: soros de indivíduos sadios do banco de sangue.

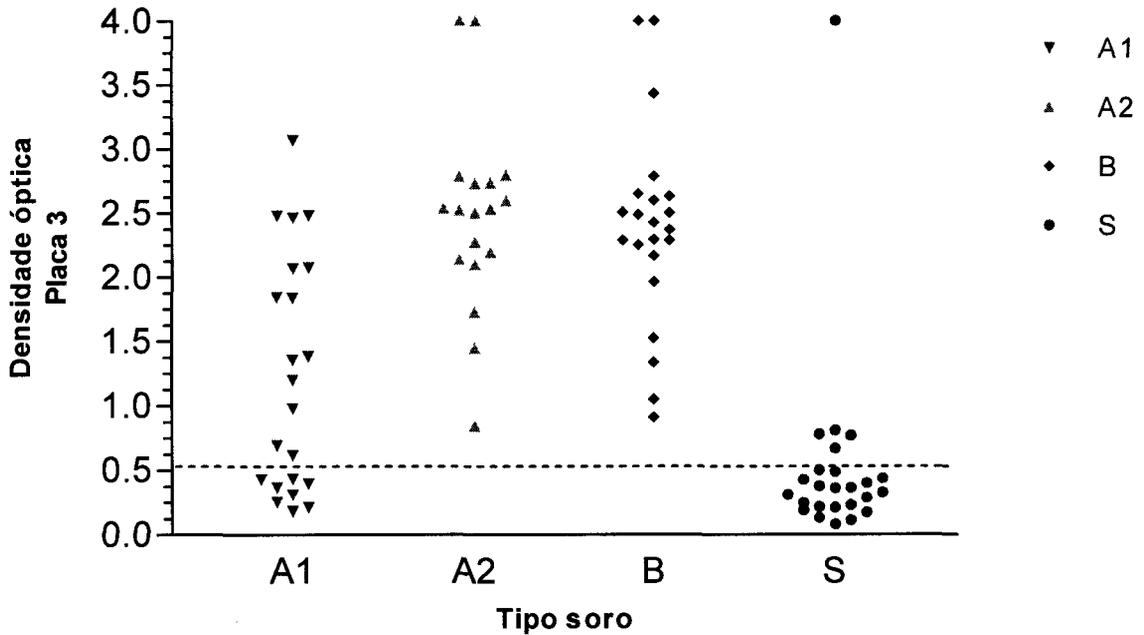


Figura 9. Densidade óptica das amostras de soro analisadas pelo ELISA IgM da Panbio na placa 3. A linha tracejada no interior dos pontos representa o *cut-off* $\times 1.1$ do ensaio. A1: soros agudos < 7 dias de sintomas; A2: soros agudos ≥ 7 dias de sintomas; B: soros convalescentes e S: soros de indivíduos sadios do banco de sangue.

Na **figura 10** abaixo, é mostrado o gráfico Scatter, comparando a mensuração de imunoglobulinas IgM entre os ELISAs da Biomanguinhos e da Panbio. A correlação entre os resultados obtidos pelos dois ELISAs avaliados mostrou-se forte, com um coeficiente de correlação de Pearson (r) igual a 0,729. Na **tabela 8**, é mostrado a concordância entre os pares de testes avaliados, e pode-se observar que a concordância entre os ELISAs foi de 87%, com um índice kappa igual a 0,73, indicando uma ótima concordância entre estes testes.

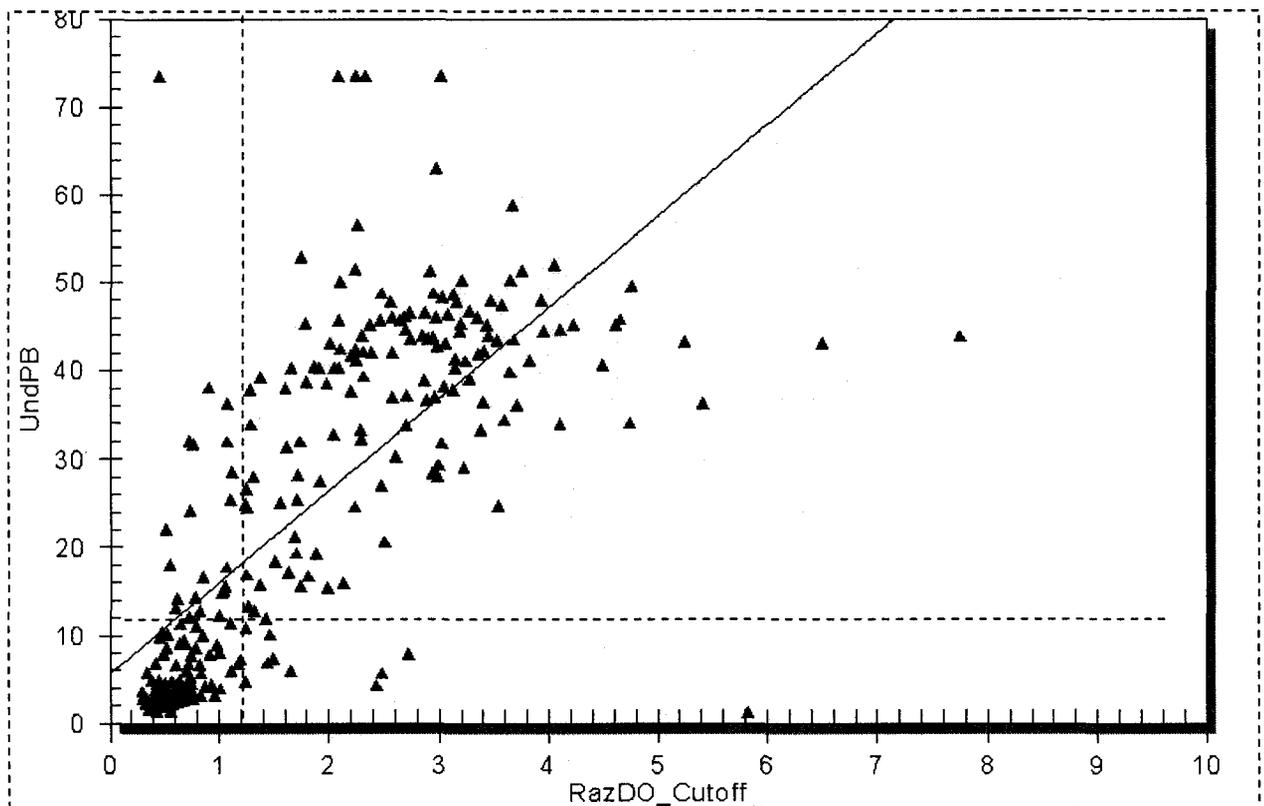


Figura 10. Scatter gráfico comparando a mensuração de anticorpos IgM anti-leptospira pelo ELISA de captura IgM da Panbio (EIE PB) e pelo ELISA IgM da Biomanguinhos (EIE BM). O eixo das abcissas (x) corresponde a razão da densidade óptica (DO) das amostras pela DO do *cut of*, medidos pelo EIE BM. O eixo das ordenadas (y) representa o valor da unidade Panbio, ou seja, a razão entre a DO das amostras pela DO do *cut of* multiplicado por 10.

A concordância entre os testes rápidos e o teste diagnóstico “padrão-ouro” (MAT) para as amostras de fase aguda são mostradas na **tabela 7**. A concordância observada na fase aguda com menos que 7 dias de sintomas variou de 68,5% para o DipSTick até 84% para o Lateral Flow. O DipSTick foi o único teste que apresentou pobre concordância na fase aguda com < 7 dias de sintomas ($k=0.34$, $Z=5.54$, $p=0.000$), enquanto que os demais ensaios mostraram concordância de moderada (k entre 0.41 a 0.60) a boa ($k \geq 0.61$). Na fase aguda randomizada, a concordância observada variou de 85% no DipSTick a 89,1% no Lateral Flow. Nesta fase, a concordância foi considerada boa em todos os testes ($k \geq 0.61$). Na fase aguda com mais de 7 dias de sintomas, a concordância também foi considerada como boa entre os testes avaliados e o MAT ($k \geq 0.61$), variando de 91,1% no ELISA da Panbio até 95,1% no DipSTick (**tabela 7**).

Tabela 7. Concordância dos ensaios sorológicos com o MAT na fase aguda da doença.

Teste sorológico	Grupo pacientes Fase aguda	Nº de amostras testadas	Concordância Observada (%)	^a Valor kappa	Valor Z	p
LF	Randomizados	95	89,1	0.78	10.45	0.000
	< 7 dias sintomas	70	84,0	0.67	8.46	0.000
	≥ 7 dias sintomas	65	92,4	0.85	10.20	0.000
Dot	Randomizados	95	86,9	0.74	9.92	0.000
	< 7 dias sintomas	70	74,0	0.46	6.27	0.000
	≥ 7 dias sintomas	65	93,8	0.87	10.53	0.000
DPS	Randomizados	94	85,0	0.70	9.70	0.000
	< 7 dias sintomas	70	68,5	0.34	5.54	0.000
	≥ 7 dias sintomas	64	95,1	0.90	10.82	0.000
EIE BM	Randomizados	96	86,4	0.73	9.84	0.000
	< 7 dias sintomas	72	75,7	0.50	6.72	0.000
	≥ 7 dias sintomas	66	93,8	0.87	10.58	0.000
EIE PB	Randomizados	96	87,5	0.75	9.93	0.000
	< 7 dias sintomas	72	77,6	0.55	6.86	0.000
	≥ 7 dias sintomas	66	91,1	0.82	9.98	0.000

^a O valor de Kappa ≥ 0.61 é considerado boa concordância; uma correlação de 0.41 a 0.60 é considerado como moderada e quando inferior a 0.41 é considerada como pobre a concordância.

Quando os testes avaliados: Lateral Flow, Dri-Dot, DipSTick e ELISAs da Biomanguinhos e da Panbio foram comparados dois a dois, a concordância entre estas combinações mostraram-se boa, variando desde 83.8% para o par Lateral Flow e ELISA Biomanguinhos ($k=0.67$, $Z=10.92$, $p=0.000$), a 94% para o par DipSTick e Dri-Dot ($k=0.88$, $Z=14.33$, $p=0.000$) (**tabela 8**). Nenhum dos pares de ensaios rápidos apresentou pobre concordância ($kappa < 0.40$).

Tabela 8. Concordância entre ensaios sorológicos na detecção de anticorpos contra leptospira.

^a Teste sorológico	Nº soros testados Coincidentes	Concordância observada (%)	^b Valor kappa	Valor de Z	p
LF e Dot	260	85,8	0,71	11.51	0.000
LF e DPS	265	87,2	0,74	12.20	0.000
DPS e Dot	265	94,0	0,88	14.33	0.000
LF e EIE BM	266	83,8	0.67	10.92	0.000
LF e EIE PB	266	89,0	0.77	12.66	0.000
Dot e EIE BM	266	87.6	0.75	12.25	0.000
Dot e EIE PB	266	86.8	0.73	12.14	0.000
DPS e EIE BM	265	88,3	0,77	12.54	0.000
DPS e EIE PB	265	88,3	0.76	12.77	0.000
EIE BM e EIE PB	268	87,0	0.73	12.06	0.000

^a LF: Lateral Flow da Zephyr; Dot: teste Dri Dot de aglutinação em Látex da Biomeriêux; DPS: teste Dip-S-Tick imunocromatográfico da Panbio; EIE BM: ELISA Biomanguinhos IgM; EIE PB: ELISA Panbio IgM.

^b O valor de Kappa ≥ 0.61 é considerado boa concordância; uma correlação de 0.41 a 0.60 é considerado como moderada e quando inferior a 0.41 é considerada como pobre a concordância.

6. DISCUSSÃO

A ocorrência de casos de leptospirose é significativamente maior em países de regiões tropicais e subtropicais. Nos países pobres, o período de chuvas associadas às enchentes e o crescente número de favelas nas regiões urbanas, associados às condições precárias de saneamento básico são fatores importantes que contribuem anualmente para o surgimento de casos de leptospirose. Entre os casos da doença, cerca de 5 a 15% progridem para a forma grave de leptospirose, com uma taxa de letalidade que pode chegar a 40%. No Brasil, no período de 1985 a 2003 foram notificados cerca de 54.000 casos de leptospirose com uma taxa de letalidade de 12% (<http://portal.saude.gov.br/portal/svs/area>). A rapidez no diagnóstico e a implementação de medidas terapêuticas e preventivas, contribuem para a redução da morbidade e mortalidade, bem como a redução da gravidade da doença.

O diagnóstico laboratorial para a leptospirose é de grande importância, uma vez que a doença apresenta manifestações clínicas polimórficas, semelhantes às de muitas outras doenças, como hepatites, sífilis, influenza, etc. Entretanto, poucos laboratórios disponibilizam das técnicas utilizadas no diagnóstico da leptospirose. O teste de microaglutinação (MAT) e o isolamento em cultura, que são as metodologia consideradas padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (OMS), são geralmente usadas em laboratórios de saúde pública (LACENs) e centros de referência para a doença. Muitas regiões no Brasil não dispõem de laboratórios de saúde pública e têm dificuldade para enviar amostras biológicas aos laboratórios de referência.

Como alternativa ao diagnóstico da leptospirose, outras metodologias para o diagnóstico que são menos complexas e mais rápidas têm sido desenvolvidas e avaliadas em vários centros de pesquisa no mundo. A identificação de fatores antigênicos de leptospiras, como as lipoproteínas de membrana e LPS, e a purificação de anticorpos monoclonais específicos contra determinado antígeno de leptospira, tem fortemente contribuído para o desenvolvimento de testes diagnósticos nos mais variados formatos, como os ELISAs, os ensaios imunocromatográficos, testes de macroaglutinação como o Látex dridot, entre outros. Entretanto, uma grande variabilidade na sensibilidade e especificidade tem sido observada para muitos destes testes. A larga diversidade antigênica acerca das leptospiras patogênicas é um dos principais fatores de complicação no desenvolvimento de testes sorológicos.

O rápido diagnóstico da leptospirose é extremamente importante, porque a antibioticoterapia se torna mais efetiva quando iniciada precocemente. Assim, neste trabalho, avaliamos o desempenho de cinco testes para o diagnóstico da leptospirose aguda, sendo três testes rápidos (Lateral flow, Dri-dot e Dipstick) e dois testes no formato imunoenzimático (ELISA).

Analisando alguns dados epidemiológicos (sexo e idade) e achados laboratoriais dos casos confirmados que participaram deste estudo (**tabela 4**), observamos que no grupo de amostras agudas de indivíduos que tinham menos de 7 dias de sintomas, o sexo masculino representou a maioria (96%) dos indivíduos, com média de idade de 30,3 (± 11). No grupo de indivíduos com 7 dias ou mais de sintomas, o sexo masculino também representou a maioria (86%) dos indivíduos, com média de idade de 36,5 (± 12). Estudo realizado por Ko *e cols* em 1999, mostrou predominância de indivíduos adultos do sexo masculino (79,8%) com média de idade de 35,9 ($\pm 15,9$) para os casos confirmados de leptospirose, entretanto nenhum estudo mostrou ainda a existência de diferença de susceptibilidade entre os sexos. Porém, muitos trabalhos têm mostrado que a doença ocorre predominantemente no sexo masculino (KO *et al.* 1999; OOTEMAN *et al.* 2006).

O espectro de sintomas clínicos da leptospirose é amplo, e estende-se desde uma doença oligosintomática a síndrome de Weil, que é caracterizada por suas manifestações clássicas como a febre, icterícia e insuficiência renal. A maioria dos casos agudos de leptospirose (< 7 dias e \geq 7 dias de sintomas) apresentou como principais sinais e sintomas, a febre (>95% dos casos) e a icterícia (>83% dos casos). A sufusão conjutival, um sinal diagnóstico específico para leptospirose, foi identificado em 42% dos 50 casos observados com < de 7 dias de sintomas, e em 48% dos 48 casos observados com mais de 7 dias de sintomas. Foi observado também que 5% dos casos agudos apresentaram hemorragia pulmonar. Ko *e cols*, em 1999, mostraram também que febre (93,6%) e icterícia (90,8%) acometiam a maioria dos casos de leptospirose, e a sufusão conjutival acometia cerca de 21,8% dos casos da doença. Os sintomas encontrados neste trabalho corroboram com os principais sintomas característicos da leptospirose aguda descritos na literatura, tais como febre, cefaléia, mialgia e sufusão conjutival. A resolução dos sintomas pode coincidir com a fase imune da doença, que é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos específicos no sangue acompanhado pela excreção de leptospiras na urina, entretanto a febre

pode recorrer após uma remissão de 3 a 4 dias, que pode provocar confusão clínica na distinção da leptospirose de outras doenças febris (LEVETT 2001; BHARTI *et al.* 2003).

Na leptospirose grave, observa-se comumente uma contagem elevada de células com elevada sedimentação eritrocítica; leucocitose com leve desvio para esquerda; função hepática com ligeira elevação das transaminases (TGO e TGP), bilirrubina, e fosfatase alcalina e função renal com aumento dos níveis de creatinina sérica (LEVETT 2001). Neste trabalho, mostramos valores médios elevados na contagem dos leucócitos e nas dosagens de TGO, TGP, uréia e creatinina sérica, característicos da leptospirose na fase aguda.

Acerca dos indicadores de desempenho avaliados, a sensibilidade para os soros de fase aguda randomizados variou de 68,8% no MAT a 87,5% no ELISA Panbio. O DipSTick foi o ensaio rápido de menor sensibilidade (72,3%) para esta fase. A maioria dos testes foi particularmente pouco sensível quando amostras de soros com menos de 1 semana de sintomas foram testadas, sendo que o Lateral Flow apresentou a melhor sensibilidade (71,4%). O Lateral Flow e o Dri-Dot tiveram mesma sensibilidade (50%) no intervalo de 2 a 4 dias de sintomas, entretanto, a sensibilidade no intervalo de 5 a 7 dias de início de sintomas foi maior para o Lateral flow (86,2%). Na fase convalescente, a sensibilidade dos testes rápidos foi relativamente alta, variando de 80% a 96%, enquanto que o MAT apresentou a melhor sensibilidade (100%). Este aumento gradativo da sensibilidade já era esperado, pois na maioria das infecções por *Leptospiras*, os títulos de anticorpos apresentam níveis detectáveis cerca de 5 a 10 dias após início dos sintomas (WHO 1999).

No teste de microaglutinação (MAT), ambos os anticorpos da classe IgM e IgG aglutinam-se com os antígenos específicos, principalmente quando os soros analisados foram coletados na fase convalescente da doença. Testes que detectam anticorpos específicos da classe IgM, apresentam sensibilidade e especificidade mais baixa quando comparado com o MAT (SMITS *et al.* 2000), entretanto, na fase mais precoce da doença (< 7 dias de sintomas), foi mostrado que os ensaios que detectam anticorpos IgM específicos apresentaram melhor sensibilidade quando comparados ao MAT. As baixas proporções de sensibilidade encontradas durante a primeira semana da doença e o crescimento destas taxas na segunda semana em diante, reflete de certa forma as fases da doença, sendo a fase septicêmica na qual encontramos leptospirosas circulantes caracterizando a primeira semana, e a fase imune na qual ocorre a

produção e detecção de anticorpos caracterizando a segunda semana em diante da doença (LEVETT 2001; BHARTI *et al.* 2003; OOTEMAN *et al.* 2006).

Estudos prévios têm relatado sensibilidade dos ensaios rápidos variando de 35% a 86% para soros de fase aguda, e 67% a 100% para soros de fase convalescente (SMITS *et al.* 2000; BAJANI *et al.* 2003). O Lateral Flow têm demonstrado boa sensibilidade (cerca de 70%) quando testado com amostras de soro coletadas durante a primeira semana (≤ 7 dias) do início dos sintomas (SMITS *et al.* 2000; SEHGAL *et al.* 2003).

Ensaio como ELISA-IgM, DipSTick e Dri-Dot têm mostrado sensibilidade muito baixa ($< 68\%$) em soros com até 7 dias de início da doença (GUSSENHOVEN *et al.* 1997; SMITS *et al.* 2000; VIJAYACHARI *et al.* 2002; SEHGAL *et al.* 2003). Vijayachari *et al.* em 2002 relataram nos intervalos de 2 a 3 dias; 4 a 5 dias e 6 a 7 dias de início dos sintomas, sensibilidade de 53,1%, 75% e 83,3%, respectivamente, para um ensaio de Látex (Dri-Dot), e sensibilidade de 28,1%, 54% e 77,8%, respectivamente, para um IgM ELISA. Neste estudo, mostrou-se que nos intervalos 2 a 4 dias e 5 a 7 dias de sintomas, a sensibilidade foi de 50% e 56,9% para o Dri-Dot, respectivamente. Para os mesmos intervalos, houve uma variação de 44% a 78% para os ELISAs IgM analisados (**figura 3**). Para o MAT, têm sido relatado sensibilidade de 35% para fase aguda e 94% na fase convalescente (SMITS *et al.* 2000; LEVETT *et al.* 2001). A especificidade relatada para o MAT é de 97% e para os ensaios rápidos de 89% a 98% (BAJANI *et al.* 2003). O MAT é considerado o teste padrão ouro contra o qual são comparados os outros ensaios avaliados (WHO 1999). Na **figura 11**, Bajani *et al.* em 2003, ao avaliarem os testes ELISA IgM, hemaglutinação indireta (IHA), lateral flow (LDS), dip-s-tick (DST) e o MAT, mostraram um perfil de crescimento da sensibilidade muito parecido com o perfil encontrado em nosso trabalho.

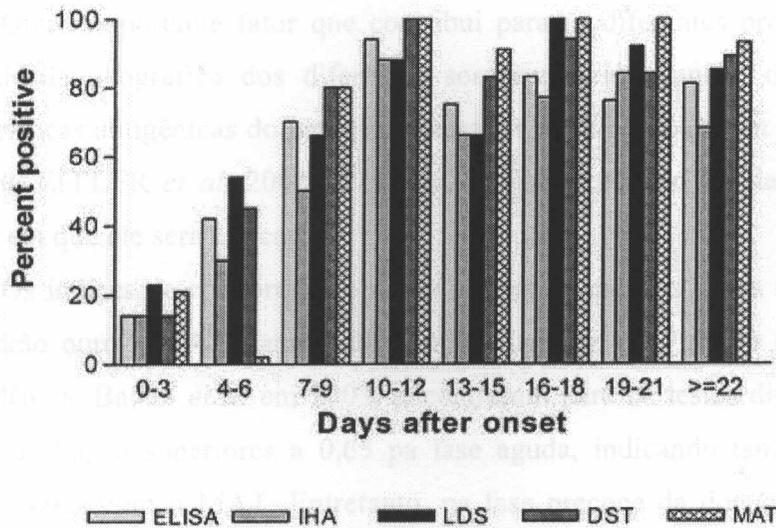


Figura 11. Aumento gradativo da sensibilidade no decorrer dos dias de sintomas. Adaptado de Bajani *et al*, 2003.

Geralmente, na fase precoce da leptospirose (primeira semana), os níveis de anticorpos específicos ainda é muito baixo e é possível detectar leptospiras circulantes em amostras de sangue e líquido cefaloraquidiano (LCR), caracterizando a chamada fase septicêmica da leptospirose (LEVETT 2001). Isso certamente seria uma possível explicação para a baixa sensibilidade de alguns testes sorológicos nesta fase. A partir da segunda semana em diante, já é possível se detectar níveis elevados de anticorpos específicos, caracterizando a fase imune da doença, e fica cada vez mais difícil de isolar leptospiras em cultura de sangue ou de LCR (BAJANI *et al*. 2003). Na fase imune, testes sorológicos apresentam melhor sensibilidade.

A variabilidade na sensibilidade dos testes rápidos, observada nos diversos estudos, pode ocorrer devido a diferentes definições de casos abordados nos estudos. Alguns utilizam como teste padrão ouro na definição de casos a cultura e/ou o MAT (EFFLER *et al*. 2000; EFFLER *et al*. 2002; BAJANI *et al*. 2003). Além disso, a metodologia usada para selecionar os casos e o grupo controle também pode influenciar nos resultados (EFFLER *et al*. 2000).

No presente trabalho, os casos participantes representavam pacientes com suspeita de leptospirose, que foram internados no hospital e foram confirmados pelo teste de microaglutinação (MAT), considerado “padrão ouro”. Todos os casos residiam em região endêmica para Leptospiriose.

Outro importante fator que contribui para as diferentes probabilidades encontradas é a variabilidade geográfica dos diferentes sorogrupos infectantes, ou seja, a variabilidade das características antigênicas do patógeno causador da infecção de um local para outro (EFFLER *et al.* 2000; EFFLER *et al.* 2002). Por isso, se faz necessário validar a acurácia de um teste no cenário em que ele será aplicado.

Os índices de concordância determinados quando os testes avaliados foram comparados ao “padrão ouro” (MAT), apresentou kappa superior a 0,70 para a fase aguda, indicando boa concordância. Bajani *et al* em 2003, encontraram para os testes dipstick, lateral flow e ELISA valores de kappa superiores a 0,65 pa fase aguda, indicando também uma boa concordância destes ensaios com o MAT. Entretanto, na fase precoce da doença (até 10 dias de sintomas), Seghal *et al* em 2003 mostrou para os mesmos testes uma concordância que variava entre pobre a moderada, com índice kappa inferior a 0,45. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho, onde a concordância para a fase com menos de 7 dias de sintomas variou entre pobre a moderada, com índice kappa inferior a 0,55, exceto para o teste lateral flow, que apresentou a melhor concordância nesta fase, com um kappa igual a 0,67.

Na Leptospirose grave, a taxa de letalidade é alta, variando entre 5-15%, e apresenta como importantes causas de morte a insuficiência renal aguda e cardiopulmonar (WHO 1999; BHARTI *et al.* 2003). Sendo assim, os cuidados médicos e tratamentos apropriados tornam-se efetivos quando iniciados na fase precoce da doença. Por isso, existe grande necessidade na validação de testes diagnósticos rápidos, que apresentem boa sensibilidade e especificidade, que possam reconhecer a leptospirose ainda em sua fase precoce, e que não necessitem de equipamentos caros e profissionais treinados. Neste estudo, o teste Lateral Flow mostrou-se o mais sensível e específico na detecção dos casos na fase precoce da doença (< 1 semana de sintomas), quando comparado com o MAT e com os outros testes rápidos. Entretanto, a avaliação do Lateral Flow em amostras de populações de outras regiões é muito importante.

Os resultados encontrados neste trabalho caracterizaram bem o desempenho dos testes avaliados. Entretanto, vale ressaltar a importância de se avaliar o desempenho dos ensaios com amostras de soros confirmadas para outras patologias, como dengue, hepatite e sífilis. Esta avaliação fornecerá dados sobre a presença de reatividade cruzada dos ensaios. No presente trabalho, não foi possível realizar esta avaliação devido a quantidade insuficiente dos testes doados.

7. CONCLUSÃO

1. Nas amostras analisadas, o teste Lateral Flow mostrou melhor sensibilidade como ensaio de triagem de casos de Leptospirose na fase aguda precoce da doença (< 7 dias de sintomas), embora sua sensibilidade não diferisse significativamente da sensibilidade do teste Dri-Dot no intervalo de 2 a 4 dias de sintomas.
2. O Lateral Flow foi o único teste que apresentou a melhor concordância quando comparado ao teste padrão ouro (MAT), na triagem de casos de Leptospirose na fase aguda precoce da doença. Na fase aguda com 7 dias ou mais de início dos sintomas, todos os ensaios apresentaram boa concordância com o MAT.
3. Em amostras de fase aguda com 7 dias ou mais de sintomas, os testes Dri-Dot, ELISA IgM Biomanguinhos e ELISA IgM Panbio, mostraram melhor sensibilidade (>90%), enquanto que na fase convalescente, foram os ELISAs IgM e o teste de microaglutinação (MAT) que apresentaram melhor sensibilidade.
4. Os testes avaliados, com exceção do ELISA IgM Panbio, apresentaram boa especificidade (>90%).
5. Os resultados apresentados neste estudo são válidos apenas para amostras provenientes da região de Salvador-BA, destacando assim, a importância de se avaliar os testes no cenário onde eles serão utilizados.

8. LIMITAÇÕES

- ✓ Em decorrência do número insuficiente de kits diagnósticos doados, não foi possível avaliar um número maior de amostras, bem como avaliar a reatividade cruzada para outras patologias.

- ✓ Por não se tratar de um estudo populacional, sendo que as amostras aqui analisadas foram randomicamente escolhidas e não refletem a distribuição real da doença na população, e por não ter sido ainda determinado a real prevalência da doença na região de estudo, não pudemos determinar os valores preditivos positivo e negativo neste estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO *Leptospirosis worldwide, 1999*. Wkly Epidemiol Rec **74**(29): 237-42, 1999.
2. VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SEHGAL, S. C. *Evaluation of Lepto Dri Dot as a rapid test for the diagnosis of leptospirosis*. Epidemiol Infect **129**(3): 617-21, 2002.
3. FARR, R. W. *Leptospirosis*. Clin Infect Dis **21**(1): 1-6; quiz 7-8, 1995.
4. KO, A. I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D., JR.; RILEY, L. W. *Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group*. Lancet **354**(9181): 820-5, 1999.
5. LEVETT, P. N. *Leptospirosis*. Clin Microbiol Rev **14**(2): 296-326, 2001.
6. NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. *Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni*. Braz J Med Biol Res **37**(4): 459-77, 2004.
7. NATARAJASEENIVASAN, K.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. *Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis*. Indian J Med Res **120**(3): 151-9, 2004.
8. FAINE, S. *Leptospira and Leptospirosis*. 2° ed. Melbourne, Australia. 1999.
9. MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. *Identification of variable-number tandem-repeat loci in Leptospira interrogans sensu stricto*. J Clin Microbiol **43**(2): 539-45, 2005.
10. HAAKE, D. A.; DUNDOO, M.; CADER, R.; KUBAK, B. M.; HARTSKEERL, R. A.; SEJVAR, J. J.; ASHFORD, D. A. *Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis*. Clin Infect Dis **34**(9): e40-3, 2002.
11. MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BRUCE, M.; BOLIN, C. A.; AUSTIN, C. C.; WOODS, C. W.; LINGAPPA, J.; LANGKOP, C.; DAVIS, B.; GRAHAM, D. R.; PROCTOR, M.; ASHFORD, D. A.; BAJANI, M.; BRAGG, S. L.;

- SHUTT, K.; PERKINS, B. A.; TAPPERO, J. W. *Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998*. Clin Infect Dis **34**(12): 1593-9, 2002.
12. MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Leptospirosis*. Curr Opin Infect Dis **18**(5): 376-86, 2005.
 13. PLANK, R.; DEAN, D. *Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans*. Microbes Infect **2**(10): 1265-76, 2000.
 14. NATARAJASEENIVASAN, K.; PRABHU, N.; SELVANAYAKI, K.; RAJA, S. S.; RATNAM, S. *Human leptospirosis in Erode, South India: serology, isolation, and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting*. Jpn J Infect Dis **57**(5): 193-7, 2004.
 15. TREVEJO, R. T.; RIGAU-PEREZ, J. G.; ASHFORD, D. A.; MCCLURE, E. M.; JARQUIN-GONZALEZ, C.; AMADOR, J. J.; DE LOS REYES, J. O.; GONZALEZ, A.; ZAKI, S. R.; SHIEH, W. J.; MCLEAN, R. G.; NASCI, R. S.; WEYANT, R. S.; BOLIN, C. A.; BRAGG, S. L.; PERKINS, B. A.; SPIEGEL, R. A. *Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995*. J Infect Dis **178**(5): 1457-63, 1998.
 16. BHARADWAJ, R.; BAL, A. M.; JOSHI, S. A.; KAGAL, A.; POL, S. S.; GARAD, G.; ARJUNWADKAR, V.; KATTI, R. *An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India*. Jpn J Infect Dis **55**(6): 194-6, 2002.
 17. VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; MURHEKAR, M. V.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. *Leptospirosis among schoolchildren of the Andaman & Nicobar Islands, India: low levels of morbidity and mortality among pre-exposed children during an epidemic*. Epidemiol Infect **132**(6): 1115-20, 2004.
 18. KUPEK, E.; DE SOUSA SANTOS FAVERSANI, M. C.; DE SOUZA PHILIPPI, J. M. *The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996*. Braz J Infect Dis **4**(3): 131-4, 2000.
 19. BARCELLOS, C.; SABROZA, P. C. *The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro*. Cad Saude Publica **17 Suppl**: 59-67, 2001.

20. COSTA, E.; COSTA, Y. A.; LOPES, A. A.; SACRAMENTO, E.; BINA, J. C. [*Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects*]. Rev Soc Bras Med Trop **34**(3): 261-7, 2001.
21. DE FIGUEIREDO, C. M.; MOURAO, A. C.; DE OLIVEIRA, M. A.; ALVES, W. R.; OOTEMAN, M. C.; CHAMONE, C. B.; KOURY, M. C. [*Human leptospirosis in Belo Horizonte City, Minas Gerais, Brazil: a geographic approach*]. Rev Soc Bras Med Trop **34**(4): 331-8, 2001.
22. ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C.; YASUDA, P. H. *Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo **45**(5): 245-8, 2003.
23. TASSINARI, W. S.; PELLEGRINI, D. C. P.; SABROZA, P. C.; CARVALHO, M. S. *Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil*. Cad Saude Publica **20**: 1721-1729, 2004.
24. VINETZ, J. M. *Leptospirosis*. Curr Opin Infect Dis **14**(5): 527-38, 2001.
25. NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. *Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis*. J Bacteriol **186**(7): 2164-72, 2004.
26. HALOTA, W.; LAPNIEWSKA, E.; OPOKA, J. [*Epidemiologic and clinical aspects of leptospirosis with reference to personal observations*]. Pol Tyg Lek **47**(36-37): 796-7, 1992.
27. MAROTTO, P. C.; NASCIMENTO, C. M.; ELUF-NETO, J.; MAROTTO, M. S.; ANDRADE, L.; SZTAJNBOK, J.; SEGURO, A. C. *Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality*. Clin Infect Dis **29**(6): 1561-3, 1999.

28. VIJAYACHARI, P.; AHMED, N.; SUGUNAN, A. P.; GHOSUNNISSA, S.; RAO, K. R.; HASNAIN, S. E.; SEHGAL, S. C. *Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India.* J Clin Microbiol **42**(8): 3575-80, 2004.
29. SEGURA, E. R.; GANOZA, C. A.; CAMPOS, K.; RICARDI, J. N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CESPEDES, M. J.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; LOPEZ LINAN, R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R. H.; VINETZ, J. M. *Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden.* Clin Infect Dis **40**(3): 343-51, 2005.
30. VIJAYACHARI, P.; SEHGAL, S. C.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. *Leptospira interrogans serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands.* J Med Microbiol **52**(Pt 10): 913-8, 2003.
31. SIMPSON, F. G.; GREEN, K. A.; HAUG, G. J.; BROOKES, D. L. *Leptospirosis associated with severe pulmonary haemorrhage in Far North Queensland.* Med J Aust **169**(3): 151-3, 1998.
32. HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins.* Infect Immun **70**(9): 4936-45, 2002.
33. CINCO, M.; BANFI, E.; SORANZO, M. R. *Studies on the interaction between macrophages and leptospire.* J Gen Microbiol **124**(2): 409-13, 1981.
34. CINCO, M.; VECILE, E.; MURGIA, R.; DOBRINA, P.; DOBRINA, A. *Leptospira interrogans and Leptospira peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes.* FEMS Microbiol Lett **138**(2-3): 211-4, 1996.
35. SAMBSIAVA, R. R.; NAVEEN, G.; P, B.; AGARWAL, S. K. *Leptospirosis in India and the rest of the world.* Braz J Infect Dis **7**(3): 178-93, 2003.
36. HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. *The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection.* Infect Immun **68**(4): 2276-85, 2000.

37. YANG, H. L.; JIANG, X. C.; ZHANG, X. Y.; LI, W. J.; HU, B. Y.; ZHAO, G. P.; GUO, X. K. *Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation.* BMC Infect Dis **6**: 19, 2006.
38. VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F. *Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of Leptospira interrogans.* Infect Immun **74**(7): 4172-9, 2006.
39. ALTAVA, V.; BARRERA, M.; MARIN, C.; VILLALONGA, I.; GIL, P. *[Some epidemiologic aspects of leptospirosis in the rice fields of Castellion.]* Med Esp **30**(176): 386-7, 1953.
40. BROWN, R. A.; BLUMERMAN, S.; GAY, C.; BOLIN, C.; DUBY, R.; BALDWIN, C. L. *Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo.* Vaccine **21**(27-30): 4448-58, 2003.
41. TAJIKI, H.; SALOMAO, R. *Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis.* Clin Infect Dis **23**(5): 1177-8, 1996.
42. DORIGATTI, F.; BRUNIALTI, M. K.; ROMERO, E. C.; KALLAS, E. G.; SALOMAO, R. *Leptospira interrogans activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6.* Braz J Med Biol Res **38**(6): 909-14, 2005.
43. DE FOST, M.; HARTSKEERL, R. A.; GROENENDIJK, M. R.; VAN DER POLL, T. *Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with Leptospira interrogans.* Clin Diagn Lab Immunol **10**(2): 332-5, 2003.
44. HAAKE, D. A. *Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis.* Microbiology **146** (Pt 7): 1491-504, 2000.
45. GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO REIS, M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. *Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans.* Infect Immun **69**(8): 4958-68, 2001.

46. CAMARGO, E. D.; DA SILVA, M. V.; BATISTA, L.; VAZ, A. J.; SAKATA, E. E. [*An evaluation of the ELISA-IgM test in the early diagnosis of human leptospirosis*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo **34**(4): 355-7, 1992.
47. BROWN, P. D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. *Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis*. J Med Microbiol **43**(2): 110-4, 1995.
48. OOTEMAN, M. C.; VAGO, A. R.; KOURY, M. C. *Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis*. J Microbiol Methods **65**(2): 247-57, 2006.
49. LEVETT, P. N.; WHITTINGTON, C. U. *Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis*. J Clin Microbiol **36**(1): 11-4, 1998.
50. LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L.; WHITTINGTON, C. U.; EDWARDS, C. N.; PAXTON, H. *Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis*. Clin Diagn Lab Immunol **8**(2): 349-51, 2001.
51. BAJANI, M. D.; ASHFORD, D. A.; BRAGG, S. L.; WOODS, C. W.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; PLIKAYTIS, B. D.; PERKINS, B. A.; PHELAN, M.; LEVETT, P. N.; WEYANT, R. S. *Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis*. J Clin Microbiol **41**(2): 803-9, 2003.
52. BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Lancet Infect Dis **3**(12): 757-71, 2003.
53. VOLINA, E. G.; MEL'NITSKAIA, E. V.; BERNASOVSKAIA, E. P.; KIKTENKO, V. S.; ARIMITSU, Y.; KOBAYACHI, S. [*A comparative evaluation of the sensitivity of different methods for the serological diagnosis of leptospirosis*]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(12): 73-7, 1990.
54. LUCCHESI, P. M.; ARROYO, G. H.; ETCHEVERRIA, A. I.; PARMA, A. E.; SEIJO, A. C. *Recommendations for the detection of Leptospira in urine by PCR*. Rev Soc Bras Med Trop **37**(2): 131-4, 2004.

55. PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. *Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire*s. *Mol Cell Probes* **19**(2): 111-7, 2005.
56. CINCO, M.; BALANZIN, D.; BANFI, E. *Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy*. *Eur J Epidemiol* **8**(5): 677-82, 1992.
57. FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. *Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis*. *J Clin Microbiol* **39**(9): 3303-10, 2001.
58. VITALE, G.; LA RUSSA, C.; GALIOTO, A.; CHIFARI, N.; MOCCIARO, C.; CARUSO, R.; MICALIZZI, A.; MANSUETO, P.; DI ROSA, S.; MANSUETO, S. *Evaluation of an IgM-ELISA test for the diagnosis of human leptospirosis*. *New Microbiol* **27**(2): 149-54, 2004.
59. SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; UMAPATHI, T. *Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis*. *J Med Microbiol* **52**(Pt 10): 897-901, 2003.
60. HULL-JACKSON, C.; GLASS, M. B.; ARI, M. D.; BRAGG, S. L.; BRANCH, S. L.; WHITTINGTON, C. U.; EDWARDS, C. N.; LEVETT, P. N. *Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis*. *J Clin Microbiol* **44**(5): 1853-5, 2006.
61. YERSIN, C.; BOVET, P.; SMITS, H. L.; PEROLAT, P. *Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles*. *Trop Med Int Health* **4**(1): 38-45, 1999.
62. EFFLER, P. V.; DOMEN, H. Y.; BRAGG, S. L.; AYE, T.; SASAKI, D. M. *Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii*. *J Clin Microbiol* **38**(3): 1081-4, 2000.
63. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. *The measurement of observer agreement for categorical data*. *Biometrics* **33**(1): 159-74, 1977.

64. KRAEMER, H. C.; BLOCH, D. A. *Kappa coefficients in epidemiology: an appraisal of a reappraisal*. J Clin Epidemiol **41**(10): 959-68, 1988.
65. SMITS, H. L.; HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. *International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis*. Trop Med Int Health **5**(2): 124-8, 2000.
66. GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. *LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera*. J Clin Microbiol **35**(1): 92-7, 1997.
67. EFFLER, P. V.; BOGARD, A. K.; DOMEN, H. Y.; KATZ, A. R.; HIGA, H. Y.; SASAKI, D. M. *Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii*. J Clin Microbiol **40**(4): 1464-9, 2002.

10. ANEXOS

10.1. MODELO DO QUESTIONÁRIO DE DADOS PESSOAIS DO PACIENTE

Estudo de Leptospirose em Salvador – Bahia

Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDIND	DCDIND	DGIND	DDGIND	DG2IND	DDG2IND

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PACIENTE, ESTE QUESTIONÁRIO DEVE RÁ SER DESTACADA PELO GESTOR DO PROJETO OU INVESTIGADOR PRINCIPAL DEPOIS DA ENTREVISTA E ANTES QUE OS DADOS SEJAM DIGITADOS. TODOS OS QUESTIONARIO DO MESMO PACIENTE DEVEM TER UM NUMERO DE IDENTIFICAÇÃO UNICO (VIGI)

Data da Entrevista:	DEIND
Iniciais do Entrevistador:	EIND

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nº Identificação VIGI:	VIGI
1.2	No. de Registro no HC Maia:	REG
1.2	Termo de consentimento: Sim : <input checked="" type="checkbox"/> Não : <input type="checkbox"/>	CONS

2.1	Nome:	NOME
2.2	Apelido:	APE
2.5	Telefone (nº e nome de contato):	TEL

II. ENDEREÇO:

5.1	Rua / Nº:	END
5.2	Ponto de Referencia:	REF
5.3	Bairro:	BAI
5.4	Cidade:	CID
5.5	Mora em Pau da Lima/São Marcos Sim : <input checked="" type="checkbox"/> Não : <input type="checkbox"/>	PLM
5.6	Mora no Subúrbio Ferroviário Sim : <input checked="" type="checkbox"/> Não : <input type="checkbox"/>	SUF

10.2. MODELO DO QUESTIONÁRIO DE DADOS SOBRE A APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO PACIENTE

PARTE 1 DO QUESTIONÁRIO:

Estudo de Leptospirose em Salvador – Bahia:						
Apresentação clínica e diagnósticos microbiológico						
Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDEPI	DCDEPI	DGEPI	DDGEPI	DG2EPI	DDG2EPI

Data da Entrevista:	DEEPI
Iniciais do Entrevistador:	EEPI

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Data de admissão no HCM:	DOA
1.2	Nº de registro no HCM:	REG
1.3	Idade:	AGE
1.4	Data de nascimento:	DATANASC
1.5	Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> 1 Feminino <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	SEX

II. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTORIA PREVIA:

2.1	Dias com sintomas: (999=não sabe)	DCS
2.2	Febre: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	FEB
2.3	TAS: (999= não sabe)	TAS
2.4	Icterícia: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	ICA
2.5	Sufusão Conjuntival: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	SUFC
2.6	Dispénia: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	MDYS
2.7	Hemoptise: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	HOP
2.8	Frequência Respiratória (ipm):	FR
2.9	Oligúria Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	OLI

**III. LABORATORIAIS DAS AVALIAÇÃO INICIAL:
(999= não sabe)**

3.1	Leucócitos: (99999=não sabe) Data:	WBC WBCD
3.2	Hematócrito: (99=não sabe) Data:	HTC HTCD
3.3	Plaquetas: (999999=não sabe) Data:	PLAQ PLAQD
3.4	TGO Data:	TGO TGOD
3.5	TGP: (99999=não sabe) Data:	TGP TGPD
3.6	Uréia: (999=não sabe) Data:	UREA UREAD
3.7	Creatinina: (999=não sabe) Data:	CREA CREAD
3.8	Potássio: (9,9=não sabe) Data:	K KD
3.9	Bilirrubina indireta: (99,9=não sabe) Data:	BILI BILID
3.10	Bilirrubina direta (99,9=não sabe) Data:	BILD BILDD

PARTE 2 DO QUESTIONÁRIO:

**Estudo de Leptospirose em Salvador – Bahia:
Apresentação clínica e diagnósticos microbiológico**

Etiqueta	Codificado		1ª Digitação		2ª Digitação	
	CDEPI2	DCDEPI2	DGEPI2	DDGEPI2	DG2EPI2	DDG2EPI2

Data de Revisão:	
Iniciais do Entrevistador:	
Data de admissão no HCM:	
Nº de registro no HCM:	

DEEPI2
EPEPI2

IV. EVOLUÇÃO CLÍNICA:

4.1	Presença de complicações:						
	Hemorragia GI:	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Hemorragia Pulm	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Oligúria	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Anúria	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
4.2	Diálise:						
	Sim	<input type="text" value="1"/>		Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Sem sim, quantos dias :						
4.3	Transfusões (hemácias):						
	Sim	<input type="text" value="1"/>		Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Sem sim, quantos bolsas:						
4.4	Foi internado em UTI:						
	Sim	<input type="text" value="1"/>		Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Se Sim, quando dias :						
4.5	Fez uso de Antibiótico Beta-lactâmico						
	Sim	<input type="text" value="1"/>		Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Ampicilina:	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Penicilina	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Ceftriaxone	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>
	Outros	Sim	<input type="text" value="1"/>	Não	<input type="text" value="0"/>	Não sabe	<input type="text" value="9"/>

HEGI	<input type="text"/>
HEMP	<input type="text"/>
OLIG	<input type="text"/>
ANUR	<input type="text"/>
DIAL	<input type="text"/>
DIALD	<input type="text"/>
TRANSF	<input type="text"/>
QTRANSF	<input type="text"/>
HCMUTI	<input type="text"/>
DIAUTI	<input type="text"/>
ATB	<input type="text"/>
AMPI	<input type="text"/>
PEN	<input type="text"/>
CTX	<input type="text"/>
OATB	<input type="text"/>

**V. SUMÁRIO DE EXAMES DURANTE A HOSPITALIZAÇÃO:
(999=não sabe, 888=não se aplica)**

5.1	Maximo de uréia:
5.2	Máximo de creatinina:
5.3	Potássio: Mínimo: Máximo:
5.4	Mínimo de hematócrito:
5.5	Máximo de bilirrubina indireta:
5.6	Máximo de bilirrubina direta:
5.7	Máximo de TGO
5.8	Máximo de TGP
5.9	Mínimo de TP

MXUR
MXCR
MNK
MXK
MNHCT
MXBILI
MXBIL
MXTGO
MXTGP
MNTP

VI. ALTA: (999=não sabe, 888=não se aplica)

6.1	Diagnóstico prévio foi Leptospirose: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Se não, qual:
6.2	Tipo de alta: Alta <input type="checkbox"/> 1 Transferencia <input type="checkbox"/> 2 Óbito <input type="checkbox"/> 3 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Data da alta:
6.3	Diagnóstico final foi Leptospirose: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Se não, qual:
6.4	Evidência para outro diagnóstico final: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Se sim: qual:
6.5	Caso de Hemorragia Pulmonar: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9

DGP
DGPD
TALT
DALT
DGF
DGFD
EVI
EVID
HP