



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEPTOSPIROSE: BENEFÍCIO DE  
AMOSTRA AGUDA TARDIA NA CONFIRMAÇÃO DE CASOS**

**ANDREIA CARVALHO DOS SANTOS**

**Salvador-Bahia-Brasil**

**2011**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEPTOSPIROSE: BENEFÍCIO DE  
AMOSTRA AGUDA TARDIA NA CONFIRMAÇÃO DE CASOS**

**ANDREIA CARVALHO DOS SANTOS**

**ORIENTADOR:** Professor Doutor Guilherme de Sousa Ribeiro

Dissertação de mestrado  
apresentada ao Instituto de  
Pesquisas Gonçalo Moniz  
com objetivo de obtenção do  
título de mestre.

**Salvador-Bahia-Brasil**

**2011**

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

Santos, Andréia Carvalho dos
S237d Diagnóstico sorológico da leptospirose: benefício de amostra aguda tardia na confirmação de casos [manuscrito] / por Andréia Carvalho dos Santos – 2011.
93 f. : il. ; 29 cm
Datilografado (fotocópia)
Dissertação (mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.
Orientador: Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro. Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.
1. Leptospirose. 2. Diagnóstico sorológico. 3. ELISA. I. Título.
CDU 616.986

*Porque desde a antiguidade não se ouviu,  
nem com ouvidos se percebeu, nem com os  
olhos se viu um Deus além de ti que  
trabalha para aquele que nele espera.*

*Isaías 64:4*

## AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, pelo dom da vida, pelo amor incondicional e por estar presente em todos os momentos de minha vida.
- A minha família, pelo estímulo, força e presença em todos os momentos de minha vida, em especial a **Daniela Carvalho** e **Antônia Carvalho**.
- Agradeço ao meu pai (**Antônio Ferreira**) pelo esforço em minha educação e pelos ensinamentos que fortaleceram meu caráter.
- A minha mãe (**Luzia de Souza Carvalho**) dedico esse trabalho, mesmo não estando mais perto de mim você sempre será exemplo de mulher de caráter, trabalhadora e vitoriosa “Te amo mãe”.
- Aos meus irmãos, **Lucélia Carvalho**, **Isabela Carvalho**, **Marcos Antonio**, **Luíz Ferreira** e **Luzia Ferreira** pelos momentos de companheirismo e descontrações. Obrigada Lucélia pelas orações!
- Ao meu esposo **Ricardo Ribeiro** pelo apoio e por dividir momentos de alegria e tristeza e ao meu filho **Daniel Carvalho** pelo sorriso que me renova a cada dia.
- Aos amigos do LPBM/CPqGM pelo apoio, amizade, convívio, palavras de conforto e pelo aprendizado de trabalhar em uma equipe de compromisso e respeito.
- Aos colegas do LPBM/CPqGM **Paula Ristow**, **Cleiton Silva**, **Jailton Azevedo**, **Alcinéia Damião**, **Helena Lima**, **Jaqueline Cruz**, **Fernanda Fraga**, **Cláudio Figueira**, **Silvana Souza Paz**, **Gisele Rocha**, **Nadja Gonçalves** e todos que não estão escritos aqui mais estão presentes em meu coração.

- Aos amigos **Adriano Queiroz, Balbino Lino e Deborah Bittencourt** com quem trabalhei durante muitos anos no LPBM/CPqGM e que foram além de orientadores, amigos fiéis.
- Ao meu grande amigo **Elsio Wunder**, que me ensinou a romper barreiras e sempre acreditar em meu potencial.
- A meu orientador **Guilherme Ribeiro**, pelos ensinamentos científicos e pessoais, você foi além de um orientador, um amigo sempre presente nos momentos de dúvidas e incertezas.
- Aos mestres de minha vida científica **Mitermayer Galvão e Albert Ko**, pelos ensinamentos, apoio em momentos difíceis de minha vida e por acreditarem em mim.
- A **Dra. Eliana Reis** também dedico esse trabalho, agradeço pelo apoio em todos os 11 anos de CPqGM, pelo curso pré-vestibular que me proporcionou a entrada na faculdade, pelo amor de mãe.
- Aos professores do Curso de Biotecnologia em Medicina Investigativa/CPqGM pelos ensinamentos.
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz) pela estrutura e recursos disponíveis para realização desse trabalho.
- Ao Hospital Couto Maia por aceitar participar da realização da vigilância para leptospirose.
- A Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESB) pela bolsa de mestrado, termo de outorga (BOL0674/2010).
- Aos professores que compõe essa banca que gentilmente aceitaram avaliar este trabalho.

SANTOS, Andréia Carvalho. Diagnóstico sorológico da leptospirose: Benefício da amostra aguda tardia na confirmação dos casos. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

### **RESUMO**

A confirmação da leptospirose utilizando o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) requer amostras da fase aguda e convalescente para identificar soroconversão ou aumento de quatro vezes nos títulos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a coleta da amostra convalescente seja realizada  $\geq 14$  dias após a coleta da amostra aguda. No entanto, a dificuldade na coleta de amostras convalescentes impede a confirmação dos casos e é uma das principais causas para sub-notificação da leptospirose. Este estudo investigou a viabilidade da coleta de uma amostra de soro aguda tardia de casos internados com leptospirose e avaliou se a análise sorológica desta amostra pode melhorar a eficiência do protocolo de confirmação diagnóstica de leptospirose. De 2003 a 2009, uma vigilância hospitalar ativa em Salvador-Brasil, identificou prospectivamente pacientes hospitalizados com suspeita clínica da leptospirose. Três amostras de sangue foram coletadas para cada caso: uma amostra aguda precoce, uma amostra aguda tardia e uma amostra convalescente, coletadas respectivamente nas primeiras 24 horas após hospitalização, e 4 e  $\geq 14$  dias depois da coleta da primeira amostra. Os pacientes identificados tiveram o diagnóstico de leptospirose confirmado por soroconversão, aumento de quatro vezes de títulos, ou título único  $\geq 1:800$  no MAT. O desempenho diagnóstico do MAT e do ELISA IgM na avaliação combinada das amostras aguda precoce e aguda tardia foi comparado ao desempenho da avaliação das amostras aguda precoce e convalescente que segue a recomendação de testagem da OMS. Nós confirmamos 643 (68%) dos 938 casos suspeitos. A coleta de amostra convalescente foi possível para 63% dos pacientes

confirmados, e 55% dos pacientes suspeitos. Em contraste, a amostra da fase aguda tardia foi coletada para 77% e 66% dos pacientes confirmados e suspeitos, respectivamente. Para os 302 casos confirmados que tiveram as três amostras de soro coletadas, a sensibilidade do MAT e do IgM-ELISA na análise das amostras aguda precoce e tardia foi de 97% (IC95%, 94-99%) e 96% (93-98%), respectivamente, em comparação aos resultados da análise das amostras aguda precoce e convalescente. Em contraste, considerando apenas as amostras agudas destes 302 pacientes, a sensibilidade do MAT e do IgM-ELISA foi de 44% (38-50%) e 75% (69-79%), respectivamente. Amostra aguda tardia e convalescente foi obtida dos casos suspeitos de leptospirose que evoluíram para óbito de 32% e 6%, respectivamente. Os resultados indicam que a coleta e o teste sorológico da amostra aguda tardia de pacientes hospitalizados por leptospirose é viável e melhora a eficiência dos atuais protocolos de confirmação laboratorial de casos de leptospirose.

**Palavras chave:** Leptospirose, diagnóstico sorológico, teste de microaglutinação, IgM-ELISA, amostra aguda tardia.



SANTOS, Andréia Carvalho. Serologic diagnosis of leptospirosis and timing of patient sample collection: Benefit of late-acute-phase sera in case confirmation. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

### **ABSTRACT**

Confirmation of leptospirosis with MAT requires evaluating acute and convalescent-phase sera samples to identify seroconversion or fourfold rise in titers. Current World Health Organization (WHO) protocols recommend that convalescent samples are collected with  $\geq 14$  days after the acute sample collection. However, the difficulty in collecting convalescent samples hampers case confirmation and is a major cause for leptospirosis under-reporting. This study evaluated feasibility of collecting a late acute-sera sample from hospitalized cases of leptospirosis and determined to serological analysis of this sample can improve the efficiency of the protocol to confirm the diagnosis of leptospirosis. From 2003 to 2009, active hospital-based surveillance in Salvador-Brazil prospectively identified hospitalized cases of patients with clinical suspicion of leptospirosis. Three blood samples were collected for each case: an early acute sample, a sample of late acute and convalescent sample collected during the first 24 hours after hospitalization 4 and  $\geq 14$  days after the first sampling, respectively. The identified patients were diagnosed with leptospirosis by seroconversion, fourfold rise in titers, or a titer  $\geq 1:800$  in the MAT. The diagnostic performance of the MAT and IgM ELISA in the combined sample of early acute and late acute sample performance was compared to the early assessment of acute and convalescent samples following a WHO recommendation for testing. We confirmed the leptospirosis diagnosis in 643 (68%) of 938 suspected cases. Convalescent-phase samples were collected from 63% of the

confirmed patients, but in only 55% of the suspected cases. In contrast, the late acute phase sample was collected for 77% and 66% of confirmed and suspected patients, respectively. Among the 302 confirmed cases which all three samples were obtained, the sensitivity of MAT and IgM-ELISA was 97% (IC95%, 94-99%) and 96% (93-98%), respectively, when results of early and late acute-phase samples were evaluated in comparison to the results of the early acute and convalescent samples. In contrast, the sensitivity of MAT and IgM-ELISA was 44% (38-50%) and 75% (69-79%), respectively, when only a single early acute-phase sample was evaluated. Late acute-phase and convalescent-phase samples were obtained from 32% and 6% of the suspected leptospirosis and deaths, respectively. These findings indicate that collection and serologic testing of a late-acute-phase sample among hospitalized patients with suspected leptospirosis may significantly increase the efficiency of protocols for laboratory case confirmation.

**Keywords:** Leptospirosis, serological diagnosis, microagglutination test, IgM ELISA, late acute-phase sera.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático
<b>IC 95%</b>	Intervalo de Confiança de 95%
<b>IIQ</b>	Intervalo Interquartil
<b>MAT</b>	Teste de Microaglutinação
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>UTI</b>	Unidade de terapia intensiva
<b>EMJH</b>	Ellinghausen Mccullough Harris
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>SHPG</b>	Síndrome da hemorragia pulmonar grave
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G

## LISTA DE QUADROS

	Página
<b>Quadro 1:</b> Sensibilidade do MAT e do ELISA de acordo com o tipo de amostra de soro testado (Adaptado de MCBRIDE <i>et al</i> , 2005).	32

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Micrografia eletrônica de <i>Leptospira interrogans</i> , obtida de um paciente com leptospirose grave em Salvador.	19
<b>Figura 2:</b> Resposta sorológica e carga de leptospiras no sangue de acordo com o tempo de doença (SALCK, 2010).	24
<b>Figura 3:</b> Ilustração de uma reação no teste de aglutinação microscópica em microscopia de campo escuro 40X. <b>Figura 3A.</b> Controle negativo e <b>Figura 3B.</b> Reação positiva.	29
<b>Figura 4:</b> Intervalos entre início de sintomas, hospitalização e coleta das amostras nos pacientes com suspeita clínica de leptospirose, (N=892).	52
<b>Figura 5:</b> Distribuição dos títulos recíprocos no MAT dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose que tiveram as três amostras de sangue coletadas (n=302).	54
<b>Figura 6:</b> Sensibilidade do MAT e do ELISA IgM realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia em comparação ao resultado do MAT realizado nas amostras aguda precoce e convalescente.	58

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Listas das cepas, sorogrupos e sorovares utilizados para realização do MAT no estudo.	44
<b>Tabela 2.</b> Características dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose incluídos no estudo, de acordo com o número de amostras de sangue coletadas, Salvador, 2003-2009.	49
<b>Tabela 3.</b> Confirmação laboratorial dos 938 pacientes com suspeita clínica de leptospirose de acordo com tipo de soro coletado.	51
<b>Tabela 4.</b> Sensibilidade do MAT e do ELISA IgM para os 302 pacientes com as três amostras de soro coletadas e confirmação do diagnóstico de leptospirose por MAT realizado na amostra aguda precoce e convalescente ou cultura.	56
<b>Tabela 5.</b> Sorogrupo presuntivo do MAT realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia em comparação ao sorogrupo presuntivo do MAT realizado nas amostras aguda precoce e convalescente (N=302).	61
<b>Tabela 6.</b> Duração da hospitalização dos pacientes com suspeita de leptospirose, de acordo com a evolução clínica (n=927).	63
<b>Tabela 7.</b> Confirmação diagnóstica pelo teste de aglutinação microscópica para os pacientes que evoluíram para óbito e tiveram pelo menos uma amostra de sangue coletada, de acordo com os tipos de amostras coletadas (N=135).	65

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	11
<b>LISTA DE QUADROS</b>	12
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	13
<b>LISTA DE TABELAS</b>	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 APRESENTAÇÃO	17
1.2 ASPECTOS HISTÓRICOS	17
1.3 MICROBIOLOGIA	18
1.4 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO	19
1.5 EPIDEMIOLOGIA	20
1.6 ASPECTOS CLÍNICOS	22
1.6.1.1 FASES DA DOENÇA	24
1.6.1.2 COLETA DE AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO	25
1.7 DIAGNÓSTICO	25
1.7.1 Diagnóstico microbiológico	26
1.7.2 Diagnóstico molecular	28
1.7.3 Diagnóstico sorológico	29
1.7.3.1 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)	29
1.7.3.2 Critérios de confirmação: padrão ouro	32
1.7.3.3 ELISA	33
1.7.3.4 Outros testes	35
1.8 MANEJO TERAPÊUTICO	36
1.9 PREVENÇÃO	37
<b>2. HIPÓTESE</b>	38
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>4. OBJETIVOS</b>	41
4.1 Objetivos específicos	41

5. MÉTODOS	42
5.1 Desenho do estudo	42
5.2 Confirmação laboratorial dos casos	43
5.3 Análises estatísticas	46
6. RESULTADOS	48
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÕES	71
9. RECOMENDAÇÕES	72
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
11. ANEXOS	86



## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 APRESENTAÇÃO**

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (WHO, 2003; MCBRIDE *et al.*, 2005; FAINE, 1999). É considerada uma doença emergente e um grave problema de saúde pública. A incidência é maior nas regiões tropicais onde possui condições favoráveis para transmissão tais como, infraestrutura sanitária precária e alta taxa de colonização renal dos roedores (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003). A infecção é usualmente adquirida através do contato direto das lesões na pele ou mucosa com a urina de animais portadores ou indiretamente pela exposição à água ou solo contaminado com a urina de um animal infectado (LEVETT, 2001).

A infecção apresenta um amplo espectro de sintomas, que podem variar de uma doença febril autolimitada até uma forma mais grave, com comprometimento renal e hemorragias (BHARTI *et al.*, 2003). Como a maioria dos casos de leptospirose se apresenta inicialmente como uma doença febril inespecífica, frequentemente há confusão com outras doenças infecciosas, como a dengue (LEVETT, 2000) e outras viroses (VINETZ, 2001). Devido às dificuldades em diagnosticar a doença com base na apresentação clínica, o diagnóstico laboratorial é necessário para a confirmação dos casos (YERSIN *et al.*, 1999).

### **1.2 .ASPECTOS HISTÓRICOS**

A leptospirose foi inicialmente descrita em 1886, e chamada de “Doença de Weil” por Adolf Weil na Alemanha, que a caracterizou como uma doença infecciosa que causava icterícia, esplenomegalia, e comprometimento renal (FAINE, 1999;

LEVETT, 2001). A bactéria foi isolada pela primeira vez por Inada e colaboradores (1916) no Japão. Estes pesquisadores realizaram experimentos utilizando cobaias, isolando o microorganismo destes e realizando observações anatômicas e patológicas (INADA *et al.*, 1916). Analisando o tecido dos animais, evidenciaram a presença de um espiroquetídeo, que deram o nome de *Spirochoeta icterohaemorrhagiae* (INADA *et al.*, 1916). Dois anos depois do isolamento do agente etiológico, Ido e colaboradores (1917) estudaram o papel do rato como carreador da bactéria demonstrando que este era um portador crônico e que através do contato com a urina contaminada as pessoas poderiam ficar doentes (IDO *et al.*, 1917).

Em 1924, Noguchi isolou espiroquetas de pacientes que supostamente tinham febre amarela (NOGUCHI *et al.*, 1924). A confusão diagnóstica ocorreu devido a dificuldades nos métodos diagnósticos e semelhança da apresentação clínica das doenças.

### 1.3 MICROBIOLOGIA

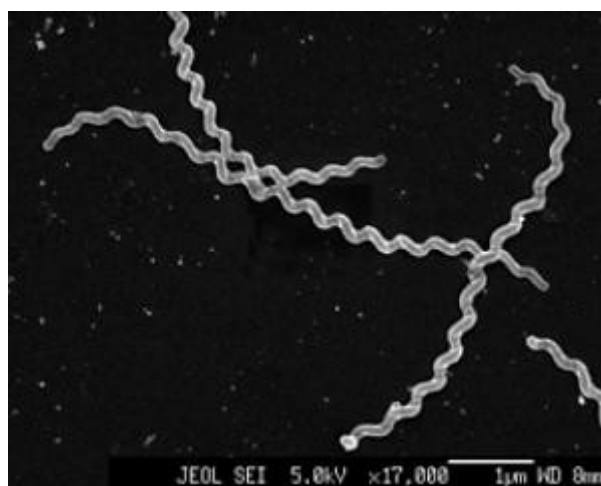
O agente etiológico da leptospirose é uma espiroqueta, que compartilha sua forma espiralada com outras espiroquetas como *Borrelia burgdorferi* e *Treponema pallidum*. Pertencem ao filo *Spirochaetes* e ao gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001).

Podem medir de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento com espessura aproximada de 0,1 até 0,15  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Estas possuem flexões em uma ou ambas as extremidades, dois flagelos periplásmicos com inserções polares localizados no espaço periplásmico (FAINE, 1999).

As leptospiros são bactérias Gram-negativas, possuem uma arquitetura de dupla-membrana, uma interna associada com a parede celular de peptidoglicanos, e

uma externa composta por fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS) que exerce papel na classificação sorológica de leptospiras em diversos sorovares (VINH *et al.*, 1986).

As leptospiras são visualizadas apenas por microscopia de campo escuro, contraste de fase ou impregnação por prata (FAINE, 1999). Elas fazem respiração aeróbica obrigatória e necessitam de temperatura entre 28°C e 30°C e pH de 7,2 a 7,6 para melhor crescimento. O crescimento em cultura é fastidioso (4 a 15 semanas), sendo necessário o uso de meio enriquecido com albumina bovina e ácido graxos de cadeia longa (JOHNSON & FAINE, 1984; ELLINGHAUSEN & MCCULLOUGH, 1965).



**Figura 1:** Micrografia eletrônica de *Leptospira interrogans*, obtida de um paciente com leptospirose grave em Salvador. **Fonte:** Science Daily (2007)

#### 1.4 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

A partir da década de 60, convencionou-se classificar as leptospiras com base em sua patogenicidade em duas espécies: *Leptospira interrogans* que agrupou todos os mais de 250 sorovares patogênicos divididos em 24 sorogupos, e a *Leptospira biflexa* que abrangeu as leptospiras de vida livre (saprófitas) com mais de 60 sorovares (LEVETT, 2001).

Devido à necessidade de estudos taxonômicos e o surgimento de novas técnicas, principalmente as de biologia molecular, essa classificação vem sofrendo modificações. Com base na classificação molecular de hibridização DNA-DNA, foram identificadas 20 espécies e 04 genomospécies (YASUDA *et al.*, 1987; RAMADASS *et al.*, 1992; PEROLAT *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2006). A classificação mais recente agrupa as leptospiros saprofíticas em 7 espécies (*Leptospira biflexa*, *Leptospira wolbachii*, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira meyeri*, *Leptospira vanthielii*, *Leptospira terpstrae* e *Leptospira yanagawae*) e o grupo de patogênicas em 8 espécies (*Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira weilii*, *Leptospira alexanderi* e *Leptospira alstoni*) (Ko *et al.*, 2009). Outras 5 espécies (*Leptospira inadai*, *Leptospira broomii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira wolffii* e *Leptospira licerasiae*), foram classificadas como pertencentes ao grupo intermediário devido ao seu eventual comportamento patogênico (LEVETT, 2001; BHARTI, 2003).

## 1.5 EPIDEMIOLOGIA

Uma variedade de sorovares pode causar infecção em humanos, no entanto, em geral existe a predominância de poucos ou de um sorovar em cada região, país ou situação epidemiológica (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003).

Os diferentes sorovares das leptospiros podem apresentar preferência por hospedeiros específicos (THIERMANN *et al.*, 1984), por exemplo os ratos *Rattus Norvegicus* (hospedeiro de manutenção) servem de reservatório para o sorovar copenhageni (SCIALFA *et al.*, 2010) e os ratos de casa (*Mus musculus*) carregam o sorovar ballum (SILVA *et al.*, 2010).

Os animais são reservatórios essenciais para permanência da transmissão da infecção na natureza, sendo os seres humanos considerados apenas hospedeiros acidentais (BHARTI *et al.*, 2003). Os hospedeiros mais importantes são: roedores peridomésticos, cães, equinos, suínos, bovinos, caprinos e marsupiais (JORGE *et al.*, 2011; WASÍŃSKI *et al.*, 2011). A urina do animal infectado pode ser eliminada no solo ou em águas contaminadas possibilitando a existência de vários padrões de transmissão para o homem.

Tradicionalmente a leptospirose era considerada como uma doença de padrão rural ou ocupacional (MYERS & DIAZ, 1979), relacionado ao trabalho em lavouras de arrozal ou em algumas profissões que potencializavam exposições a ambientes ou a animais contaminados, como jardineiros, açougueiros e agricultores (FAINE, 1999; NÁJERA *et al.*, 2005). Outro padrão epidemiológico mais recentemente descrito é o da ocorrência da doença associada a viagens, eco-turismo (LESHEM *et al.*, 2010) e atividades de aventura (STERN *et al.*, 2010), bem como práticas de atividades esportivas (SEJVAR, *et al.*, 2003; HAAKE *et al.*, 2002) como evidenciado em um grande surto que ocorreu entre nadadores que participavam de um *triathlon* nos Estados Unidos (MORGAN *et al.*, 2002). Além disso, existem relatos de surtos relacionados a desastres naturais (CAMPANELLA *et al.*, 1999).

Atualmente, com a expansão das cidades e deslocamento dos agricultores para os grandes centros, a leptospirose tornou-se um problema urbano (KO *et al.*, 1999; BHARADWAJ, *et al.*, 2002). Um bilhão de pessoas no mundo residem em favelas (UNITED NATIONS, 2003) com condições de saneamento precário, o que produz uma condição ecológica favorável para transmissão da leptospirose por roedores (JOHNSON *et al.*, 2004, THIERMANN *et al.*, 1977). Um estudo realizado em uma comunidade carente de Salvador revelou que 15,4% apresentavam evidência sorológica de infecção

prévia por leptospirose, e as pessoas que residiam em casas próximas a esgoto aberto, a acúmulo de lixo ou que possuíam baixa renda apresentaram um maior risco para infecção por leptospiras (REIS *et al.*, 2008).

No Brasil, a leptospirose ocorre de forma endêmica em grandes centros urbanos como Salvador, São Paulo e Recife, com um padrão de aumento no número de casos e ocorrência de surtos após períodos de elevados índices pluviométricos e inundações (SARKAR *et al.*, 2002; KO *et al.*, 1999; ROMERO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Em Salvador-BA as epidemias de leptospirose estão associadas com altos índices de letalidade (10-15%) e ocorrem principalmente em áreas urbanas pobres, com falta de saneamento básico (CALDAS & SAMPAIO, 1979; KO *et al.*, 1999).

## 1.6 ASPECTOS CLÍNICOS

A leptospirose humana apresenta manifestações clínicas muito variáveis, com diferentes níveis de gravidade (ABDULKADER *et al.*, 2002; MAROTTO *et al.*, 1999; GUIA DE VIGILANCIA, 2009). A maioria das infecções caracteriza-se por uma apresentação subclínica ou um quadro clínico discreto e auto-limitado, no qual são geralmente observados sinais e sintomas como cefaléia, mialgia, dor abdominal, náuseas e vômitos e sufusão conjuntival (BHARTI *et al.*, 2003). As formas mais leves da doença podem ser confundidas com outras doenças febris agudas como influenza, dengue e hepatites (FAINE, 1999; BHARTI, 2003; SOUZA *et al.*, 2007), devido a inespecificidade dos sinais e sintomas. Diante disso, muitos casos de leptospirose são sub-notificados (BOVET *et al.*, 1999; ASHFORD *et al.*, 2002).

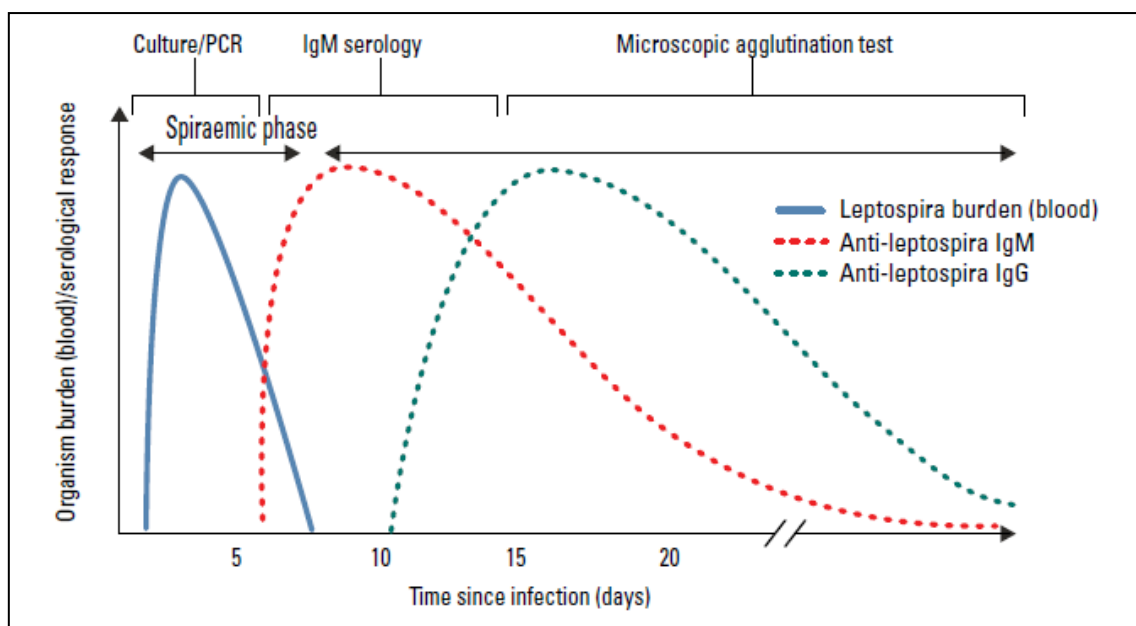
As formas graves costumam ter um curso clínico rapidamente progressivo, caracterizado pelas mesmas manifestações vistas nas formas leves, adicionadas à icterícia, insuficiência renal e sangramentos (BHARTI *et al.*, 2003). A insuficiência

renal na doença grave pode ocorrer dentro de três a quatro dias após o início da doença, onde os pacientes frequentemente apresentam um rápido aumento na creatinina e uréia sanguínea (MAROTTO *et al.*, 1999). Insuficiência renal aguda costuma ser observada em 50-80% dos pacientes hospitalizados com leptospirose (FARR, 1995; KENNEDY *et al.*, 1979). A icterícia é determinada pelo aumento dos níveis de bilirrubina sérica, principalmente na forma conjugada, e costuma ser acompanhada de níveis normais ou discretamente elevada das transaminases (ABDULKADER *et al.*, 2002).

Outro importante aspecto clínico da leptospirose é a síndrome da hemorragia pulmonar grave (SHPG), que pode ocorrer mesmo na ausência de icterícia e insuficiência renal. Séries de casos de pacientes com hemorragia pulmonar grave associada à leptospirose foram descritas há algumas décadas na Coreia e na China (PARK *et al.*, 1989, VIJAYACHARI *et al.*, 2003). Entretanto, a literatura médica sobre o assunto cresceu consideravelmente a partir da descrição de uma epidemia rural de leptospirose na Nicarágua, em 1995, que teve a hemorragia pulmonar como a principal complicação observada, desacompanhada de outros sinais de gravidade como a icterícia (TREVEJO *et al.*, 1998). Este padrão clínico apresenta elevada letalidade (>50%) (NALLY *et al.*, 2004; GOUVEIA *et al.*, 2008) e é considerado emergente em diferentes partes do mundo onde a doença é considerada endêmica, como na Índia, Austrália e Brasil (VIJAYACHARI *et al.*, 2003; SIMPSON *et al.*, 1998; DOLHNIKOFF *et al.*, 2007). Em Salvador, vigilância epidemiológica ativa realizada no Hospital Couto Maia desde 1996 identificou a sua emergência a partir do ano de 2003 (GOUVEIA *et al.*, 2008).

### 1.6.1.1 FASES DA DOENÇA

A doença pode ser subdividida em 2 fases: a fase aguda também conhecida como septicêmica e a fase imune (FARR, 1995). A fase aguda pode durar de 4 a 7 dias de sintomas, sendo possível identificar o agente no sangue ou líquido dos indivíduos infectados (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). Após esse período inicia-se a fase imune com início no sétimo dia de sintomas, é nesse período que se inicia a produção de anticorpos aglutinantes da classe IgM e IgG (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003) (Figura 2). A soroconversão dos anticorpos IgM pode ocorrer relativamente cedo de 5 a 7 dias após o início da doença, entretanto, ocorre mais frequentemente a partir de 10 dias após o início da doença (Figura 2).



**Figura 2:** Resposta sorológica e carga de leptospiras no sangue de acordo com o tempo de doença (SLACK, 2010).



### **1.6.1.2 Fases da doença: coleta de amostras para o diagnóstico sorológico**

As amostras de sangue coletadas para sorologia da leptospirose devem ser preferencialmente coletadas em dois momentos da doença: a primeira amostra na admissão do paciente no hospital (amostra de fase aguda), e uma segunda, que deve ser coletada considerando o tempo de doença em dias e ou intervalo suficiente (entre 7 a 10 dias de doença) para observar soroconversão. A OMS (Organização Mundial de Saúde) sugere a coleta de uma segunda amostra com intervalo de 14-21 dias entre as coletas para realização do teste de aglutinação microscópica. Para o ELISA IgM, nos casos em que pacientes suspeitos da doença não forem confirmados pelo teste, especialmente se a coleta da amostra aguda ocorreu antes do sétimo dia do início dos sintomas, é recomendável a repetição com outra amostra coletada após 7 dias da coleta da primeira amostra (WHO, 2003).

A avaliação sorológica de amostras pareadas é importante para detectar aumento nos títulos entre duas amostras ou soroconversão. Geralmente, a soroconversão (primeira amostra negativa e segunda amostra positiva (título acima do cut-off) ou um aumento de quatro vezes ou mais no título (primeira amostra com título baixo e segunda amostra com título 4x mais elevado) em amostras consecutivas de soro é considerada uma prova de diagnóstico de infecção recente. Um caso com título elevado de IgM no ELISA em uma amostra de sangue, é considerado caso confirmado para leptospirose e considerado como infecção atual ou recente (WHO, 2003).

## **1.7 DIAGNÓSTICO**

Os exames laboratoriais são extremamente importantes na elucidação diagnóstica de pacientes com suspeita de leptospirose (CUMBERLAND *et al.*,1999). Os métodos mais utilizados na investigação diagnóstica da leptospirose apoiam-se na

demonstração direta da presença de leptospiras ou do seu DNA (testes moleculares) nas amostras biológicas de pacientes, ou na demonstração indireta da infecção, pela detecção de anticorpos específicos contra diferentes epítomos antigênicos presentes nas leptospiras (VINETZ, 2001).

## **1.7.1 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**

### **1.7.1.1 Visualização direta em campo escuro**

Durante a primeira semana de infecção (3-7 dias do início dos sintomas) (Figura 2) as leptospiras podem ser visualizadas por microscopia de campo escuro a partir da observação direta de lâminas confeccionadas com materiais biológicos como sangue, urina, tecidos e LCR (líquido cefalorraquidiano) (FAINE, 1999; KRAMER *et al.*, 1994). A vantagem da observação direta é a rapidez e a possibilidade de diagnóstico precoce. No entanto esse método não é usado com frequência na rotina clínica devido à necessidade de técnico treinado e microscópio de campo escuro, além disso, a subjetividade na leitura ocorre com frequência. Os principais motivos de confusão no diagnóstico são os artefatos, redes de fibrina e presença de células (FAINE, 1999; AHMAD *et al.*, 2005).

### **1.7.1.2 Cultura**

As leptospiras podem ser isoladas do sangue, tecidos, e LCR durante os primeiros 7 a 10 dias da doença e da urina durante a segunda a terceira semana da doença. A técnica possui baixa sensibilidade (14,3-50%) e requer de 4 a 15 semanas para ser finalizada em função do crescimento fastidioso das leptospiras (TRUCOLLO *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2003). O meio de cultura com o material inoculado precisa ser submetido a análises por microscopia de campo escuro semanalmente por um

período de até três meses. Mesmo com as limitações listadas acima, o isolamento do patógeno é importante, pois além de fornecer o diagnóstico definitivo, permite identificação do sorogrupo e sorovar do isolado. Esses dados têm utilidade epidemiológica por sugerirem potencial reservatórios animais na natureza, guiando assim estratégias de controle e prevenção (KATZ *et al.*, 2003;LEVETT *et al.*, 2003;MCBRIDE *et al.*, 2005).

#### **1.7.1.2.1 Caracterização dos isolados de leptospira**

A caracterização dos isolados de leptospira pode ser realizada por métodos sorológicos, e mais recentemente por métodos moleculares (BOURHY *et al.*,2010; GALLOWAY & LEVETT, 2010). A caracterização sorológica de isolados de leptospira em nível de sorogrupo é realizada através da técnica de aglutinação microscópica utilizando-se anticorpos policlonais produzidos em coelho (FAINE, 1999). A classificação em sorovares é realizada com a mesma técnica listada acima, no entanto utilizam-se anticorpos monoclonais. O principal desafio na caracterização dos sorogrupos e sorovares dos isolados é a necessidade de ser realizada em laboratórios de referência que possuam o painel de anticorpos necessários para caracterização do isolado (TERPSTRA *et a.l*, 1985).

Tanto com propósitos clínicos quanto para estudos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose, a classificação de isolados de leptospira através de métodos moleculares pode permitir maior precisão na determinação das fontes de transmissão (CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009). Para tanto, alguns métodos têm sido descritos e avaliados, tais como: polimorfismo de fragmentos de restrição, ribotipagem, eletroforese em campo pulsado (HEERRMAN *et al.*, 1991; HEERRMAN *et al.*, 1992 ), 16S RNA, métodos

baseados em PCR (RALPH *et al.*, 1993) e mais recentemente, análise da variação do número de repetições em tandem (VNTR) (SLACK *et al.*, 2005; MAJED *et al.*, 2005).

### **1.7.1.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana:**

Leptospiras são sensíveis a antibióticos beta-lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas e estreptomicina. Problemas na determinação da susceptibilidade incluem a demora na realização do teste (CHARON *et al.*, 1974), e a dificuldade em quantificar o crescimento das leptospiras com precisão. Estas restrições têm limitado o desenvolvimento de métodos rápidos e padronizados para testar a susceptibilidade antimicrobiana das leptospiras (FAINE, 1999).

## **1.7.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Outra forma de demonstrar a presença de leptospiras em amostras clínicas é o uso de testes moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), que apresentam alta sensibilidade quando comparados aos testes microbiológicos (AHMAD *et al.*, 2005). Merien e colaboradores (1992), utilizando a PCR convencional em amostras clínicas de urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) e sangue de humanos, afirmaram que este pode ultrapassar a cultura em sensibilidade, no entanto não foi possível diferenciar leptospiras patogênicas e não patogênicas (MERIEN *et al.*, 1992).

Diversos métodos baseados na PCR em tempo real (Real time PCR) foram introduzidos como uma ferramenta sensível e específica para a detecção de leptospiras (TRUCCOLO *et al.*, 2001; AHMED *et al.*, 2009). Estudos utilizando PCR em tempo real através do método SYBR-Green I (alvo g DNA) demonstraram ser esta técnica capaz de detectar até 50 leptospiras/mL no sangue de pacientes infectados (MERIEN *et al.*, 2005). Em outro estudo utilizando PCR em tempo real com a metodologia Taqman

(alvo 16sRNA) foi possível detectar um mínimo de 2 leptospiras/mL no soro e de 10 leptospiras/mL na urina dos pacientes estudados (SMYTHE *et al.*, 2002).

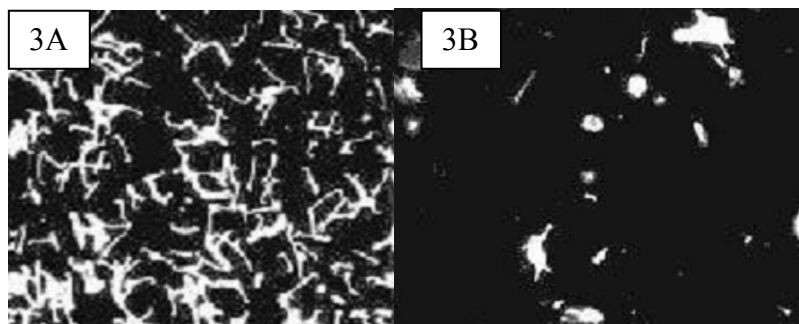
Uma limitação da PCR é a possibilidade de resultados falso positivo, decorrentes de contaminação durante o processamento, extração de DNA ou análise da amostra.

### **1.7.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO**

#### **1.7.3.1 Teste de aglutinação microscópica (MAT)**

O teste de aglutinação microscópica se baseia na antiga prova de aglutinação com lise das células desenvolvida por Martin & Petit (1918) e modificada posteriormente por Cole e colaboradores (1973). O teste foi descrito logo após o primeiro isolamento do organismo (IDO *et al.*, 1916; LEVETT, 2001). Naquela época poucos sorovares eram reconhecidos, e houve poucas tentativas de padronizar a metodologia entre os laboratórios. O principal motivo para a ausência de padronização era a dificuldade em quantificar com exatidão a densidade de leptospiras (COLE *et al.*, 1973). Muitos outros métodos de diagnóstico sorológicos foram desenvolvidos e têm sido aplicados, mas o MAT ainda é considerado o teste sorológico de referência (WHO, 2003).

O MAT baseia-se na identificação por microscopia de campo escuro da aglutinação do soro do paciente com antígenos de leptospira (BABUDIARI, 1961). Após a incubação, a mistura soro-antígeno é examinada microscopicamente para observação de aglutinação. Uma reação é considerada positiva (Figura 3B) quando menos de 50% das leptospiras estão livres, em comparação a um controle apenas com antígenos vivos (Figura 3A).



**Figura 3:** Ilustração de uma reação no teste de aglutinação microscópica em microscopia de campo escuro 200X. **Figura 3A.** Controle negativo e **Figura 3B.** Reação positiva. **Fonte:** WHO, 2003.

Considera-se caso confirmado pelo MAT, aquele que apresenta soroconversão, ou uma variação sorológica nos títulos de anticorpos de quatro vezes ou mais. Os casos que não apresentam variação sorológica nos títulos entre duas ou mais amostras permanecem como casos presuntivos. O provável sorogrupo infectante é o que apresenta maior título, se mais de um sorogrupo apresentar o maior título o resultado é considerado como reação mista e o provável sorogrupo infectante não é determinado (FAINE,1999).

Essa técnica, detecta tanto anticorpos da classe IgM quanto IgG (FAINE, 1999), é específica porque os antígenos de superfície que reagem durante a aglutinação não são compartilhados com outros microorganismos.

Outra vantagem deste teste é a capacidade de presumir o sorogrupo envolvido na infecção a partir do sorogrupo que sofreu máxima aglutinação com o soro testado. Vários estudos avaliaram a capacidade da técnica em prever o sorovar, no entanto sem sucesso (LEVETT *et al.*, 2003; KUSUM *et al.*, 2005). Em um estudo realizado por Katz e colaboradores (2003), o MAT apresentou 44.6% de concordância entre o sorovar presumido e aquele confirmado após sorogrupagem dos isolados (KATZ *et al.*, 2003).

Uma das limitações do teste é a necessidade de ser realizada em laboratórios de referência com pessoal bem treinado e disponibilidade de um painel de leptospiras vivas que promovam uma cobertura adequada da diversidade antigênica de leptospiras existentes no local presumível de ocorrência da infecção. Por isso, é recomendável, que o painel de cepas utilizadas no teste inclua leptospiras de cada um dos 24 sorogrupos de leptospira, além de isolados do local onde o teste está sendo realizado (FAINE, 1999).

A principal dificuldade no desempenho do MAT é a necessidade de amostras pareadas (uma amostra coletada na fase aguda e outra coletada >14 dias após a coleta da primeira) (WHO, 2003). Estudos prévios têm mostrado que o MAT possui alta sensibilidade (>90%) (DE ABREU FONSECA *et al.*, 2006) e alta especificidade ( $\geq 97\%$ ) (CUMBERLAND *et al.*, 1999) em amostras convalescentes de pacientes, no entanto quando realizado em amostras com menos de 7 dias de doença a sensibilidade pode variar de 30 a 48.7% (CUMBERLAND *et al.*, 1999; BAJANI *et al.*, 2003) (Quadro 1).

**Quadro 1.** Sensibilidade do MAT e do ELISA de acordo com o tipo de amostra de soro testado (Adaptado de MCBRIDE *et al.*, 2005).

Cidade (referência)	Teste (formato)	Padrão Ouro	Sensibilidade		Especificidade
			Primeira	Segunda	
Multicêntrico (Smits et al., 2001)	ELISA (Comercial)	Cultura+ ou	57% <sup>a</sup>	84% <sup>a</sup>	96-99%
	MAT	Soroconversão no MAT	70%	81%	99-99%
Barbados (Cumberland et al., 1999)	ELISA (In house)	Cultura+	52% <sup>b</sup>	89% <sup>b</sup>	94%
	MAT		29%	63%	97%
Multicêntrico (Bajani et al, 2003)	ELISA (Pan Bio)	Cultura+ ou	49% <sup>c</sup>	75% <sup>c</sup>	97%
	MAT	Soroconversão no MAT	49%	94%	97%

<sup>a</sup>Primeira amostra coletada com 0-10 dias e segunda >10 dias de sintomas, <sup>b</sup>Primeira amostra coletada no dia da internação e a segunda no quinto dia de hospitalização, <sup>c</sup>Primeira amostra coletada com 0-14 dias e segunda >14 dias de sintomas.

### 1.7.3.2 Critérios para confirmação de casos: padrão ouro

A confirmação definitiva dos casos de leptospirose é realizada através do isolamento da bactéria, no entanto em virtude das limitações para sua realização, os testes sorológicos também são considerados na confirmação dos casos. Poucos trabalhos utilizam apenas um resultado de cultura positiva como padrão ouro de confirmação (CUMBERLAND *et al.*, 1999). A maioria dos trabalhos utilizam uma combinação de métodos (cultura e sorologia positiva e ou soroconversão ou aumento de título entre



duas amostras no MAT) como padrão de confirmação (SMITS *et al.*, 2001; BAJANI *et al.*, 2003, CRODA *et al.*, 2007; MCBRIDE *et al.*, 2007; EFFLER *et al.*, 2002).

### 1.7.3.3 ELISA (Ensaio imunoenzimático)

Devido à complexidade do MAT, testes rápidos e com base em ELISA foram desenvolvidos. Tanto o ELISA quanto os testes rápidos têm como finalidade permitir um diagnóstico mais precoce de forma a antecipar a introdução de tratamento com terapia específica (ADLER *et al.*, 1980). Além disso, o ELISA é um teste de fácil execução e permite detectar anticorpos mais precocemente que o MAT (AHMAD *et al.*, 2005; LEVETT *et al.*, 2001, MCBRIDE *et al.*, 2007, TANSUPHASIRI *et al.*, 2005).

A principal diferença entre os ELISAs empregados no diagnóstico da leptospirose é o antígeno utilizado na etapa de sensibilização das placas teste. Esses antígenos podem ser extratos bruto de diferentes sorovares ou de apenas um único sorovar, incluindo-se cepas patogênicas e não patogênicas (CUMBERLAND *et al.*, 1999; LEVETT & WHITTINGTON, 1998; LEVETT *et al.*, 2001; EFFLER *et al.*, 2002).

A utilização de cepas não patogênicas como antígeno visa diminuir os riscos de contaminação acidental para o operador. A principal desvantagem desses testes são a baixa especificidade e reprodutibilidade (BLACKSELL *et al.*, 2006). Vários estudos avaliaram ELISA IgM utilizando como antígeno *L. biflexa* Patoc. Em estudo realizado pelo grupo de Salvador, com amostras randomizadas de pacientes participantes de uma vigilância para leptospirose, foi avaliada a sensibilidade e especificidade de 4 testes diagnósticos para leptospirose (MCBRIDE *et al.*, 2007). Foi testado um ELISA IgM (Panbio) com placas sensibilizadas com *L. biflexa*, e a sensibilidade observada foi maior (87,5%), quando comparadas com o ELISA de leptospiras patogênicas (79,2%). Em

contrapartida, a especificidade foi menor (87,5%) quando comparado ao ELISA com antígeno bruto de leptospiros patogênicas (95%) (MCBRIDE *et al.*,2007).

Existem trabalhos que utilizam ELISA IgM com cepas patogênicas de dois ou mais sorovares representantes da região. ADLER *et al.* (1980), utilizaram sonicados de leptospiros pertencentes aos sorovares pomona, Hardjo e copenhageni, frente a conjugados anti-IgM e anti-IgG humanos. Os resultados foram comparados com o padrão ouro MAT confirmado. O ELISA IgM demonstrou-se mais sensível, e além disso detectou anticorpos IGM mais precocemente do que o MAT (ADLER *et al.*, 1980).

Um ELISA IgM com antígeno bruto de leptospiros interrogans (sorovar copenhageni), foi validado pelo grupo de pesquisa de Salvador-BA. Foram utilizadas amostras randômicas de pacientes atendidos no Hospital Couto Maia. A sensibilidade em pacientes de fase aguda com menos de 7 dias de sintomas foi de 54% comparado a 46% no MAT, no entanto em pacientes com mais de 7 dias de sintomas a sensibilidade elevou-se para 79.2% (MCBRIDE *et al.*,2007). Embora possam ocorrer reações cruzadas com outras doenças, como dengue e hepatites, a especificidade pode alcançar > 95% (MCBRIDE *et al.*, 2007).

A sensibilidade do ELISA IgM na amostra aguda geralmente é maior que a observada no MAT, especialmente entre pacientes com mais de 7 dias de doença. A sensibilidade pode variar de 49 a 70% (Quadro 1) (BAJANI *et al.*,2003; SMITS *et al.*, 2001). Em amostras convalescentes, a sensibilidade do ELISA pode alcançar >94% quando comparado com o MAT como referência (Quadro 1) (BAJANI *et al.*,2003).

Estudos realizados com kits de ELISA IgG observaram sensibilidade de 93,2% em amostras de pacientes com 10-25 dias de sintomas quando comparados com o padrão ouro (MAT). Apesar de o ELISA IgG não ter utilidade significativa para a fase

aguda da doença, ele pode ser útil durante vigilância epidemiológica ou como um complemento ao MAT (VANASCO *et al.*, 2007).

Testes de ELISA que utilizam como antígeno proteínas recombinantes que apresentam um papel na patogênese da doença tem sido desenvolvidos e avaliados com objetivo de aumentar a sensibilidade diagnóstica, especialmente nos primeiros dias da doença (CRODA *et al.*, 2007). O desempenho de testes utilizando a proteína GroEL não foram encorajadores (FLANNERY *et al.*, 2001). No entanto outras proteínas como LipL32 e imunoglobulin-like (Lig) apresentaram resultados promissores (MATSUNAGA *et al.*, 2003; KOIZUMI&WATANABE, 2004).

Em um estudo realizado na Índia utilizando a proteína recombinante LipL32 para um Dot-ELISA, a sensibilidade encontrada foi de 96% e especificidade de 91% em amostras coletadas com menos de 7 dias de sintomas (DEY *et al.*, 2008). Em outro estudo utilizando proteína recombinante imunoglobulin-like (Lig) em um ELISA imunoblot a sensibilidade e especificidade chegaram a (>90%) (CRODA *et al.*, 2007).

Mesmo com desempenho satisfatório, o ELISA utilizando proteína recombinante ainda não se encontra disponível para laboratórios de rotina clínica, especialmente pela dificuldade de produção em larga escala de proteína.

#### **1.7.3.4 OUTROS TESTES**

Vários outros testes sorológicos foram desenvolvidos, como a reação de hemaglutinação indireta, Lepto-disptick e dot-ELISA (SMITS *et al.*, 2000; BRANDÃO *et al.*, 1998; CHIRATHAWORN *et al.*, 2007).

O teste de hemaglutinação indireta foi descrito por muitos autores como uma técnica rápida, prática e com alta sensibilidade e especificidade. O teste desenvolvido

pelo Centro de controle de zoonoses demonstrou 92% de sensibilidade e 95% de especificidade (AHMED *et al*, 2005). No entanto, os resultados são controversos, visto que em vários estudos a sensibilidade do teste não chega a 50% (LEVETT *et al*, 2001; BAJANI *et al*, 2003). Portanto esse teste não é indicado para triagem de casos de leptospirose.

Os testes rápidos Lepto-disptick e lateral-flow são considerados mais promissores para utilização na rotina clínica, e reconhecimento precoce de casos. No entanto, tais testes têm exibido sensibilidade variável conforme a localidade em que foram avaliados (SEHGAL *et al.*, 2003; YERSIN *et al.*, 1999; VIJAYACHARI *et al.*, 2002).

Um estudo que avaliou oito testes rápido para o diagnóstico da leptospirose na fase aguda da doença identificou sensibilidade de: 29% na hemaglutinação indireta, 34% a 52% em diferentes tipos de lepto-disptick, 40% na imunofluorescência IgM, 36% e 48% em dois ELISA IgM indireto e 48% em um ELISA seriado. O teste com maior sensibilidade encontrada nesse estudo foi a aglutinação em látex com 86% (EFFLER *et al.*, 2002).

Outra técnica aplicada à detecção de anticorpos é a contra-immunoeletroforese, no entanto ela não foi padronizada e não é amplamente utilizada (AHMED *et al*, 2005).

## **1.8 MANEJO TERAPEUTICO**

A antibioticoterapia está indicada em qualquer estágio da infecção, no entanto sua eficácia parece ser maior quando iniciada até o quarto dia de doença. A terapia de suporte é fundamental para as complicações como insuficiência respiratória aguda e hemorragia pulmonar.

Em casos hospitalizados são indicadas medidas como: reposição hidroeletrólítica, assistência cardiorrespiratória, transfusões de sangue e derivados, nutrição enteral ou parenteral e proteção gástrica. O acompanhamento do volume urinário e da função renal é fundamental para se indicar o início precoce de diálise, o que reduz o dano renal e a letalidade da doença (GUIA DE LEPTOSPIROSE, 2009).

## **1.9 PREVENÇÃO**

A prevenção da leptospirose é baseada no controle de animais reservatórios por meio de medidas de saneamento ambiental e adoção de medidas de prevenção pessoal como a proteção de pessoas contra o contágio direto com animais ou indiretos com ambientes contaminados por *Leptospira*.

Pessoas com exposições de alto risco, como trabalhadores em campos inundados devem ser orientados a evitar o contato direto com água potencialmente contaminada ou lama, e quando não for possível evitar o contato devem usar equipamentos de proteção individual, como sapatos de borracha e luvas. Em caso de existência de lesão na pele, o trabalhador deve proteger o local ferido do contato com ambiente potencialmente contaminado e de potenciais reservatórios.

Ações como o saneamento básico, esgotamento sanitário e coleta do lixo, devem ser feitas para evitar a proliferação de roedores e a contaminação do solo e das águas. Além disso, é importante a conscientização da população sobre medidas de prevenção e controle.

O diagnóstico precoce também é de extrema importância para definição do manejo clínico e diminuição de casos que necessitam de internação em leitos de unidade intensiva e do número de óbitos.

## 2. **HIPÓTESE**

Nós hipotetizamos que:

- O protocolo de avaliação sorológica combinada de amostras de soro coletadas na fase aguda precoce e aguda tardia da doença apresentam sensibilidade mais elevada quando comparados a dois diferentes padrões de referência (MAT e hemocultura) para o diagnóstico da leptospirose.

### 3. JUSTIFICATIVA

As duas técnicas mais utilizadas na confirmação laboratorial dos casos de leptospirose são o ELISA IgM e o MAT (CRODA *et al.*, 2007; BRANDÃO *et al.*, 1998). Apesar de o ELISA exibir algumas vantagens em relação ao MAT, como rapidez, facilidade na execução e interpretação, ele não é considerado como método de referência no diagnóstico da doença por não garantir que a presença de anticorpos contra leptospira se deva à doença atual. Em contraste, o MAT permite observar soroconversão ou aumento de título contra sorogrupos de leptospira entre amostra de soro aguda e convalescente e, por isso é considerado como método definitivo na confirmação do diagnóstico de leptospirose (WHO, 2003).

De acordo com a recomendação da OMS, a coleta da amostra convalescente deve ser feita 14 a 21 dias após a coleta da amostra aguda. Entretanto, nem sempre a coleta de uma amostra convalescente é possível por motivos como, óbito ou alta hospitalar antes do intervalo recomendado para coleta da amostra, o que dificulta o uso do MAT como teste de referência para confirmação diagnóstica da leptospirose (DASSANAYAKE *et al.*, 2009). Além disso, a necessidade de uma amostra convalescente coletada 14 dias após a coleta da amostra aguda impede que o diagnóstico definitivo da doença seja feito em tempo hábil para auxiliar tanto no manejo clínico do paciente quanto na investigação de surtos. Uma possível alternativa para ampliar a oportunidade de emprego do MAT na confirmação definitiva de casos de leptospirose seria reduzir o intervalo entre a coleta das duas amostras de soro. Entretanto, apenas um estudo avaliou a sensibilidade do MAT quando realizado em amostras pareadas coletadas com um intervalo menor. Em Barbados, Cumberland *et al.* (1999) demonstraram que a avaliação de uma amostra aguda tardia coletada cinco dias após a coleta da amostra aguda precoce tinha uma sensibilidade de 63% pelo MAT e de

89% pelo ELISA no diagnóstico de pacientes (hospitalizados) com a suspeita da doença utilizando hemocultura como padrão ouro (CUMBERLAND *et al.*, 1999).

Nós pretendemos investigar a viabilidade e desempenho do uso de amostras de soro agudo precoce e agudo tardio no diagnóstico por MAT e ELISA de pacientes com leptospirose confirmada por métodos de referência (hemocultura e MAT realizado em amostra aguda precoce e convalescente) identificada prospectivamente através de uma vigilância hospitalar de base populacional na cidade de Salvador.



#### **4. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o desempenho do MAT e ELISA IgM no diagnóstico da leptospirose utilizando uma amostra de sangue aguda precoce e uma aguda tardia coletadas com intervalo entre as coletas de cinco dias em comparação a hemocultura e MAT realizado em amostra aguda precoce e amostra convalescente coletadas com o intervalo tradicionalmente recomendado de >14 dias.

##### **4.1 Objetivos específicos**

- Determinar se o MAT da amostra aguda tardia pode melhorar a eficiência dos protocolos de confirmação diagnóstica de pacientes hospitalizados por leptospirose.
- Determinar se o ELISA IgM da amostra aguda tardia pode melhorar a eficiência dos protocolos de confirmação diagnóstica de pacientes hospitalizados por leptospirose.

## **5-MÉTODOS**

### **5.1 Desenho do estudo**

**5.1.1 Vigilância para leptospirose:** Desde 1996, um estudo de vigilância hospitalar ativa de base populacional realiza inclusão prospectivamente de pacientes com suspeita de leptospirose em Salvador, Bahia. A vigilância é realizada no Hospital Couto Maia, unidade de referência para doenças infecciosas na Bahia e responsável pela notificação de mais de 95% dos casos de Salvador (KO *et al.*, 1999). Nosso estudo foi um corte transversal dos pacientes com suspeita de leptospirose e identificados por esta vigilância no período de 2003 a 2009.

**5.1.2 População estudada:** Foram incluídos no estudo residentes de Salvador, hospitalizados com manifestações clínicas sugestivas de leptospirose como febre, cefaléia e mialgia, associados à icterícia ou insuficiência renal, ou sangramentos. Esses pacientes foram identificados através de revisão do livro de registros do hospital, e convidados a participar do estudo mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Dados demográficos e sobre a apresentação e evolução clínica foram coletados através de entrevistas com questionários padronizados e revisões de prontuário (Anexo II). Foram excluídos do estudo pacientes que durante a hospitalização receberam diagnóstico clínico ou confirmação laboratorial ou radiológica para outra doença.

**5.1.3 Coleta de amostras:** Para confirmação sorológica dos casos suspeitos de leptospirose, a equipe de vigilância coletou sempre que possível amostra de sangue dos pacientes em três momentos: nas primeiras 24h após a admissão hospitalar (amostra aguda precoce), quatro dias após a coleta da amostra aguda precoce (amostra aguda

tardia) e quatorze a vinte e um dias após da coleta da amostra aguda precoce (amostra convalescente). Variações no momento da coleta das amostras aguda precoce, aguda tardia e convalescente aconteceram para alguns pacientes. Nas situações em que o paciente recebeu alta hospitalar antes de completar quatorze dias da data de coleta da amostra aguda precoce, uma equipe da vigilância visitou o paciente em seu domicílio para coleta da amostra convalescente. As amostras de sangue foram centrifugadas a 14.000 RPM por 10 minutos para separação do soro que foi então aliquotado e preservado congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes sorológicos.

Adicionalmente aos métodos sorológicos, sempre que possível, a vigilância coletou amostra de sangue nas primeiras 24h da admissão hospitalar para realização de hemocultura para leptospira. A hemocultura foi realizada a partir da semeadura de duas gotas de sangue total em tubos com meio de cultura EMJH líquido e semi-sólido a 0,1%. Os tubos foram mantidos em estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  e examinadas semanalmente por dezesseis semanas através de microscopia de campo escuro para observar crescimento de leptospira.

## **5.2 Confirmação laboratorial dos casos:**

**5.2.1 Teste de aglutinação microscópica (MAT):** Para realização do MAT, os soros foram diluídos a 1:50 e 50  $\mu\text{l}$  dispostos em microplacas de poliestireno identificadas com os números dos soros dos pacientes no estudo. Um painel composto por 6 das 23 cepas de referência recomendadas pela OMS, mais uma cepa isolada de um paciente de Salvador no ano de 1996 foram utilizados como antígeno (Tabela 1). Os sorogrupos presentes neste painel representam 96% dos sorogrupos das 63 cepas de leptospira isoladas de pacientes incluídos nesse estudo. Para a formação da bateria de cepas utilizadas no teste, foi realizada uma avaliação prévia de 4 anos (1996-2000) com a

bateria completa de 23 sorogrupos, dessa avaliação foi retirada as cepas que tiveram frequência mínima de 5%. As culturas das cepas utilizadas no MAT estavam com cerca de 4 a 7 dias de crescimento e livres de auto-aglutinação ou contaminação. As culturas foram diluídas em PBS 1X a 1:4 e avaliadas quanto adequação da sua concentração cultura-PBS. Distribuiu-se 50µl da solução cultura-PBS em cada poço das placas já contendo os soros previamente diluídos, resultando uma concentração de 1:100. Quando observada aglutinação de >50% das leptospiras para o título de 1:100, os soros foram testados com diluições seriadas de duas vezes para obtenção do título máximo. Os critérios de confirmação do diagnóstico de leptospirose pelo MAT utilizados no estudo foram: presença de soroconversão ou aumento de 4 vezes no título entre duas amostras de soro, ou título  $\geq$  1:800 em pelo menos uma amostra de soro. Foram considerados casos prováveis os pacientes que apresentaram título entre 1:200 e 1:400 em pelo menos uma amostra. O sorogrupo presuntivo foi determinado pela cepa que apresentou maior título no MAT e as reações mistas foram consideradas quando a amostra do paciente reagiu com título máximo igual para mais de uma cepa de sorogrupos diferentes.

**Tabela 1.** Listas das cepas, sorogrupos e sorovares utilizados para realização do MAT no estudo.

No.	Cepa	Sorogrupo	Sorovar
1	Fiocruz L1 130	Icterohaemorrhagiae	copenhageni
2	M20	Icterohaemorrhagiae	copenhageni
3	Hond Utrecht	Canicola	canicola
4	Akiyami A	Autumnalis	autumnalis
5	MUS 127	Ballum	ballum
6	Duyster	Grippotyphosa	grippotyphosa
7	Patoc 1	Semaranga	patoc

**5.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) IgM para leptospirose:** Os ELISAs para leptospirose foram realizados com o Kit de ELISA IgM indireto fornecido por biomanguinhos/Fiocruz segundo descrição de uso do fabricante. A leitura das microplacas foi realizada em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 450nm. A razão entre as densidades óticas (OD) obtidas para o soro dos pacientes e a média da OD dos soros controles foram usados para definir reatividade no ELISA IgM. Assim, a amostra foi definida como reagente quando apresentava a razão OD da amostra / OD do controles  $\geq 1,2$ , e não reagente quando esta razão foi  $< 1,2$ . Esse cálculo foi realizado através de uma programação realizada no espectrofotômetro TECAN.

**5.2.3. Sorogrupagem dos isolados:** Todos os isolados obtidos através das hemoculturas foram testados por MAT contra 20 soros hiper-ímmunes pertencentes a 20 sorogrupos distintos. O sorogrupo do isolado foi definido como sendo aquele cujo soro recíproco apresentou máximo título.

**5.2.4. Sorotipagem:** Foi utilizado um painel com 4 anticorpos monoclonais para identificação de sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae através da MAT com diluições seriadas que variaram de 1:100 a 1:51.200. O anticorpo Mab F70 C24 apresentava reação específica contra o sorovar copenhageni, o C14-10 contra sorovar Icterohaemorrhagiae, Mab F12 C3-11 contra sorovares Icterohaemorrhagiae e copenhageni e o Mab F89 C12 contra sorovares de outro sorogrupo que não Icterohaemorrhagiae. Para determinação do sorovar foi considerado o maior título no anticorpo específico. Os sorovares dos isolados que não pertenciam ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae não foram determinados.

### 5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

**5.3.1 Determinação do desempenho do diagnóstico sorológico com uso das amostras aguda precoce e aguda tardia:** Para determinar a sensibilidade do uso das amostras aguda precoce e aguda tardia para o diagnóstico de leptospirose por MAT e ELISA, foi avaliado apenas o grupo de pacientes em que foi possível coletar as 3 amostras de soro. A sensibilidade do MAT para o uso de amostras aguda precoce e aguda tardia foi determinada pela razão entre o número de vezes em que se confirmou o diagnóstico de leptospirose pelo MAT realizado nas amostras aguda precoce e tardia conforme os critérios de confirmação previamente definidos em comparação a dois diferentes critérios de certeza diagnóstica: 1) soroconversão, aumento maior ou igual a quatro vezes entre os títulos ou título  $\geq 1:800$  em pelo menos uma das amostras quando se testava as amostras aguda precoce e convalescente; e 2) hemocultura positiva para leptospira. A sensibilidade do ELISA para o uso de amostras aguda precoce e aguda tardia foi determinada pela razão entre o número de vezes em que se confirmou o diagnóstico de leptospirose pelo ELISA realizado nas amostras aguda precoce e tardia conforme os critérios de confirmação previamente definidos em comparação aos mesmos dois critérios de certeza diagnóstica. O valor preditivo negativo do MAT e do ELISA quando testadas as amostras aguda precoce e aguda tardia foram mensurados para determinar a frequência com que um resultado negativo no MAT ou no ELISA realizado nas amostras aguda precoce e tardia poderia predizer corretamente que o resultado permaneceria negativo após o teste por MAT da amostra convalescente.

**5.3.2 Análises estatísticas:** As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Epi Info para Windows v3.2 (CDC, Atlanta, GA, USA) . Foram calculados

intervalos de confiança de 95% para as medidas de sensibilidade e valores preditivos negativos. As características dos casos foram descritas através de frequências para variáveis categóricas, e através de médias e desvio padrão ou medianas e intervalo interquartil (IIQ) para variáveis contínuas paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Para comparação das proporções foi utilizado o teste chi-quadrado. Para comparação das variáveis contínuas foi utilizado o teste de Wilcoxon rank-sum e t de student. Um valor de  $p < 0.05$  em um teste bicaudal foi utilizado para definir diferenças estatisticamente significantes.

## **6- RESULTADOS**

### *Pacientes*

No período do estudo, a vigilância identificou 938 pacientes com suspeita clínica de leptospirose. A idade média dos pacientes foi de  $35 \pm 15$  anos e a maioria era do sexo masculino (85%). A maioria dos pacientes apresentavam manifestações clínicas de gravidade no momento da admissão hospitalar, sendo as mais frequentes a presença de icterícia (85%), 66% e 53% dos pacientes apresentavam creatinina  $>2$  mg/dL e uréia  $>100$  mg/dL, respectivamente), taquipnéia ( $\geq 28$ /min; 27%) e hemoptise (23%) (Tabela 2). A admissão em unidade de terapia intensiva foi necessária para 30% dos pacientes, enquanto que diálise e transfusão sanguínea foram realizadas em 24% e 15% dos pacientes, respectivamente. A taxa de letalidade observada foi de 16% (Tabela 2). As manifestações clínicas iniciais dos pacientes que tiveram as três amostras de sangue coletadas foram semelhantes àquelas observadas nos pacientes em que pelo menos uma das amostras não foi coletada. Entretanto, a evolução clínica dos pacientes que tiveram as três amostras de sangue coletadas foi menos grave do que a evolução nos pacientes em que pelo menos uma das amostras não foi coletada (frequência de admissão em UTI, 25% vs. 33%, respectivamente; letalidade, 2% vs. 26%, respectivamente (Tabela 2). Os pacientes com as três amostras coletadas foram mais frequentemente confirmados pelo MAT e tiveram mais frequentemente o ELISA IgM reagente (Tabela 2). No entanto, a frequência de positividade na hemocultura foi semelhante entre os dois grupos.



**Tabela 2.** Características dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose incluídos no estudo, de acordo com o número de amostras de sangue coletadas, Salvador, 2003-2009 (n=938).

Características	Número de amostras coletadas				Total n=938		Valor P <sup>b</sup>
	Três (n=362)		Duas ou menos (n=576) <sup>a</sup>		No.	N (%) ou Media ±DP	
	No.	N (%) ou Media ±DP	No.	N (%) ou Media ±DP			
Idade (anos)	361	35±15	575	35 ± 15	936	35 ± 15	1,00
Sexo	362	306 (84)	575	484 (84)	937	790 (85)	1,00
<b>Manifestações na admissão</b>							
Dias de sintomas	355	6 ± 3	563	6 ± 4	918	6 ± 3.5	0,50
Sufusão conjuntival	278	71 (25)	368	102 (28)	646	173 (27)	0,57
Icterícia	360	299 (83)	569	490 (86)	929	789 (85)	0,16
Frequência respiratória ≥28	320	88 (27)	457	132 (29)	777	220 (28)	0,63
Hemoptise	304	65 (21)	329	80 (24)	633	145 (23)	0,54
Oligúria	290	119 (41)	304	112 (37)	594	231 (39)	0,33
Creatinina >2mg/dL	346	225 (65)	426	275 (65)	772	500 (65)	1,00
Uréia >100 mg/dL	347	184 (53)	430	228 (53)	777	412 (53)	1,00
<b>Intervenções terapêuticas</b>							
Unidade de terapia intensiva	361	91 (25)	571	189 (33)	932	280 (30)	0,01
Transfusão de sangue	360	61 (17)	570	81 (14)	930	142 (15)	0,31
Diálise	361	82 (23)	571	146 (25)	932	228 (24)	0,54
<b>Evolução</b>							
S.H.P.S <sup>c</sup>	340	17 (5)	484	64 (13)	824	81 (10)	0,01
Óbito	360	7 (2)	573	148 (26)	933	155 (16)	0,01
<b>Diagnóstico laboratorial</b>							
Confirmação pelo MAT <sup>d</sup>	362	302 (83)	554	329 (60)	916	631 (69)	0,01
Confirmação pela cultura	150	36 (24)	125	27 (21)	275	63 (22)	0,40
Reagentes no ELISA IgM <sup>d</sup>	362	312 (86)	531	399 (72)	893	711 (80)	0,01

<sup>a</sup>Inclui pacientes com coleta de apenas amostra aguda precoce (n=183), de amostra aguda precoce e aguda tardia (n=226), de amostra aguda precoce e amostra convalescente (n=121), e sem coleta de amostra (n=40).

<sup>b</sup>Utilizamos o chi-quadrado para variáveis categóricas e t de student para as variáveis contínuas (valor P <0.05).

<sup>c</sup>Síndrome da hemorragia pulmonar severa. <sup>d</sup>Teste de aglutinação microscópica (MAT) e ELISA IgM.

### Coleta das amostras

Dos 938 pacientes identificados pela vigilância, foi possível coletar três amostras de sangue de 362 (40%) pacientes, amostras aguda precoce e aguda tardia de 226 (25%), amostras aguda precoce e convalescente de 121 (13%), e amostras aguda tardia e convalescente de 6 (2%). Para 183 (20%) pacientes só foi possível coletar a amostra aguda precoce e para 40 (4%) não foi possível coletar nenhuma amostra (Tabela 3).

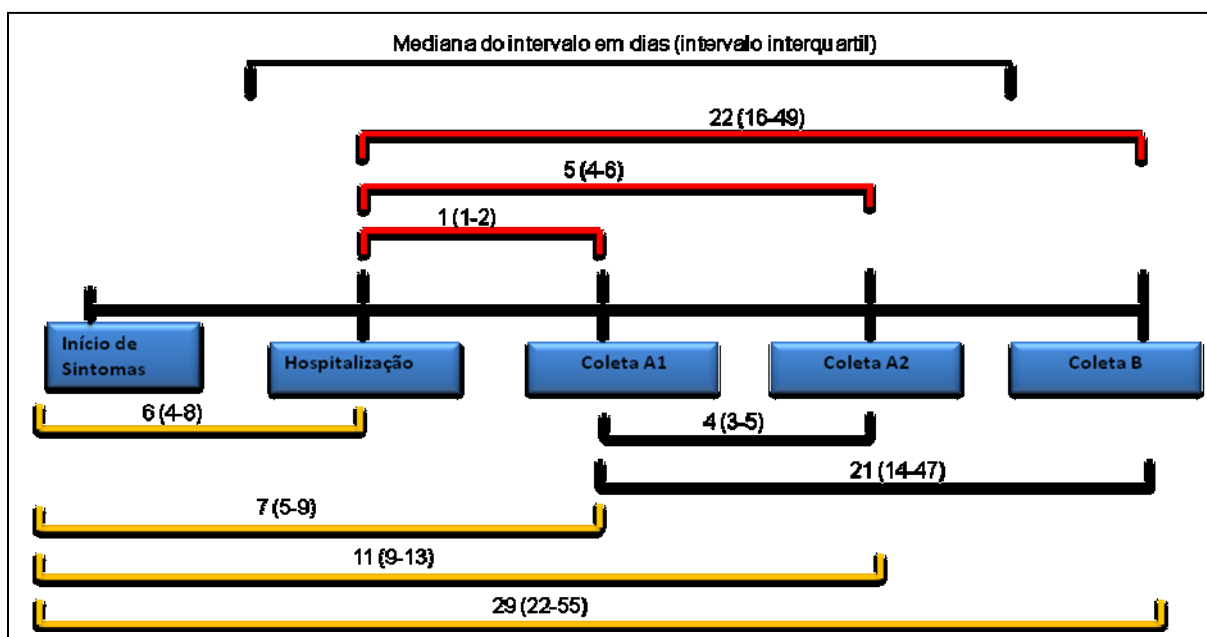
**Tabela 3.** Confirmação laboratorial dos 938 pacientes com suspeita clínica de leptospirose de acordo com tipo de soro coletado.

Critério de confirmação	Número de pacientes de acordo com o tipo de soro coletado						Total (n=938)
	Aguda precoce/ Aguda tardia/ convalescente (n=362)	Aguda precoce/ convalescente (n=121)	Aguda precoce/ Aguda tardia (n=226)	Aguda tardia/ convalescente (n=6)	Aguda precoce (n=183)	Nenhuma (n=40)	
	Número (%)						
<b>Confirmados</b>	302 (83)	97 (80)	180 (80)	5 (83)	58 (32)	1 (2)	<b>643 (68)</b>
Aumento de título <sup>a</sup>	232 (77)	66 (68)	139 (77)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	438 (68)
Título $\geq$ 1:800	70 (36)	31 (32)	41 (23)	4 (80)	47 (81)	0 (0)	193 (32)
Cultura <sup>b</sup>	36 (10)	2 (2)	12 (5)	0 (0)	12 (6)	1 (3)	63 (7)
<b>Prováveis<sup>c</sup></b>	3 (1)	2 (2)	5 (2)	0 (0)	30 (17)	0 (0)	<b>40(4)</b>
<b>Não confirmados<sup>d</sup></b>	57 (16)	22 (18)	41 (18)	1 (17)	94 (51)	40 (98)	<b>255 (27)</b>

**Nota.** MAT teste de aglutinação microscópica .

<sup>a</sup> Pacientes foram definidos como confirmados por aumento de título quando apresentaram soroconversão (de não reagente para  $\geq$ 1:200) ou quando apresentaram aumento de título maior ou igual que quatro vezes entre amostras pareadas. <sup>b</sup> Dos 938 pacientes, somente 282 tiveram coleta de hemocultura realizada, das quais 63 (22%) apresentaram crescimento de *Leptospira*. A maioria (81%) dos pacientes confirmados por cultura também foram confirmados por MAT. <sup>c</sup> Pacientes foram definidos como casos prováveis quando o MAT apresentou título em pelo menos uma amostra entre  $\geq$ 1:200 e  $<$ 1:800. <sup>d</sup> Os pacientes não confirmados não preencheram critérios para casos confirmados e prováveis.

Os intervalos entre início de sintomas, hospitalização e coleta das amostras estão descritos na figura 4. A mediana de dias entre o início dos sintomas e a hospitalização foi de 7 (IIQ: 5-9) dias. A mediana de dias entre o início dos sintomas e as coletas das amostras aguda precoce, aguda tardia e convalescente foram de 7 (5-9), 11(9-13) e 29 (22-55) dias, respectivamente. O intervalo mediano entre a hospitalização e as coletas da amostra aguda precoce, da amostra aguda tardia e da amostra convalescente foram de 1 (1-2), mediana de 5 (IIQ: 4-6) e 22 (IIQ: 16-49) dias, respectivamente. O intervalo mediano entre as coletas da amostra aguda precoce e da amostra aguda tardia foi de 4 (3-5) dias. O intervalo mediano entre as coletas da amostra aguda precoce e da amostra convalescente foi de 21 (14-47) dias (Figura 4).



**Figura 4.** Intervalos entre início de sintomas, hospitalização e coleta das amostras nos pacientes com suspeita clínica de leptospirose, (N=892).

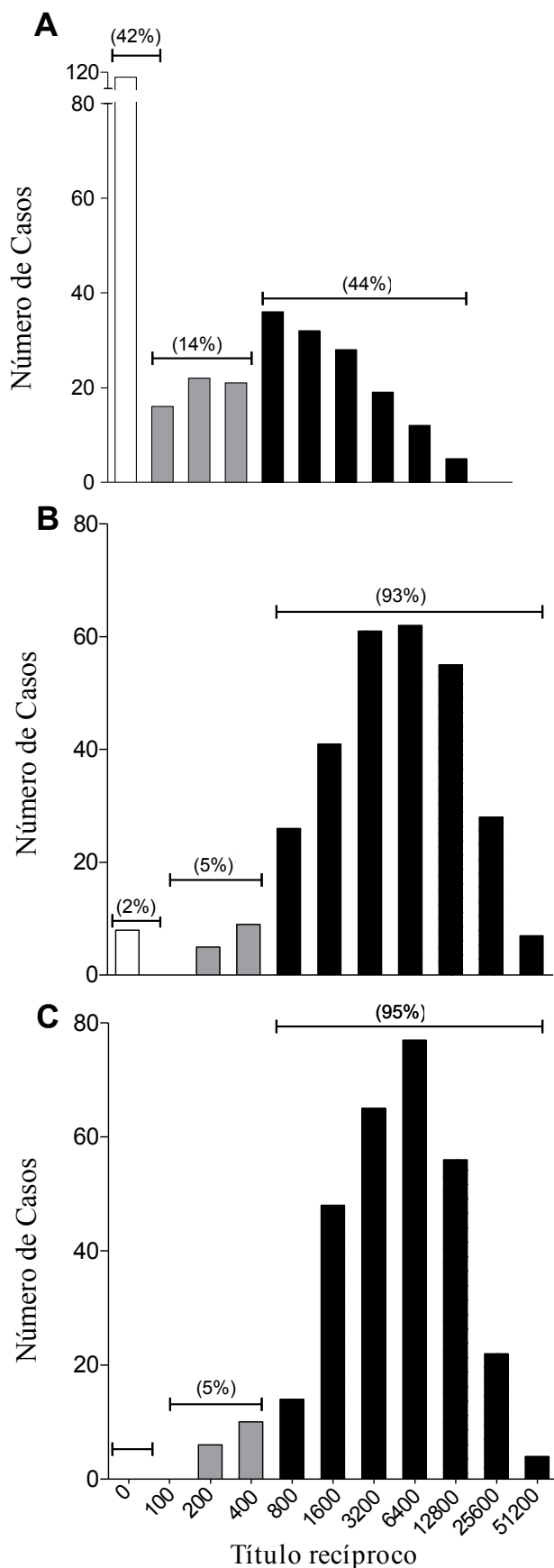
### *Confirmação laboratorial*

Dos 898 pacientes estudados que tiveram pelo menos uma amostra de sangue coletada, 643 (68%) foram confirmados por MAT ou hemocultura (Tabela 3). A

frequência de confirmação diagnóstica por MAT ou hemocultura no grupo de pacientes que tiveram as três amostras de sangue coletadas (83%, 302 de 362) foi semelhante àquelas obtidas para os pacientes que só tiveram coletadas as amostra aguda precoce e convalescente (80%, 97 de 121) e que só tiveram coletadas as amostras aguda precoce e aguda tardia (80%, 180 de 226). Entretanto, a frequência de confirmação diagnóstica por MAT ou hemocultura foi menor (32%, 58 de 183) para os pacientes que só tiveram a amostra aguda precoce coletada. Dos 938 pacientes estudados, 63 (7%) tiveram confirmação por hemocultura, entretanto somente 282 pacientes foram submetidos a avaliação diagnóstica por hemocultura, resultando em uma frequência de isolamento de *Leptospira spp.* de 22% (Tabela 3).

#### ***Desempenho do uso das amostras aguda precoce e aguda tardia no diagnóstico sorológico da leptospirose***

Para avaliação do desempenho do uso da amostra aguda precoce e da amostra aguda tardia no diagnóstico sorológico da leptospirose foi analisado apenas o grupo de pacientes que tiveram as 3 amostras coletadas. Os máximos títulos recíprocos obtidos pelo MAT realizado nas amostras aguda precoce, aguda tardia e convalescente dos 302 pacientes com as 3 amostras coletadas evidenciou que a distribuição de máximos títulos das amostras aguda tardia diferia daquela observada para as amostras aguda precoce mas era semelhante àquela observada para as amostras convalescentes (Figura 5A, B e C). Além disso, enquanto apenas 44% das amostras aguda precoce apresentaram máximo título no MAT  $\geq 1:800$ , 93% e 95% das amostras aguda tardia e convalescente tiveram máximo título  $\geq 1:800$ , respectivamente (Figura 5).



**Figura 5:** Distribuição dos títulos recíprocos no MAT dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose que tiveram as três amostras de sangue coletadas (n=302). As barras pretas, cinzas e brancas representam reações com título  $\geq 1:800$ , com título entre 1:100 e 1:400, e negativas, respectivamente. As proporções entre parênteses indicam a frequência de casos que apresentaram títulos recíprocos em uma das três categorias descritas anteriormente.

**Figura A.** Distribuição dos casos de acordo com os títulos recíprocos da amostra aguda precoce.

**Figura B.** Distribuição dos casos de acordo com os títulos recíprocos da amostra aguda tardia.

**Figura C.** Distribuição dos casos de acordo com os títulos recíprocos da amostra convalescente.

Dos 302 pacientes que tiveram as três amostras coletadas e foram confirmados por MAT ou hemocultura, 293 (97%) foram confirmados pelo MAT quando se considerou apenas as amostras aguda precoce e aguda tardia. Em contraste, somente 132 (44%) foram confirmados pelo MAT quando se considerou apenas o resultado da amostra aguda precoce (Tabela 4). Dos 48 pacientes que tiveram as amostras aguda precoce e aguda tardia coletadas e tiveram hemocultura positiva, 45 (94%) foram confirmados pelo MAT realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia enquanto que apenas 16 (33%) foram confirmados pelo MAT quando se considerou apenas a amostra aguda precoce (Tabela 4).

Dos 302 pacientes que tiveram as três amostras coletadas e foram confirmados por MAT, 297 tiveram as três amostras testadas por ELISA IgM. Destes, 294 (99%) foram reagentes no ELISA IgM realizado na amostra convalescente, 285 (96%) foram reagentes no ELISA IgM realizado na amostra aguda tardia e 222 (75%) foram reagentes no ELISA IgM realizado na amostra aguda precoce. Dos 47 pacientes com cultura positiva e confirmados por MAT na amostra convalescente, 46 (98%) foram reagentes no ELISA IgM realizado na amostra aguda tardia, enquanto que somente 32 (68%) foram reagentes no ELISA IgM realizado na amostra aguda precoce (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sensibilidade do MAT e do ELISA IgM para os 302 pacientes com as três amostras de soro coletadas e confirmação do diagnóstico de leptospirose por MAT realizado na amostra aguda precoce e convalescente ou cultura.

Amostras de soro testadas	Padrão ouro para o diagnóstico definitivo			
	Confirmação por MAT nas amostras aguda precoce e convalescente (N=302) <sup>a</sup>		Hemocultura positiva (N=48) <sup>b</sup>	
	n / N	Sensibilidade (IC 95%)	n / N	Sensibilidade (IC 95%)
<b>Por MAT</b>				
Aguda precoce / Aguda tardia	293 / 302	97 (94-99)	45 / 48	94 (83-99)
Apenas aguda precoce	132 / 302	44 (38-50)	16 / 48	33 (20-48)
<b>Por ELISA-IgM</b>				
Aguda precoce / Aguda tardia	285 / 297 <sup>c</sup>	96 (93-98)	46 / 47 <sup>d</sup>	98 (89-99)
Apenas aguda precoce	222 / 297 <sup>c</sup>	75 (69-79)	32 / 47 <sup>d</sup>	68 (53-81)

**Nota.** MAT, Teste de aglutinação microscópica.

<sup>a</sup> Pacientes que apresentaram soroconversão ou aumento de quatro vezes entre os títulos da amostra aguda precoce e da amostra convalescente ou que tiveram título máximo  $\geq 1:800$ .

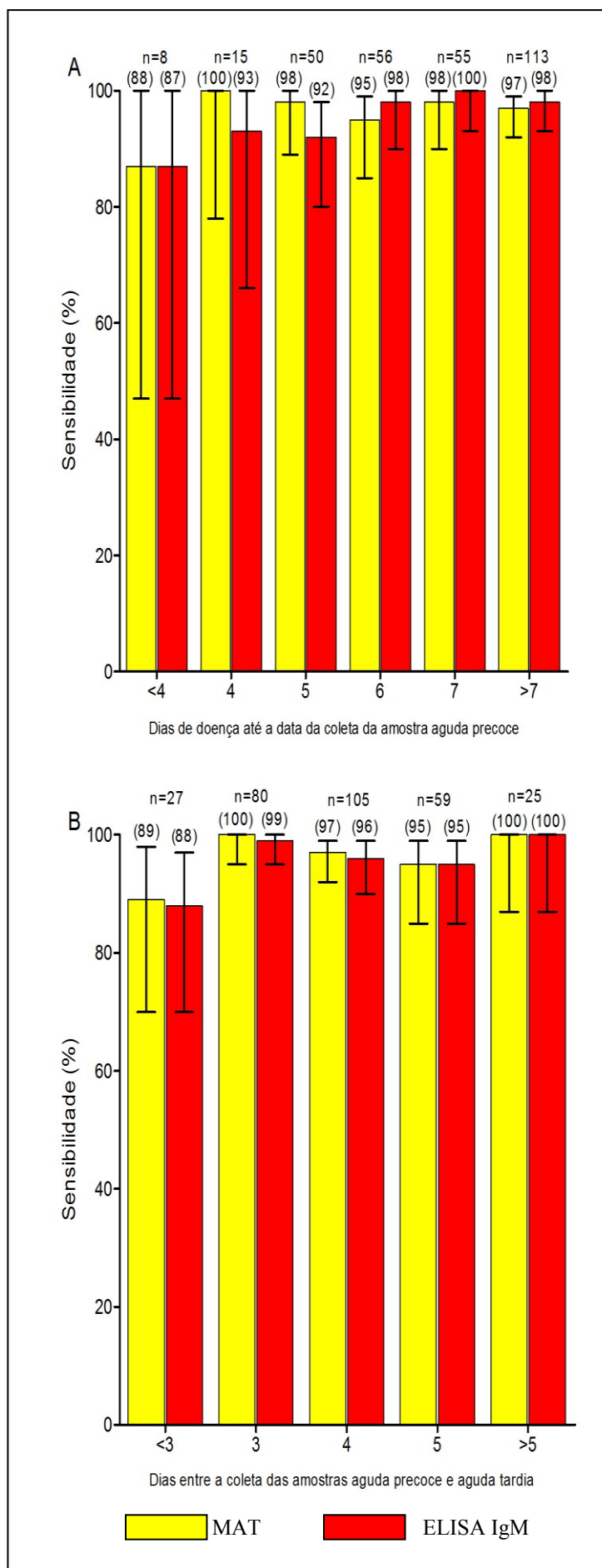
<sup>b</sup> Foram incluídos nesse grupo todos os pacientes com as três amostras coletadas (n=36) (MAT e ELISA confirmado para todos 36 pacientes) e com amostra aguda precoce e aguda tardia coletada (n=12).<sup>c</sup> Dados sobre ELISA IgM indisponíveis para 5 pacientes<sup>d</sup> Dados sobre ELISA IgM indisponíveis para 1 paciente.

Para avaliar a influência da duração da doença na sensibilidade do MAT e do ELISA realizados nas amostras aguda precoce e aguda tardia, as referidas sensibilidades foram estratificadas de acordo com o número de dias entre a data do início dos sintomas e a data da coleta da amostra aguda precoce (Figura 6A). Dos 302 pacientes confirmados por MAT ou hemocultura e com as três amostras coletadas, foi possível obter informações sobre dias de sintomas antes da hospitalização para 297



pacientes. Destes, somente 8 (3%) tiveram a coleta da amostra aguda precoce realizada com menos de 4 dias do início dos sintomas e somente 15 (5%) tiveram a coleta da amostra aguda precoce realizada no quarto dia do início dos sintomas. Os demais 274 (92%) pacientes tiveram a amostra aguda precoce coletada com cinco ou mais dias de sintomas, sendo que 113 (38%) tinham mais que sete dias de sintomas.

A sensibilidade para as amostras aguda precoce e aguda tardia comparadas às amostras aguda precoce e convalescente foi de 88% e 87% no grupo de pacientes que tinham menos de 4 dias de sintomas no MAT e ELISA IgM, respectivamente. Tanto a média quanto a mediana de dias entre a coleta das amostras aguda precoce e aguda tardia foi de 4 (3-5) dias. A partir de quatro dias de intervalo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra aguda precoce, a sensibilidade do MAT realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia se elevou para  $\geq 95\%$ . A sensibilidade do ELISA IgM realizados nas mesmas amostras foi de 92-93% quando o intervalo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra aguda precoce foi de 4-5 dias e  $\geq 98\%$  quando o intervalo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra aguda precoce foi maior que cinco dias (Figura 6A).



**Figura 6.** Sensibilidade do MAT e do ELISA IgM realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia em comparação ao resultado do MAT realizado nas amostras aguda precoce e convalescente.

**Figura A.** Sensibilidade do MAT e do ELISA IgM (n=292) estratificada pelo intervalo entre ao início dos sintomas e a coleta da amostra aguda precoce.

**Figura B.** Sensibilidade do MAT (n=297) e do ELISA IgM (n=287) estratificada pelo número de dias entre a coleta das amostras aguda precoce e aguda tardia.

Para avaliar a influência do intervalo entre as coletas das amostras aguda precoce e aguda tardia na sensibilidade do MAT e do ELISA realizados nas amostras aguda precoce e aguda tardia, as referidas sensibilidades foram estratificadas de acordo com o intervalo em dias entre as coletas destas amostras (Figura 6B). O intervalo entre as coletas das amostras aguda precoce e aguda tardia foi de 3 a 5 dias para 81% dos pacientes. A sensibilidade do MAT realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia foi de 88% e  $\geq 95\%$  quando o intervalo entre as coletas destas amostras foi  $< 3$  dias e  $\geq 3$  dias, respectivamente. A sensibilidade do ELISA IgM realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia foi  $\geq 95\%$ , independentemente do número de dias entre as coletas das amostras aguda precoce e aguda tardia. Estratificando os dados conforme o protocolo de coleta de amostra aguda tardia com intervalo de  $\geq 4$  dias da amostra aguda tardia, observamos que a média de dias de sintomas nesse grupo foi de 6 dias e mediana de 6 (4-7), o mesmo resultado de média e mediana foi observado nos pacientes em que a amostra aguda tardia foi coletada com intervalo de  $< 4$  dias da amostra aguda precoce (dados não demonstrados).

Os valores preditivos negativos observados para o MAT e o ELISA IgM considerando as amostra aguda precoce e aguda tardia em comparação às amostras aguda precoce e convalescente foram de 87% (60 de 69) e 84% (48 de 57), respectivamente.

### ***Confirmação por MAT dos pacientes que faleceram***

Dos 135 pacientes que faleceram e tiveram pelo menos uma amostra de sangue coletada, somente 42 (31%) deles foram confirmados por MAT. A disponibilidade das amostras aguda tardia e convalescente estiveram fortemente associadas a probabilidade de confirmação do diagnóstico pelo MAT neste grupo de pacientes (Tabela 5). A frequência de confirmação por MAT para os pacientes que faleceram e tiveram coletadas as três amostras foi de 57% (IC95% 18-90), para os que tiveram coletadas apenas as amostras aguda precoce e a amostra convalescente foi de 100% (16-100) e para os que tiveram coletadas apenas as amostras aguda precoce e a amostra aguda tardia foi de 72% (55-86). Em contraste, apenas 11% (5-19) dos pacientes que tiveram somente a amostra aguda precoce coletada foram confirmados por MAT.

A probabilidade de confirmação pelo MAT não diferiu quando comparados o grupo de pacientes que tiveram a amostra convalescente coletada ao grupo de pacientes que tiveram coletadas apenas as amostras aguda precoce e aguda tardia (P: 0,70; Teste bicaudal de Fisher). Entretanto, a coleta da amostra convalescente só ocorreu para 9 (6%) dos 135 pacientes que faleceram, enquanto que a coleta da amostra aguda tardia foi possível para 43 (32%) destes pacientes.

**Tabela 5.** Confirmação diagnóstica pelo teste de aglutinação microscópica para os pacientes que evoluíram para óbito e tiveram pelo menos uma amostra de sangue coletada, de acordo com os tipos de amostras coletadas (N=135).

Tipos de amostras	Número de amostras coletadas (%)	Amostras confirmadas por MAT		RR (95% IC)
		Número	% (95% IC)	
Aguda precoce / convalescente	2 (1)	2	100 (16-100)	9,00 (5,0-16,1)
Aguda precoce / aguda tardia/ convalescente	7 (5)	4	57 (18-90)	5,1 (2,2-12,3)
Aguda precoce /aguda tardia	36 (27)	26	72 (55-86)	6,5 (3,5-12,1)
Apenas aguda precoce	90 (67)	10	11 (5-19)	1,00
Pelo menos uma	135 (100)	42	31 (23-40)	-

*Uso da amostra aguda tardia para presumir o sorogrupo associado à infecção pelo MAT*

O sorogrupo da *Leptospira* associado à infecção foi presumido para os 302 pacientes confirmados por MAT ou cultura que tiveram as três amostras coletadas usando dois diferentes critérios: os máximos títulos do MAT obtidos para as amostras aguda precoce e aguda tardia e os máximos títulos do MAT para as amostras aguda precoce e convalescente. Foi observada uma concordância de 93% (280 de 302) quando comparados os sorogrupos presuntivos obtidos para as amostras aguda precoce e aguda tardia àqueles obtidos para as amostras aguda precoce e convalescente. Dos 302 pacientes confirmados, 288 (96%) reagiram para o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* com base no MAT das amostras aguda precoce e convalescente. Destes, 276 (96%) também tiveram como sorogrupo presuntivo o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* quando se considerou apenas o resultado do MAT para as amostras aguda precoce e aguda tardia (Tabela 6). Os resultados de sorogrupagem também revelou que o sorogrupo envolvido na infecção foi o *Icterohaemorrhagiae*, todos 63 isolados reagiram esse sorogrupo. A sorotipagem revelou que todos os isolados pertencem a um único clone do sorovar *copenhageni* (dados não demonstrados).

**Tabela 6.** Sorogrupo presuntivo do MAT realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia em comparação ao sorogrupo presuntivo do MAT realizado nas amostras aguda precoce e convalescente (N=302).

Sorogrupo presuntivo no MAT realizado nas amostras aguda precoce e aguda tardia	Sorogrupo presuntivo pelo MAT realizado nas amostras aguda precoce e convalescente ( n=302)			
	Icterohaemorrhagiae	Autumnalis	Grippothyphosa	Misto
	N (%)			
Icterohaemorrhagiae	276 (95.7)	-	-	7 (70.0)
Autumnalis	1 (0.3)	1 (33.3)	-	1 (10.0)
Grippothyphosa	-	-	1 (100)	
Misto	3 (1.0)	1 (33.3)	-	2 (20.0)
Não reagente	8 (3.0)	1 (33.4)	-	-
Total	288	3	1	10

### ***Oportunidade para coleta das amostras durante a hospitalização***

Para determinar a viabilidade de coletar as amostras aguda precoce, aguda tardia e convalescente enquanto durante o período de internação hospitalar, foi avaliada a duração da hospitalização de acordo com a evolução clínica.

Dos 927 (99% de 938) pacientes em que foi possível obter informação sobre a duração da hospitalização, 773(84%) sobreviveram e 154 (16%) faleceram. Dos 773 pacientes que sobreviveram e tinham informações sobre duração da hospitalização disponível, 663 (86%) ficaram internados por cinco dias ou mais e, segundo o protocolo de coleta de amostras utilizado neste estudo, teriam oportunidade de ter a amostra aguda tardia coletada durante a hospitalização. Em contraste, apenas 97 (13%) dos pacientes que sobreviveram ficaram internados por 15 dias ou mais e de acordo com o protocolo do estudo teriam oportunidade de ter a amostra convalescente coletada durante a hospitalização (Tabela 7).

Dos 154 pacientes que evoluíram para óbito e tinham informações sobre duração da hospitalização disponível, 49 (31%) ficaram internados por cinco dias ou mais e, segundo o protocolo de coleta de amostras do estudo, teriam oportunidade de ter a amostra aguda tardia coletada durante a hospitalização. Em comparação, apenas 15 (9%) dos pacientes que sobreviveram ficaram internados por 15 dias ou mais e, portanto teriam oportunidade de ter a amostra convalescente coletada durante a hospitalização (Tabela 7).



**Tabela 7.** Duração da hospitalização dos pacientes com suspeita de leptospirose, de acordo com a evolução clínica (n=927).

Duração de hospitalização (Dias)	Sobreviventes	Óbitos	Total
	(N=773)	(N=154)	(N=927) <sup>a</sup>
	Número (%)		
<b>0-2</b>	27 (4)	77 (50)	104 (11)
<b>3</b>	18 (2)	17 (11)	35(4)
<b>4</b>	65 (8)	11 (7)	76 (8)
<b>≥5</b>	663 (86)	49 (32)	712 (77)
<b>5-14</b>	566 (73)	34 (22)	600 (65)
<b>≥ 15</b>	97 (13)	15 (9)	112 (12)

<sup>a</sup>Dados sobre a duração da hospitalização só foram disponíveis para 927 (98%) dos 938 pacientes incluídos no estudo.

## **7. DISCUSSÃO**

As duas principais limitações em diagnosticar os casos de leptospirose são a indisponibilidade de um teste laboratorial sensível na fase inicial da doença e de amostras convalescentes para avaliação sorológica (LEVETT *et al.*, 2001). A obtenção da amostra convalescente ainda permanece um desafio, pois os pacientes habitualmente recebem alta antes de completar o intervalo recomendado para a coleta dessa amostra. Os pacientes incluídos neste estudo ficaram internados uma mediana de 6 dias, portanto a coleta da amostra convalescente no hospital não seria possível para a maioria dos pacientes. Nós coletamos apenas 12% das amostras convalescentes quando o paciente ainda estava internado. Para coleta das demais amostras foram enviados técnicos treinados nos domicílios dos pacientes. Essa atividade é trabalhosa e requer recursos para transporte de equipe não sendo disponível em muitos serviços de vigilância epidemiológica.

Outros grupos também chamam atenção para a dificuldade de coletar amostra convalescente. Um estudo realizado num hospital do Sirilanka através de vigilância hospitalar deixou de confirmar por MAT em 30% dos casos, pois não foi possível a coleta da amostra convalescente (DASSANAYAKE *et al.*, 2009). Em um estudo de avaliação de testes diagnósticos para leptospirose, amostras convalescentes foram coletadas de apenas 8% dos pacientes, e como consequência a confirmação pelo MAT e ELISA foi de apenas 50% dos casos (OOTEMAN *et al.*, 2005).

Uma estratégia potencial para reduzir este problema seria coletar uma segunda amostra aguda enquanto o paciente permanece internado no hospital. Esse protocolo foi utilizado em alguns trabalhos. Durante vigilância hospitalar para leptospirose em Barbados foi avaliado a sensibilidade da coleta de uma amostra aguda tardia no diagnóstico de casos confirmados por cultura (CUMBERLAND *et al.*, 1999).

Este estudo identificou que a sensibilidade do ELISA IgM foi de 52% na amostra da fase aguda precoce, aumentando para 89% e 93% nas amostra aguda tardia e convalescente, respectivamente. A especificidade do ELISA IgM e do MAT em todas amostras coletadas foi alta (94-97%). Outros estudos também utilizaram um protocolo de coleta de três amostras de sangue para avaliação de testes diagnósticos, mas eles não tinham como objetivo determinar a sensibilidade do uso da amostra aguda tardia (LEVETT *et al.*, 1998; LEVETT *et al.*, 2001).

Nosso trabalho demonstrou que a coleta de uma amostra no quinto dia de hospitalização é uma boa estratégia para diagnosticar os casos de leptospirose. A confirmação pelo MAT foi similar entre o grupo de pacientes que tiveram coletadas somente as duas amostras agudas (precoce e tardia) e o grupo de pacientes que tiveram coletadas as amostras aguda precoce e convalescente. Além disso, a distribuição dos máximos títulos no MAT foi igual para as amostras aguda tardia e convalescente. Nós demonstramos que para o grupo que teve as três amostras coletadas, o uso das amostras aguda precoce e aguda tardia resultou em alta sensibilidade (96-97%) tanto no MAT quanto no ELISA IgM, usando dois diferentes critérios de confirmação (amostras aguda precoce e convalescente confirmadas apenas por MAT ou hemocultura positiva).

Embora somente 32% dos nossos pacientes tivessem as três amostras coletadas e pudessem ser incluídas nas análises de sensibilidade, as características clínicas na admissão hospitalar do grupo com as três amostras coletadas foram semelhantes às do grupo que não teve as três amostras coletadas, sugerindo que o grupo com as três amostras coletadas era representativo para a população estudada.

Muito esforço tem sido feito para desenvolver testes diagnósticos para leptospirose mais sensíveis na fase aguda da doença (MCBRIDE *et al.*, 2007b; ZOCHOWSKI *et al.*, 2001; LEVETT *et al.*, 2002; LEVETT *et al.*, 2001; SMITS

*et al.*, 2001), em especial no formato de teste rápido que seria uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce da doença. No entanto, a baixa produção de anticorpos na primeira semana da doença faz do desenvolvimento de testes para uso na fase inicial da doença um desafio (SILVA *et al.*, 1995).

Em nosso estudo o ELISA IgM demonstrou uma sensibilidade de 75% na amostra aguda precoce coletada com até 3 dias de sintomas. Essa observação também já foi documentada anteriormente por outros trabalhos (ZOCHOWSKI *et al.*, 2001; LEVETT *et al.*, 2002; MCBRIDE *et al.*, 2007a; FONSECA *et al.*, 2006, HONARMAND *et al.*, 2010).

Os pacientes avaliados nesse estudo tinham uma mediana de 11(9-13) dias de sintomas até a coleta da amostra aguda tardia. Esse período foi suficiente para observar soroconversão e 4x de aumento no título entre as amostras no MAT. Alguns estudos observam aumento de sensibilidade da técnica a partir de 9 dias de sintomas e também conseguem identificar a soroconversão entre amostras nesse período (LEVETT *et al.*, 2001, MCBRIDE *et al.*, 2007b). Em outros estudos só foi possível observar aumento de sensibilidade a partir de 14 dias de doença (YERSIN *et al.*, 1999, BRANDÃO *et al.*, 1998). A sensibilidade na amostra aguda foi muito baixa, o que já foi descrito em vários estudos, principalmente nos primeiros dias da doença (FONSECA *et al.*, 2006; BLACKSELL *et al.*, 2006; MCBRIDE *et al.*, 2007b).

O intervalo entre a coleta da amostra aguda precoce e aguda tardia deve ser preferencialmente maior do que 3 dias. Visto que nos pacientes em que o intervalo foi de  $\leq 2$  dias, a sensibilidade foi de 88% no MAT quando avaliamos as amostras aguda precoce e tardia em comparação com as amostras aguda precoce e convalescente. Além disso, o desempenho do protocolo de coleta de amostras é mais eficiente (98% sensibilidade) em pacientes com 4 dias ou mais. Não foi observada diferença na

mediana e média de dias de sintomas entre os pacientes em que o intervalo entre a coleta das amostras aguda precoce e tardia foi realizada com <4 dias. Essa observação reforça que independente do intervalo entre a coleta das amostras aguda precoce e tardia os pacientes se encontram no mesmo momento da doença.

Considerando a duração de hospitalização dos pacientes que sobreviveram, a coleta da amostra aguda tardia seria possível para 86% dos pacientes, pois estes permaneceram de 5 a 14 dias internados. No entanto, a coleta da amostra convalescente seria possível para apenas 13%, pois permaneceram no hospital por 15 dias ou mais.

O sorogrupo presuntivo prevalente na avaliação pelo MAT foi o Icterohaemorrhagiae de acordo com sorogrupagem de isolados. Esse sorogrupo foi observado em sorogrupagens de 98% dos isolados de leptospira do Hospital Couto Maia de 1996-2011 (dados não publicados). Como há uma homogeneidade nos sorogrupos de *Leptospira* isolados de pacientes de Salvador, e como a produção de anticorpos pode variar em função da cepa envolvida na infecção, é possível que o protocolo de coleta de amostras proposto nesse trabalho não seja válido em outras regiões do mundo, onde existem outros sorogrupos circulantes. No entanto, os estudos conduzidos pelo grupo de Barbados utilizando a mesma metodologia de coleta de amostras do nosso trabalho, não observou diferença na sensibilidade da amostra aguda tardia mesmo ocorrendo infecções por leptospiras pertencentes a uma variedade de sorogrupos (LEVETT *et al.*, 2001; CUMBERLAND *et al.*, 1999).

Além disso, nosso estudo avaliou apenas pacientes hospitalizados e que foram internados relativamente tarde no curso da doença, já que apresentavam manifestações graves à admissão. É possível que nossos resultados não sejam válidos para pacientes com quadros clínicos mais leves ou que sejam hospitalizados mais precocemente.

Mesmo com essa limitação, nosso trabalho demonstrou que a coleta antecipada de amostras se mostrou uma boa estratégia para confirmação de casos por ELISA e MAT. Esse trabalho é de extrema importância para saúde pública, pois pode auxiliar no manejo clínico do paciente e nas ações de vigilância, incluindo a investigação de surtos.

## **8. CONCLUSÕES**

Este trabalho avaliou um novo protocolo de coleta de amostras para confirmação de casos de leptospirose por MAT e ELISA IgM e os resultados alcançados foram promissores, tanto no que diz respeito a viabilidade de execução quanto a sensibilidade diagnóstica.

A utilização da amostra aguda tardia elevou a sensibilidade do MAT de 44% para 97% e de 75% para 96% no ELISA quando comparadas sensibilidade das amostras agudas precoce apenas e da combinação aguda precoce e aguda tardia, respectivamente.

Para os pacientes que evoluíram para óbito esse protocolo não demonstrou um desempenho satisfatório.

## **9. RECOMENDAÇÕES**

1. Recomendamos que este protocolo de coleta de amostras que inclui a coleta da amostra aguda tardia seja avaliado em diferentes localidades do país para validá-lo como estratégia de confirmação laboratorial da leptospirose em diferentes contextos epidemiológicos.
2. Apesar da necessidade de estudos adicionais, em virtude dos resultados observados e do potencial benefício da coleta de amostras aguda tardia, sem acréscimo de riscos ou custos significativos, nós recomendamos o uso desse protocolo pelas vigilâncias epidemiológicas bem como pelos LACENs e outros laboratórios que assistem pacientes com suspeita de leptospirose.



## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDULKADER, R. C., E. F. DAHER, *et al.* Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.44, n.2, Mar-Apr, p.79-83. 2002.

ADLER, B., A. M. MURPHY, *et al.* Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol, v.11, n.5, May, p.452-7. 1980.

AHMAD, S. N., S. SHAH, *et al.* Laboratory diagnosis of leptospirosis. J Postgrad Med, v.51, n.3, Jul-Sep, p.195-200. 2005.

AHMED, A., M. F. ENGELBERTS, *et al.* Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. PLoS One, v.4, n.9, p.e7093. 2009.

ASHFORD, D. A., R. M. KAISER, *et al.* Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. Am J Trop Med Hyg, v.63, n.5-6, Nov-Dec, p.249-54. 2000.

BABUDIARI, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis. Bull World Health Organ, v.24, p.45-58. 1961.

BAJANI, M. D., D. A. ASHFORD, *et al.* Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol, v.41, n.2, Feb, p.803-9. 2003.

BHARADWAJ, R., A. M. BAL, *et al.* An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. Jpn J Infect Dis, v.55, n.6, Dec, p.194-6. 2002.

BHARTI, A. R., J. E. NALLY, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis, v.3, n.12, Dec, p.757-71. 2003

BLACKSELL, S. D., L. SMYTHE, *et al.* Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* immunoglobulin M antibodies in Laos. Clin Vac Imm, v.13, n.10, Oct, p.1166-1169. 2006.

BOURHY, P., L. COLLET, *et al.* Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.6, p.e724. 2010.

BOVET, P., C. YERSIN, *et al.* Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). Int J Epidemiol, v.28, n.3, Jun, p.583-90. 1999.

BRANDAO, A. P., E. D. CAMARGO, *et al.* Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol, v.36, n.11, Nov, p.3138-42. 1998.

BROWN, P. D., D. G. CARRINGTON, *et al.* Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. Res Microbiol, v.154, n.8, Oct, p.581-6. 2003.

CALDAS, E. M. & M. B. SAMPAIO. Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brazil: a case-control seroepidemiologic study. Int J Zoonoses, v.6, n.2, Dec, p.85-96. 1979.

CAMPANELLA, N. Infectious diseases and natural disasters: the effects of Hurricane Mitch over Villanueva municipal area, Nicaragua. Public Health Rev, v.27, n.4, p.311-9. 1999.

CERQUEIRA, G. M. & M. PICARDEAU. A century of *Leptospira* strain typing. Infect Genet Evol, v.9, n.5, Sep, p.760-8. 2009.

CHARON, N. W., R. C. JOHNSON, *et al.* Amino acid biosynthesis in the spirochete *Leptospira*: evidence for a novel pathway of isoleucine biosynthesis. J Bacteriol, v.117, n.1, Jan, p.203-11. 1974.

CHIRATHAWORN, C., Y. KAEWOPAS, *et al.* Comparison of a slide agglutination test, LeptoTek Dri-Dot, and IgM-ELISA with microscopic agglutination test for *Leptospira* antibody detection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v.38, n.6, Nov, p.1111-4. 2007.

COLE, J. R., JR., C. R. SULZER, *et al.* Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol*, v.25, n.6, Jun, p.976-80. 1973.

CRODA, J., J. G. RAMOS, *et al.* *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol*, v.45, n.5, May, p.1528-34. 2007.

CUMBERLAND, P., C. O. EVERARD, *et al.* Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*, v.61, n.5, Nov, p.731-4. 1999.

DA SILVA, E. F., S. R. FELIX, *et al.* Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. *Am J Trop Med Hyg*, v.83, n.2, Aug, p.336-7. 2010.

DASSANAYAKE, D. L., H. WIMALARATNA, *et al.* Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis*, v.9, p.48. 2009.

DE ABREU FONSECA, C., V. L. TEIXEIRA DE FREITAS, *et al.* Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop Med Int Health*, v.11, n.11, Nov, p.1699-707. 2006.

DEY, S., C. M. MOHAN, *et al.* Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. *Indian J Med Res*, v.128, n.2, Aug, p.172-7. 2008.

DIAS, J. P., M. G. TEIXEIRA, *et al.* Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.40, n.5, Sep-Oct, p.499-504. 2007.

DOLHNIKOFF, M., T. MAUAD, *et al.* Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. Braz J Infect Dis, v.11, n.1, Feb, p.142-8. 2007.

DUPONT, H., D. DUPONT-PERDRIZET, *et al.* Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. Clin Infect Dis, v.25, n.3, Sep, p.720-4. 1997.

EFFLER, P. V., A. K. BOGARD, *et al.* Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. J Clin Microbiol, v.40, n.4, Apr, p.1464-9. 2002.

ELLINGHAUSEN, H. C., JR. & W. G. MCCULLOUGH. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. Am J Vet Res, v.26, Jan, p.45-51. 1965.

FAINE, S. *Leptospira and Leptospirosis*. v.Second Edition. 1999.

FARR, R. W. Leptospirosis. Clin Infect Dis, v.21, n.1, Jul, p.1-6; quiz 7-8. 1995.

FLANNERY, B., D. COSTA, *et al.* Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol, v.39, n.9, Sep, p.3303-10. 2001.

GALLOWAY, R. L. & P. N. LEVETT. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.9. 2010.

GOUVEIA, E. L., J. METCALFE, *et al.* Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. Emerg Infect Dis, v.14, n.3, Mar, p.505-8. 2008.

GUIA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA. Ministério da Saúde. 6ª edição. 2005

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology, v.146 ( Pt 7), Jul, p.1491-504. 2000.

HAAKE, D. A., M. DUNDOO, *et al.* Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. Clin Infect Dis, v.34, n.9, May 1, p.e40-3. 2002.

HERRMANN, J. L., C. BARIL, *et al.* Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. J Bacteriol, v.173, n.23, Dec, p.7582-8. 1991.

HERRMANN, J. L., E. BELLENGER, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis of Not I digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. J. Clin Microbiol, v.30, p.1696–1702. 1992.

HONARMAND, H.Z., G. ABDOLLAHPOUR, *et al.* Comparison of Two ELISA Methods for the Laboratory Diagnosis of Acute Leptospirosis. Iran J Med Sci, v.35, n.2, p.116, Jun. 2010.

IDO, Y., R. HOKI, *et al.* The Rat as a Carrier of *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*, the Causative Agent of Weil's Disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). J Exp Med, v.26, n.3, Sep 1, p.341-53. 1917.

INADA, R., Y. IDO, *et al.* The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). J Exp Med, v.23, n.3, Mar 1, p.377-402. 1916.

JOHNSON, M. A., H. SMITH, *et al.* Environmental exposure and leptospirosis, Peru. Emerg Infect Dis, v.10, n.6, Jun, p.1016-22. 2004.

JOHNSON, R. C., & S. FAINE. *Leptospira*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* Md, p. 62–67. 1984.

JORGE, R. S., F. FERREIRA, *et al.* Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.106, n.4, Jun, p.441-4. 2011.

KATZ, A. R., P. V. EFFLER, *et al.* Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii, 1979-1998. Trop Med Int Health, v.8, n.7, Jul, p.639-42. 2003.

KENNEDY, N. D., C. D. PUSEY, *et al.* Leptospirosis and acute renal failure-clinical experiences and a review of the literature. Postgrad Med J, v.55, n.641, Mar, p.176-9. 1979.

KO, A. I., M. GALVAO REIS, *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet, v.354, n.9181, Sep 4, p.820-5. 1999.

KO, A. I., C. GOARANT, *et al.* Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 7: 736-47 p. 2009.

KOIZUMI, N. & H. WATANABE. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine, v.22, n.11-12, Mar 29, p.1545-52. 2004.

KRAMER, K. J., L. W. PANG, *et al.* Evaluation of the quantitative buffy coat analysis (QBC) system for the detection of *Leptospira* in human blood. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v.25, n.4, Dec, p.788-9. 1994.

KUSUM, M., N. BOONSARTHORN, *et al.* Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in northeastern region, Thailand. J Med Assoc Thai, v.88, n.8, Aug, p.1098-102. 2005.

LESHEM, E., G. SEGAL, *et al.* Travel-related leptospirosis in Israel: a nationwide study. Am J Trop Med Hyg, v.82, n.3, Mar, p.459-63. 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, v.14, n.2, Apr, p.296-326. 2001.

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clin Infect Dis, v.36, n.4, Feb 15, p.447-52. 2003.

LEVETT, P. N., S. L. BRANCH, *et al.* Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. Am J Trop Med Hyg, v.62, n.1, Jan, p.112-4. 2000.

LEVETT, P. N., S. L. BRANCH, *et al.* Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. Clin Diagn Lab Immunol, v.8, n.2, Mar, p.349-51. 2001.

LEVETT, P. N. & C. U. WHITTINGTON. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. J Clin Microbiol, v.36, n.1, Jan, p.11-4. 1998.

LIU, D., M. L. LAWRENCE, *et al.* PCR detection of pathogenic *Leptospira* genomospecies targeting putative transcriptional regulator genes. Can J Microbiol, v.52, n.3, Mar, p.272-7. 2006.

MAJED, Z., E. BELLENGER, *et al.* Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. J Clin Microbiol, v.43, n.2, Feb, p.539-45. 2005.

MAROTTO, P. C., C. M. NASCIMENTO, *et al.* Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. Clin Infect Dis, v.29, n.6, Dec, p.1561-3. 1999.

MARTIN, L., & A. PETTIT. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. Bull Mem Soc Med Hop Paris, v.42, p. 672–675. 1918.

MATSUNAGA, J., M. A. BAROCCHI, *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol, v.49, n.4, Aug, p.929-45. 2003.

MATTHIAS, M. A., J. N. RICALDI, *et al.* Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.4, p.e213. 2008.

MCBRIDE, A. J., D. A. ATHANAZIO, *et al.* Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis, v.18, n.5, Oct, p.376-86. 2005.

MCBRIDE, A. J., F. A. PEREIRA, *et al.* Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. Acta Trop, v.102, n.3, Jun, p.206-11. 2007 a.

MCBRIDE, A. J., B. L. SANTOS, *et al.* Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. Clin Vaccine Immunol, v.14, n.9, Sep, p.1245-8. 2007b.

MCBRIDE, W.J. Infections in travells arriving from Austrália. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.102, n.4, Apr, p.312-3, EPUB-Mar, 2008.

MERIEN, F., P. AMOURIAUX, *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol, v.30, n.9, Sep, p.2219-24. 1992.

MERIEN, F., D. PORTNOI, *et al.* A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett, v.249, n.1, Aug 1, p.139-47. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Guia leptospirose: Diagnóstico e Manejo clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em saúde. 2009.

MORGAN, J., S. L. BORNSTEIN, *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. Clin Infect Dis, v.34, n.12, Jun 15, p.1593-9. 2002.

MYERS, D. M. & V. M. VARELA-DIAZ. The occurrence of leptospiral antibodies in rural inhabitants of Argentina. Trop Geogr Med, v.31, n.2, Jun, p.269-74. 1979.

NAJERA, S., N. ALVIS, *et al.* [Occupational leptospirosis in a Colombian Caribbean area]. Salud Publica Mex, v.47, n.3, May-Jun, p.240-4. 2005.



NALLY, J. E., C. CHANTRANUWAT, *et al.* Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. Am J Pathol, v.164, n.3, Mar, p.1115-27. 2004.

NOGUCHI, M.D., R.H. MULLER, *et al.* Experimental studies of yellow fever in northern Brazil, Monograph of the Rockefeller Institute for Medical Research, No.20.1924.

OLIVEIRA, D. S., M. J. GUIMARAES, *et al.* The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. Ann Trop Med Parasitol, v.103, n.2, Mar, p.149-57. 2009.

OOTEMAN, M. C., A. R. VAGO, *et al.* Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. J Microbiol Methods, v.65, n.2, May, p.247-57. 2006.

PARK, S. K., S. H. LEE, *et al.* Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. Am J Trop Med Hyg, v.41, n.3, Sep, p.345-51. 1989.

PEROLAT, P., R. J. CHAPPEL, *et al.* *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. Int J Syst Bacteriol, v.48 Pt 3, Jul, p.851-8. 1998.

RALPH, D., M. MCCLELLAND, *et al.* *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. J Bacteriol, v.175, n.4, Feb, p.973-81. 1993.

RAMADASS, P., B. D. JARVIS, *et al.* Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol, v.42, n.2, Apr, p.215-9. 1992.

REIS, R. B., G. S. RIBEIRO, *et al.* Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.4, p.e228. 2008.

ROMERO, E. C., C. C. BERNARDO, *et al.* Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.45, n.5, Sep-Oct, p.245-8. 2003.

SARKAR, U., S. F. NASCIMENTO, *et al.* Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am J Trop Med Hyg, v.66, n.5, May, p.605-10. 2002.

SCIALFA, E., J. BOLPE, *et al.* Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol, v.42, n.2, Apr-Jun, p.126-8. 2010.

SEHGAL, S. C., P. VIJAYACHARI, *et al.* Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol, v.52, n.Pt 10, Oct, p.897-901. 2003.

SEJVAR, J., E. BANCROFT, *et al.* Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerg Infect Dis, v.9, n.6, Jun, p.702-7. 2003.

SILVA, E. F., M. A. MEDEIROS, *et al.* The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine, v.25, n.33, Aug 14, p.6277-86. 2007.

SILVA, M. V., E. D. CAMARGO, *et al.* Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. J Trop Med Hyg, v.98, n.4, Aug, p.268-72. 1995.

SIMPSON, F. G., K. A. GREEN, *et al.* Leptospirosis associated with severe pulmonary haemorrhage in Far North Queensland. Med J Aust, v.169, n.3, Aug 3, p.151-3. 1998.

SLACK, A. Leptospirosis. Aust Fam Physician, v.39, n.6, Jun-Jul, p.495-8. 2010.

SLACK, A. T., M. F. DOHNT, *et al.* Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its

application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. Ann Clin Microbiol Antimicrob, v.4, p.10. 2005.

SMITS, H. L., Y. V. ANANYINA, *et al.* International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. J Clin Microbiol, v.37, n.9, Sep, p.2904-9. 1999.

SMITS, H. L., C. K. EAPEN, *et al.* Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. Clin Diagn Lab Immunol, v.8, n.1, Jan, p.166-9. 2001.

SMITS, H. L., M. A. VAN DER HOORN, *et al.* Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol, v.38, n.3, Mar, p.1272-5. 2000.

SMYTHE, L. D., I. L. SMITH, *et al.* A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis, v.2, Jul 8, p.13. 2002.

STERN EJ, G. R., SHADOMY SV, *et al.* Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. Clin Infect Dis, v.50, n.6, Mar 15, p.843. 2010.

SOUZA, A.I, J.M. NOGUEIRA, *et al.* Anti-*Leptospira* antibodies in patients in the State of Mato Grosso do Sul with clinical suspicion of dengue or viral hepatitis. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.4, Jul-Aug, p.431-5. 2007.

TANSUPHASIRI, U., S. DEEPRADIT, *et al.* Two simple immunoassays using endemic leptospiral antigens for serodiagnosis of human leptospirosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v.36, n.2, Mar, p.302-11. 2005.

TERPSTRA, W. J., H. KORVER, *et al.* The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg, v.259, n.4, Jul, p.498-506. 1985.

THIERMANN, A. B. Incidence of leptospirosis in the detroit rat population. Am J Trop Med Hyg, v.26, n.5 Pt 1, Sep, p.970-4. 1977.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. J Am Vet Med Assoc, v.184, n.6, Mar 15, p.722-5. 1984.

TREVEJO, R. T., J. G. RIGAU-PEREZ, *et al.* Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. J Infect Dis, v.178, n.5, Nov, p.1457-63. 1998.

TRUCCOLO, J., O. SERAIS, *et al.* Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. FEMS Microbiol Lett, v.204, n.2, Nov 13, p.317-21. 2001.

UNITED NATIONS. The challenge of slums: global report on human settlements. Nairobi: UN-Habitat; 2003.

VANASCO, N. B., J. LOTTESBERGER, *et al.* [Diagnosis of leptospirosis: evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay in different stages of the disease]. Rev Panam Salud Publica, v.21, n.6, Jun, p.388-95. 2007.

VIJAYACHARI, P., S. C. SEHGAL, *et al.* *Leptospira interrogans* serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands. J Med Microbiol, v.52, n.Pt 10, Oct, p.913-8. 2003.

VIJAYACHARI, P., A. P. SUGUNAN, *et al.* Evaluation of Lepto Dri Dot as a rapid test for the diagnosis of leptospirosis. Epidemiol Infect, v.129, n.3, Dec, p.617-21. 2002.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis, v.14, n.5, Oct, p.527-38. 2001.

VINETZ, J. M., G. E. GLASS, *et al.* Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med, v.125, n.10, Nov 15, p.794-8. 1996.

VINH, T., B. ADLER, *et al.* Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. J Gen Microbiol, v.132, n.1, Jan, p.103-9. 1986.

WASIŃSKI, B., Z. PEJSAK, *et al.* Occurrence of leptospiral infections in swine population in Poland evaluated by ELISA and microscopic agglutination test. Pol J Vet Sci, v.13, n.4, p.695-9. 2011.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta, WHO 2003.

YASUDA, P.H., A.G. STEIGERWALT, *et al.* Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol, v.37, p.407-415. 1987.

YERSIN, C., P. BOVET, *et al.* Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. Trop Med Int Health, v.4, n.1, Jan, p.38-45. 1999.

ZOCHOWSKI, W. J., M. F. PALMER, *et al.* An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK. J Clin Pathol, v.54, n.1, Jan, p.25-30. 2001.



## ANEXO I

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde  
Faculdade de Medicina da Universidade de Yale

**Consentimento para Menores para Investigação Clínica**

**Título do Projeto:** Epidemia Urbana de Leptospirose em Salvador, Brazil: Um Estudo da Apresentação Clínica e Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico Rápido.

**Paciente:** \_\_\_\_\_ **Nº Projeto de**

**Pesquisa:** \_\_\_\_\_

Para ser lido para todos os pacientes menores de idade: Se você for o pai ou a mãe de uma criança ou um adolescente menor de idade que está convidado (a) a participar deste estudo, favor notar que “você” neste formulário se refere a seu filho. As informações a seguir descrevem o estudo e o seu papel como participante. O entrevistador responderá quaisquer perguntas que você tiver sobre esse questionário e sobre o estudo de pesquisas. Por favor ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre as informações fornecidas.

Nós estamos pedindo para você nos ajudar porque você tem uma doença. Muitos sinais desta doença são similares a doença causada por ratos que se chama Leptospirose. Nós não sabemos se você no momento tem esta doença. Nós gostaríamos de conseguir o máximo de informações possíveis sobre sua doença para que possamos entender quem tem ou não tem Leptospirose. Essa informação ajudará a identificar e tratar outras pessoas com essa doença no futuro.

Se você concordar em ajudar, nós faremos a você e a seus pais algumas perguntas. Pediremos pegar uma pequena quantidade de sangue (1/2 de um copinho de café) de seu braço com uma agulha e isso pode causar alguma dor e talvez, uma pequena mancha. Nós também coletaremos uma pequena quantidade (uma colher de sopa) de fluido da sua boca and lhe pediremos para urinar num recipiente para que nós possamos obter uma amostra de sua urina. Pediremos que você retorne para uma breve revisão em três a quatro semanas. Pegaremos de novo uma pequena quantidade de sangue (1/2 de um copinho de café) de seu braço com uma agulha quando você voltar para que nós possamos verificar se você teve leptospirose. A quantidade de sangue que nós iremos retirar é pequena e não vai te prejudicar. Nós só iremos te fazer algumas perguntas se você e seus pais concordarem.

**Consentimento:** Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, concordo voluntariamente em participar:

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente Menor de Idade

\_\_\_\_\_  
Hora



Impressão Digital do Paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Investigador

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

## ANEXO II



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

## Questionário V01EPI01

Projeto: Vigilância

Parte: 1 de 2

Nº Vigilância: \_\_\_\_\_

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

Etiqueta		1ª Digitação		2ª Digitação	
		DGEPI	DDGEPI	DG2EPI	DDG2EPI

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

1.1	Nº de Vigilância (VIGI):	VIGI	____
1.2	Nº de registro no HCM (REG):	REG	____
1.3	Data de admissão no HCM (DOA):	DOA	____/____/____
1.4	Data da Entrevista (DEEPI):	DEEPI	____/____/____
1.5	Iniciais do Entrevistador (INEI):	INEI	____
1.6	Data de nascimento (DATANASC):	DATANASC	____/____/____
1.7	Idade (AGE):	AGE	____
1.8	Sexo (SEX):      Masculino <input type="checkbox"/> 1      Feminino <input type="checkbox"/> 0	SEX	____

**II. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTORIA PRÉVIA: (999=não sabe) (888=não se aplica)**

2.1	Há quantos dias começaram os sintomas deste doença? (Preencher o número de dias de sintomas até a data da internação; se os sintomas foram iniciados no mesmo dia da internação preencher com 000; 999=não sabe)	DCS	____
2.2	Diagnóstico prévio foi Leptospirose: Lepto <input type="checkbox"/> 1      Dengue <input type="checkbox"/> 2      Outro diag. <input type="checkbox"/> 0      Não sabe <input type="checkbox"/> 9	DGP	____





3.4	TGO(9999=não sabe) Data:	TGO  _ _ _ _ _  TGOD  _ _ / _ _ / _ _
3.5	TGP: (9999=não sabe) Data:	TGP  _ _ _ _ _  TGPD  _ _ / _ _ / _ _
3.6	Uréia: (99=não sabe) Data:	UREA  _ _ _  UREAD  _ _ / _ _ / _ _
3.7	Creatinina: (99,99=não sabe) Data:	CREA  _ _ _ _ _  CREAD  _ _ / _ _ / _ _
3.8	Potássio: (9,9=não sabe) Data:	K  _ _ _  KD  _ _ / _ _ / _ _
3.9	Bilirrubina indireta: (99,99=não sabe) Data:	BILI  _ _ _ _ _  BILID  _ _ / _ _ / _ _
3.10	Bilirrubina direta (99,99=não sabe) Data:	BILD  _ _ _ _ _  BILDD  _ _ / _ _ / _ _
3.11	CPK (9999=não sabe) Data:	CPK  _ _ _ _ _  CPKD  _ _ / _ _ / _ _

#### IV. INFORMAÇÕES SOBRE ATENDIMENTO ANTES DO HCM

4.1	O Sr. Estava doente há quantos dias quando procurou atendimento pela primeira vez por causa desta doença:	DPATEND  _ _
4.2	Antes de ser internado no HCM o Sr consultou algum posto de saúde ou pronto atendimento? Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/>	ATENDPS  _
4.3	Se Sim, quantas vezes o Senhor procurou atendimento medico antes de ser internado?	NVATEND  _ _





5.5	Mora no Subúrbio Ferroviário (SUF)	Sim :	<input type="checkbox"/> 1	Não :	<input type="checkbox"/> 0	
5.6	Mora em Pau da Lima/São Marcos (PLM):	Sim :	<input type="checkbox"/> 1	Não :	<input type="checkbox"/> 0	
	Se sim, participa do L16?	Sim :	<input type="checkbox"/> 1	Não :	<input type="checkbox"/> 0	NSA <input type="checkbox"/> 8
	Se sim, faz parte da Subcoorte:	Sim :	<input type="checkbox"/> 1	Não :	<input type="checkbox"/> 0	NSA <input type="checkbox"/> 8
	Se sim, faz parte do Censo 2008	Sim :	<input type="checkbox"/> 1	Não :	<input type="checkbox"/> 0	NSA <input type="checkbox"/> 8
	Se sim, participa do L28?	Sim :	<input type="checkbox"/> 1	Não :	<input type="checkbox"/> 0	NSA <input type="checkbox"/> 8
	Se sim, qual o IDNO?					<input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>