

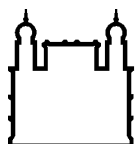
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE SAÚDE

FREQUÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM PACIENTES FEBRIS
ATENDIDOS EM HOSPITAIS DE MOÇAMBIQUE (2012 – 2014)

POLICARPO PAULINO ANTÓNIO RIBEIRO

RIO DE JANEIRO
JULHO, 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde

POLICARPO PAULINO ANTÓNIO RIBEIRO

Frequência da leptospirose em pacientes febris atendidos em Hospitais de Moçambique (2012 - 2014)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo (PhD)
Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros (PhD)
Dr^a Sádía Ali Pereira (Msc)

RIO DE JANEIRO
JULHO, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS
PARA A **VERSÃO FINAL DA TESE.**

Ribeiro, Policarpo Paulino Antonio .

Frequência da leptospirose em pacientes febris atendidos em hospitais de Moçambique (2012 - 2014) / Policarpo Paulino Antonio Ribeiro. - Maputo, 2017.

xviii 80 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

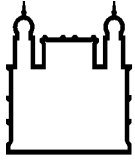
Orientador: Eduardo Samo Gudo.

Co-orientador: Marcos Alberto Medeiros.

Co-orientadora: Sadia Ali Pereira.

Bibliografia: f. 47-55

1. Leptospirose. 2. doença febril. 3. chuvas em Moçambique. 4. África subsaariana. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde

POLICARPO PAULINO ANTÓNIO RIBEIRO

**Frequência da leptospirose em pacientes febris atendidos em Hospitais de
Moçambique (2012 - 2014)**

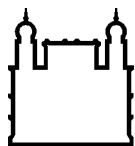
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo (PhD)
Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros (PhD)
Dr^a Sádía Ali Pereira (Msc)

Aprovado em: 13/07/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida - IOC/FIOCRUZ (Presidente)
Prof. Dr. Nilesh Bhatt – INS/Moçambique (Oponente)
Prof. Dr^a. Nilsa de Deus - INS/Moçambique (Oponente)
Prof. Dr^a. Alda Maria da Cruz - IOC/FIOCRUZ (Suplente)
Prof. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira - INI/FIOCRUZ (Suplente)

Rio de Janeiro, 13 de Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, minha querida e amada esposa Marta Ribeiro que sempre soube me dar apoio nos momentos bons e maus, aos meus filhos Wilson, Shanty, Ayane e Júnior que sempre foram e serão a fonte da minha inspiração.
Aos meus pais, e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso que me permitiu estar ainda neste mundo.

Aos meus pais (Paulino Ribeiro e Beatriz Moisés) pelos ensinamentos transmitidos e que me fizeram a pessoa que sou hoje, o meu muito obrigado.

Aos meus irmãos (Moisés Ribeiro e Júlia António) pelo apoio incondicional. Vocês sempre estiveram comigo nos bons e maus momentos. A minha família que sempre me apoiou das vezes que não podia lhes dar atenção por causa dos artigos que tinha que lêr, e das viagens que tinha que fazer. Vocês são tudo para mim. A minha Avô Lídia pela alegria que me tem proporcionado. Aos meus tios, primos, sobrinhos cunhadas e amigos que direta ou indirectamente me apoiaram.

A Direcção do Curso do Mestrado (INS/FIOCRUZ), pelo apoio e oportunidade que me foi concebida por fazer parte da quarta turma de mestrado em Ciências de Saúde (especialmente ao Dr Ilesh Jani, Dr Wilson Savino, Dr Renato Porrozzi, Dr Nédio Mabunda e a Dra Nilsa de Deus). Aos meus orientadores pelo apoio incondicional, (Dr Eduardo Samo Gudo, Dra Sádía Ali, e Dr Marco Alberto Medeiros).

Aos meus colegas da 4ª turma de curso de mestrado não foi fácil a caminhada.

A todos os funcionários do LATER (Laboratório de Tecnologia Recombiante) e LATED (Laboratório de Tecnologia Diagnóstico) de Bio- Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, a minha gratidão pela recepção e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os funcionários do Serviço de Referência em Leptospirose (Laboratório de Zoonoses Bacterianas) em especial ao Fernando José e Mariana da Silva obrigado pelo carinho.

A todos os funcionários do laboratório das Plataformas Tecnológicas do INS, especialmente ao laboratório de Isolamento Viral (Almiro Tivane, Argentina Muianga, John Oludele, Mirela Pale, Loira Machalele, Flora Mula e Imelda Chelene).

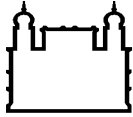
A todos os funcionários do CISPOC, especialmente a Vanessa Monteiro, Onélia Guiliche e Américo José, este último presou um grande apoio na elaboração dos mapas.

Aos pacientes por aceitarem fazer parte do estudo.

A todos que directa ou indirectamente fizeram parte deste trabalho.

O meu muito obrigado!

“Se queres ir rápido vai sozinho
Se queres ir longe vai em equipe.”
(Provérbio Africano)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

FREQUÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM PACIENTES FEBRIS ATENDIDOS EM HOSPITAIS DE
MOÇAMBIQUE (2012 - 2014)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Policarpo Paulino António Ribeiro

A leptospirose é uma das principais zoonoses do mundo. Ela é causada por bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*. Tem distribuição a nível mundial atingindo o maior peso nos países localizados nas regiões tropicais e subtropicais. Ela é endêmica e possui uma taxa de mortalidade que pode variar entre 5% a 40%.

Este estudo teve como objectivo avaliar a frequência da leptospirose em pacientes febris atendidos em 2 hospitais de Moçambique (2012 - 2014). Para tal, foi conduzido um estudo descritivo transversal em pacientes com síndrome febril agudo entre Junho de 2012 a Setembro de 2014. De cada paciente foram colhidas amostras de sangue pareadas correspondente a fase aguda e convalescente. Durante o período de estudo foram recrutados um total de 675 indivíduos dos quais 302 foram excluídos por não retornarem a visita de seguimento. Dos 373 indivíduos com febre aguda que retornaram à visita de seguimento 208 eram provenientes do Hospital Distrital de Caia (área rural) e os restantes 165 eram do Hospital Geral Polana Caniço (área sub-urbana).

O despiste dos casos suspeitos de leptospirose foi realizado usando o método de ELISA *in house* baseada num microarranjo de duas proteínas, (LigANI e a LigB 7-11) para a detecção de anticorpos IgM e IgG. As amostras que foram duplamente positivas para IgM e IgG foram confirmadas usando a técnica MAT (padrão de ouro). Dos 373 pacientes febris rastreados pela técnica ELISA, um total de 43 (11,5%) foram reactivos para leptospirose. Desses, um total de 24 (6,4%) foram duplamente reactivos para IgM e IgG e de seguida submetidos ao teste MAT dos quais 10 foram reactivos com títulos que variaram entre 1:100 a 1800.

Dos 373 pacientes um total de 38 (10.2%) foram classificados como casos presumptivos de leptospirose [IgM(+)/MAT \geq 100&MAT<400] e um total de 5 (1.3%) pacientes foram classificados como casos confirmados de leptospirose (MAT \geq 400).

Dos casos confirmados, o sexo feminino correspondeu a 60% (3/5) e a sua idade mediana foi de 32 anos (IQR 17 – 50). A maior prevalência de casos confirmados de leptospirose foi verificada em indivíduos da faixa etária dos 36 - 45 anos de idade.

O sorogrupo *Australis* foi o mais predominante com 40% (4/10), seguido do *Icterohaemorrhagiae* com 30% (3/10). A espécie predominante no estudo foi *L.interrogans* com 60% (3/5), seguido da *L. borgpetersenii* com 40% (2/5).

Os sintomas mais frequentes foram a cefaleia, náuseas, calafrios e anorexia com 100% (5/5) respectivamente foram os sintomas mais frequentes.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram que os sorogrupos de *leptospiras* patogênicas são prevalentes em pacientes febris tanto em áreas rurais bem como em áreas sub-urbanas e devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de febre aguda no país. Os casos de leptospirose não são diagnosticados sendo os mesmos considerados como malária, o que leva ao consumo excessivo de antimaláricos.

Os resultados do nosso estudo sugerem para uma reavaliação dos algoritmos nacionais para a gestão de febre aguda e da malária.

Palavras Chaves: Leptospirose, doença febril, chuvas em Moçambique, África subsaariana.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

FREQUENCY OF LEPTOSPIROSE IN FEBRIS PATIENTS ATTENDED IN MOZAMBIQUE
HOSPITALS (2012 – 2014)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Policarpo Paulino António Ribeiro

Leptospirosis is one of the world's zoonosis caused by pathogenic strains of leptospira ssp. It has distribution worldwide reaching the greatest weight in countries located in tropical and subtropical regions. It is endemic and has a mortality rate varies between 5% to 40%.

This study aimed to evaluate the frequency of leptospirosis in febrile patients treated at two hospitals in Mozambique (2012 - 2014). For this, a cross-sectional descriptive study was conducted in patients with acute febrile syndrome between June 2012 and September 2014. From each patient paired blood, samples corresponding to the acute and convalescent phases were collected. During the study, a total of 675 subjects were recruited, of whom 302 were excluded because they did not return to the follow-up visit. Of the 373 individuals with acute fever who returned to the follow-up visit, 208 came from Caia District Hospital (rural area) and the remaining 165 were from the Polana Caniço General Hospital (suburban area).

The detection of suspected cases of leptospirosis was performed using the in-house ELISA method based on a microarray of two proteins (LigANI and LigB 7-11) for the detection of IgM and IgG antibodies. Samples that were doubly positive for IgM and IgG were confirmed using the MAT (gold standard).

Of the 373 febrile patients screened by the ELISA, a total of 43 (11.5%) were reactive for leptospirosis. Of these, a total of 24 (6.4%) were doubly reactive for IgM and IgG and then submitted to the MAT test, of which 10 were reactive with titers ranging from 1: 100 to 1800.

Of the 373 patients a total of 38 (10.2%) were classified as presumptive cases of leptospirosis (IgM (+) / MAT \geq 100 & MAT <400) and a total of 5 (1.3%) patients were classified as confirmed cases of leptospirosis MAT \geq 400).

Of the confirmed cases, the female sex corresponded to 60% (3/5) and the median age was 32 years (IQR 17 - 50). The highest prevalence of confirmed cases of leptospirosis was found in individuals aged 36-45 years.

Australis serogroup was the most predominant with 40% (4/10), followed by Icterohaemorrhagiae with 30% (3/10). The predominant species in the study was *L.interrogans* with 60% (3/5), followed by *L. borgpetersenii* with 40% (2/5).

The most frequent symptoms were headache, nausea, chills and anorexia with 100% (5/5) respectively were the most frequent symptoms.

In conclusion, our results demonstrated that pathogenic leptospiras are prevalent among febrile patients living in rural and suburban areas in Mozambique, suggesting that leptospirosis should be considered in the differential diagnosis of febrile illness in the country. In addition, almost all cases of leptospirosis are misdiagnosed and treated as malaria, which leads to excessive consumption of antimalarials.

We recommend the urgent review of the national algorithms for the management of fever and malaria.

Keys Words: Leptospirosis, febrile illness, heavy rainfall, Mozambique, sub-Saharan Africa

Conteúdos	
Resumo.....	VIII
Abstract.....	X
1. Introdução.....	1
1.1 Descoberta da leptospirose	4
1.2 Epidemiologia da Leptospirose	4
1.2.1 Distribuição geográfica da leptospirose no mundo	5
1.2.2 Distribuição geográfica da leptospirose em África.....	6
1.2.3 Leptospirose em Moçambique.....	7
1.3 Biologia das Espiroquetas.....	7
1.3.1 Morfologia, divisão e motilidade das leptospiras	7
1.3.2 Proteínas de membrana externa (OMPs)	8
1.3.3 Lipopolisacarídeo (LPS)	9
1.3.4 LipL32.....	10
1.3.5 Loa 22	10
1.3.6 A família Lig.....	10
1.3.7 Taxonomia e classificação das <i>leptospiras</i>	11
1.3.8 Genoma da <i>leptospira</i>	12
1.4 Reservatórios.....	13
1.5 Ciclo de transmissão.....	14
1.6 Factores de virulência das leptospiras.....	15
1.7 Aspectos clínicos	16
1.7.1 Outras manifestações clínicas.....	16
a) Formas de leptospirose.....	17
b) Fases da doença.....	18
1.7.2 Patogenia da leptospirose	18
1.8 Diagnóstico da leptospirose	19
1.8.1 Diagnóstico Laboratorial.....	19
1.8.2 Diagnóstico diferencial	23
1.8.3 Exames complementares	23
1.9 Prevenção e tratamento.....	23
2. Justificativa.....	24
3. Objectivos.....	25
3.1 Objectivo Geral	25
3.2 Objectivos Específicos.....	25

4. Material e métodos.....	25
4.1 Desenho e população do estudo	25
4.2 Distrito de Caia	26
4.3 Bairro da Polana Caniço	26
4.4 Tamanho Amostral.....	27
4.5 Critérios de inclusão ao estudo.....	28
4.6 Critérios de exclusão ao estudo.....	28
4.7 Definição de caso de leptospirose	28
4.7.1 Caso suspeito:.....	28
4.7.2 Caso presumptivo.....	28
4.7.3 Caso confirmado:	28
4.8 Colheita e Processamentos das amostras.....	28
4.9 Testagem Laboratorial	29
4.9.1 ELISA (Microarranjo de proteínas recombinantes).....	29
4.9.2 Cálculo do Cut off	31
4.9.3 Perfil das amostras de soro usados no controle.....	31
4.9.4 MAT.....	31
4.9.5 Interpretação dos Resultados.....	32
5. Fluxograma de testagem das amostras.....	32
6. Análise de dados.....	33
7. Considerações éticas.....	33
8. Resultados.....	34
8.1 Características gerais dos participantes e prevalência de leptospirose	34
8.2 Características clínicas e demográficas dos grupos do estudo	35
8.3 Cálculo da sensibilidade e especificidade do teste ELISA.....	36
8.3.1 Sensibilidade:.....	36
8.3.2 Especificidade:.....	37
8.3.3 Valor Preditivo Positivo (VPP):.....	37
8.3.4 Valor Preditivo Negativo (VPN):.....	37
8.3.5 Eficiência do teste:.....	37
8.4 Desempenho do teste ELISA IgM anti-leptospira.	37
8.5 Sorogrupos e sorovares de leptospirose	38
8.6 Distribuição de casos de leptospirose ao longo do ano (2012 – 2014).....	41
9. Discussão.....	42
10. Conclusões.....	46

11. Perspectivas/recomendações.....	46
12. Referências bibliográficas.....	47
13. Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia eletrônica mostrando a morfologia da leptospira sp..	7
Figura 2. Motilidade das leptospiros.	8
Figura 3. Representação da membrana de <i>leptospira</i>	9
Figura 4. Estrutura genética do locus ligA e ligB	11
Figura 5. Análise filogenética do gene 16S..	12
Figura 6. Ciclo de transmissão da leptospirose.	15
Figura 7. Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença.	18
Figura 8. Mapa geográfico da área de estudo.	27
Figura 9. Fluxograma do recrutamento de pacientes e testagem das amostras.	33
Figura 10. Frequência de indivíduos IgM reactivos pelo método ELISA em diferentes dias após o início da febre.....	37
Figura 11. Frequência dos sorogrupos confirmados no MAT	38

INDICE DE TABELA

Tabela 1. Sorovariedades de <i>leptospira interrogans</i> e seus hospedeiros de manutenção.....	14
Tabela 2. Os principais meios de cultivo para leptospirose	20
Tabela 3. Soros imunes de referência recomendados pela OMS utilizados no teste de MAT para identificação de sorovares	31
Tabela 4. Casos de indivíduos presumptivos e confirmados no diagnóstico da leptospirose de acordo com a área de estudo.....	34
Tabela 5. Características dos pacientes presumptivos e confirmados dos dois locais do estudo.....	36
Tabela 6. Frequência dos sorovares e respectivos títulos confirmados por MAT	39
Tabela 7. Relação dos sorovares, sorogrupos e espécies encontrados em pacientes confirmados, bem como a sua abordagem terapêutica de acordo com a sua área de proveniência.....	40
Tabela 8. Número de casos de leptospirose ao longo do ano (2012 – 2014).....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µm	Micrómetro
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ g)
%	Por cento
BSA	Albumina sérica bovina
Cit.	Citado
CD4	Cluster of differentiation 4 (expressão Inglesa)
CD8	Cluster of differentiation 8 (expressão Inglesa)
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CISPOC	Centro de Investigação e Treino em Saúde da Polana Caniço
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
<i>et al.</i>	Abreviatura da expressão latina <i>et alii</i> , para demais colaboradores
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
EMJH	Ellinghausen Mccullough Harris
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Giros
GLP	Glicolipoproteínas
GPCL	Boas práticas clínicas e laboratoriais
HDC	Hospital Distrital de Caia
HGPC	Hospital Geral da Polana Caniço
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95%
Ictero	Icterohaemorrhagiae
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INS	Instituto Nacional de Saúde
INAE	Instituto Nacional de Estatística
IQR	Interquantile Range (expressão Inglesa)
Kb	kilo bases
kDa	Kilodalton

LATER	Laboratório de Tecnologia recombinante
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstico
LCR	Líquido cefalorraquidiano
Lig	Leptospiral Immuno Globulin-like (expressão Inglesa)
LipL	Lipoproteína de <i>leptospira</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAT	Teste de aglutinação microscópica
MI	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMP	Proteína de membrana externa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (expressão Inglesa)
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RCHISTO	Sistema de medição e automação laboratorial
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minute
rRNA	Ácido Ribonucléico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIFA	Síndrome febril agudo
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (expressão Inglesa)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TLR	Toll-like receptores (expressão Inglesa)
Tris	Hidroximetilaminometano
U	Unidade
UV	Radiação Ultravioleta
VFA	Vigilância da Febre Aguda

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana causada por espiroquetas do género *Leptospira* família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales*. É uma zoonose de ampla distribuição mundial (1).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência varia de aproximadamente 0,1 a 1/100.000 casos por ano em regiões temperadas até 10 a 100.000 por ano em climas tropicais húmidos. Durante epidemias, a incidência pode atingir a 100/100.000 indivíduos. Estima-se que mais de 500.000 casos de leptospirose ocorram por ano no mundo (1).

A leptospirose é considerada uma doença emergente e um grave problema de saúde pública. Trata-se de uma doença com grande importância social e económica por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, bem como um alto custo hospitalar e perdas de dias de trabalho. A sua letalidade pode chegar a 40% nos casos mais graves (2,3).

A ocorrência de leptospirose está também relacionada a factores ambientais que podem proporcionar o aumento de número de casos (4).

Os casos de leptospirose ocorrem tanto em áreas rurais bem como em áreas urbanas, sendo mais prevalente em regiões de clima tropical e sub-tropical. Em áreas endêmicas, o pico das ocorrências dos casos de leptospirose é durante o período das chuvas podendo adquirir proporções epidémicas em caso de cheias (1,5).

A ocorrência da leptospirose é muitas vezes condicionada pela precariedade socio-económica e ambiental a semelhança de outras doenças relacionadas ao saneamento do meio (6).

O ciclo biológico das leptospirosas é complexo e resulta da interação entre os seres humanos, reservatórios animais e meio ambiente (3). A doença está relacionada também a determinados grupos de profissionais como veterinários, agricultores, pescadores, indivíduos envolvidos na recolha de lixo bem como certo tipo de actividades desportivas (7).

Devido as dificuldades no diagnóstico da doença com base em apresentação clínica, o diagnóstico laboratorial é necessário para a confirmação dos casos (8).

Os seres humanos são geralmente infectados por contacto com urina de roedores infectados, água ou solo contaminado bem como tecido de um animal infectado (9).

Os roedores são os principais reservatórios da leptospirose destacando-se o rato do esgoto (*Rattus norvegicus*) como sendo o principal reservatório responsável por grandes epidêmias em zonas urbanas, mas também incluem uma variedade de animais selvagens e domésticos responsáveis no ciclo de transmissão da doença (10,11).

As leptospirosas patogênicas penetram no organismo humano através das membranas das mucosas, conjuntivas, pequenos cortes e escoriações existentes na pele (12).

As leptospirosas são convencionalmente classificadas em: patogênica (*Leptospira interrogans lato sensu*) e a saprófita (*Leptospira biflexa lato sensu*) (3).

Mais de 60 sorovares já foram descritos no passado e mais de 250 sorovares em 25 sorogrupos são reconhecidos de *L. interrogans* (12).

As leptospirosas saprófitas não são capazes de sobreviver na presença de soro humano normal, enquanto que espécies patogênicas são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo (8).

A leptospirose pode assumir duas formas clínicas distintas: a forma anictérica e a forma ictérica. O período de incubação da doença é de cerca de 7 a 12 dias podendo atingir os valores extremos entre 2 a 20 dias (3,10).

A infecção apresenta um amplo espectro de sintomas que podem variar de uma doença febril, até uma forma mais grave com comprometimento renal e hemorragias (13).

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 e outras viroses (3).

A leptospirose é muitas vezes negligenciada em pacientes febris devido ao desconhecimento entre os clínicos e seu amplo espectro de apresentações clínicas que muitas vezes é semelhante a outras doenças infecciosas (7,10).

As leptospiral immunoglobulin-like proteins (Ligs) são proteínas de superfície com alto peso molecular que apresentam domínios *Bacterial immunoglobulin-like* (Big) (14).

As proteínas LigA e LigB estão presentes apenas em espécies patogênicas e sua expressão está intimamente associada ao processo de infecção do hospedeiro (14,15).

Na maioria dos casos de leptospirose a doença é identificada por testes serológicos tais como ELISA e imunofluorescência. No entanto, o teste padrão-ouro para o

diagnóstico da leptospirose é o teste de aglutinação Microscópica (MAT) que apesar de ser mais económico possui baixa sensibilidade (3,16).

Embora o MAT seja o padrão-ouro, este método tem a desvantagem de não diagnosticar a doença na sua fase inicial, pois os anticorpos específicos começam a ser detectados 5 – 7 dias após o aparecimento dos sintomas para além de exigir pessoal qualificado e treinado em micro-aglutinação (16).

O métodos moleculares como a PCR baseada em amplificação dos genes 16S e 23S do RNA ribossomal é uma abordagem utilizada no diagnóstico molecular nos primeiros dias após a infecção (17).

É importante destacar que as medidas preventivas dependem do padrão epidemiológico da área em questão e incluem eliminação das fontes de infecção, profilaxia antibiótica em casos de alto risco e possivelmente a vacinação animal (1). Nos casos iniciais da doença é recomendado um tratamento oral com doxiciclina, azitromicina, ampicilina, e amoxicilina (1).

Uma das medidas de controle que devem ser consideradas são os aspectos relacionados ao saneamento básico do meio, controle de roedores, assim como melhoria das condições sócio-econômicas da população (2).

Em países como Japão, Cuba, China e França já existem vacinas licenciadas contra a leptospirose humana porém tem se feito vários esforços para desenvolver vacinas de subunidades baseadas em proteínas que induzem menor evento adverso e imunidade de longa duração e que as mesmas não sejam sorovar específico (18).

A vacina mostrou-se pouco eficaz devido ao curto período de protecção que ela oferece e pelo facto da mesma ser sorovar específica ou seja só irá conferir protecção aos sorovares específicos incluídos na sua formulação (19).

Nos últimos anos com a finalidade de se encontrar novos candidatos a vacina antígenos conservados entre as espécies e que têm maior chance de induzir a protecção cruzada contra vários sorovares tem sido investigado como principais alvos (13). Estudos recentes têm evidenciado que estas proteínas (Lig A e B) são candidatas a vacinas para a leptospirose, conferindo entre 70% e 100% de protecção em modelos animais (14).

A existência de tantas soroviedades está atribuída à estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) que compõe a membrana externa desta bactéria (19). Estas diferenças se reflectem nas medidas de controle desta doença baseadas no

diagnóstico e principalmente na imunização dos animais com bactericinas comerciais visto que na leptospirose a imunidade é humoral e específica (19).

1.1 Descoberta da leptospirose

A doença humana foi descrita pela primeira vez em 1812 por Larrey no Cairo (10). Entretanto, Adolf Weil em 1886 na Alemanha foi o primeiro a descrever minuciosamente a enfermidade após observar 4 casos clínicos de leptospirose em seres humanos que caracterizou como doença infecciosa que causava icterícia, esplenomegalia e comprometimento renal (2,3).

Devido a este facto a leptospirose passou a ser reconhecida como “Doença de Weil” podendo também ser chamada de febre dos pântanos, febre outonal, febre dos sete dias, febre dos arrozais, febre dos nadadores (3,19).

A etiologia da doença era desconhecida mas suspeitava-se ser de origem infecciosa e muitas vezes associada a epidemias entre trabalhadores de esgoto, agricultores e mineiros (10). Contudo, em 1916 a bactéria foi isolada pela primeira vez no Japão por Inada e colaboradores. Esses pesquisadores analisando o tecido dos animais inoculados verificaram a presença de um espiroquetídeo ao que deram o nome de *Spirochoeta icterohaemorrhagiae* (2,10).

Estudos demonstraram o papel do rato como reservatório da bactéria demonstrando que este era um portador crônico e que através do contacto com a urina de ratos contaminada indivíduos poderiam se infectar (7).

1.2 Epidemiologia da Leptospirose

A leptospirose vem sendo reconhecida como uma doença infecciosa emergente e reemergente (1,20). Os animais são reservatórios essenciais para permanência da transmissão da bactéria na natureza sendo os seres humanos considerados como hospedeiros acidentais (13). Entre os hospedeiros mais importantes estão os roedores peridomésticos, cães, equinos, suínos, bovinos e caprinos. A urina dos animais infectados são eliminadas no solo ou em águas contaminadas possibilitando a existência de vários padrões de transmissão para o homem (21).

A leptospirose tradicionalmente era considerada como uma doença de padrão urbano e rural relacionada ao trabalho em lavouras de arrozal ou em algumas profissões que potencializavam exposições a ambientes ou a animais contaminados

(2,5,22). Um outro padrão epidemiológico mais recente descreveu a ocorrência da doença associada a eco-turismo bem como a práticas de actividades desportivas como evidenciado em um grande surto que ocorreu entre nadadores que participavam de uma corrida (*triathlon*) nos Estados Unidos (23).

Actualmente, a leptospirose tornou-se também num problema muito presente nas áreas urbanas, peri-urbanas e sub-urbanas particularmente em locais com precário saneamento do meio (11,22).

Hoje um bilhão de pessoas no mundo reside em casas e ambientes sem saneamento básico o que propicia condições favoráveis para a transmissão da leptospirose por roedores (1).

A preocupação da doença a nível global é agravada pela falta de uma vacina eficaz bem como o défice de medidas preventivas na maior parte dos países em risco (3).

1.2.1 Distribuição geográfica da leptospirose no mundo

A leptospirose tem uma ampla distribuição geográfica afectando tanto regiões tropicais e subtropicais, bem como zonas temperadas. Cerca de 10 mil casos são notificados por ano no mundo (13). A incidência da leptospirose é baixa nos países desenvolvidos estando relacionada a actividades recreativas que tem contacto com água ou actividades ocupacionais de alto risco (24).

Os países em vias de desenvolvimento apresentam maior incidência de leptospirose por causa da exposição humana aos reservatórios e porque nestes países o número de pessoas que vivem em condições precárias e sem acesso a condições básicas de saneamento é maior (1). Tem sido observado um aumento no número de notificação de casos nos últimos anos em diversas regiões do mundo: Nicarágua, Sudoeste da Ásia, Estados Unidos, Malásia e Brasil (1,2,25,26).

A leptospirose tem como característica a sazonalidade visto que o seu pico de incidência é durante as estações chuvosas (6).

Vários estudos de prevalência para leptospirose em diferentes regiões do mundo vem sendo conduzidos. Um estudo multicêntrico realizado na Índia indica que cerca de 12,7 % dos casos de doença febril aguda reportados nos hospitais é devido a leptospirose (27).

Uma outra avaliação no México no Estado de Yucatan situado na zona intertropical reportou que 14,25% (57/400) de seropositividade em indivíduos selecionados aleatoriamente (28).

1.2.2 Distribuição geográfica da leptospirose em África

O impacto da doença em humanos e animais na África é um dos mais elevados do mundo, embora a doença não é diagnosticada rotineiramente (29). Importa ressaltar que a maioria dos dados epidemiológicos sobre a leptospirose na África Oriental provém do Kenya e Tanzania (12). Um estudo baseado em revisão de literatura realizado em 26 países de África estimou que a incidência anual de casos de leptospirose varia entre 3 a 102 pessoas em 100.000 habitantes (30).

Em 2004, foi descrito uma epidemia de leptospirose no Kenya que reportou que a doença naquele país sempre esteve presente, contudo não era diagnosticada (12).

Um estudo realizado no Tanzânia reportou uma prevalência de anticorpos contra leptospirosas de 29,9% (31). Em outro estudo no mesmo país confirmou-se que 70 (8,4%) dos 831 participantes tinham leptospirose e 761 (91,6%) foram negativos. Desses, 203 (24%) foram infectados por HIV, dos quais 9 (4,4%) dos 203 tinham leptospirose (32).

É importante ressaltar que uma revisão da literatura identificou 97 estudos feitos em 26 países da África e concluiu que a leptospirose correspondia a 23% de pacientes febris sem causa aparente e 19% de pacientes hospitalizados (30).

Na Nigéria, três inquéritos sorológicos em pessoas saudáveis demonstraram prevalências de anticorpos anti-leptospira variando de 13,5% para 18,0%. Um outro estudo feito em 460 habitantes do distrito de Ashanti em Ghana reportou uma seroprevalência de 33,3% (12).

Na Somália, 101 dos 105 adultos saudáveis investigados foram seropositivos para leptospirose. Foi encontrada uma maior soropositividade em pessoas de áreas mais húmidas perto do Rio Shabeele e o contacto com o gado foi identificado como um factor de risco (12).

Em 2010, 7,8% dos 332 pacientes febris de Joanesburgo na África do Sul foram seropositivos para leptospirose e outro estudo em Durban entre os voluntários saudáveis mostraram uma seroprevalência de 18,9%, com uma percentagem significativamente mais elevada entre a faixa etária dos 18-22 anos (12).

Na região de Dakar, 6,4% de um grupo de 109 doentes investigados tiveram títulos positivos predominantemente contra o sorovar *Icterohaemorrhagiae*. Em Angola, em um grupo de 650 pacientes febris 8,0% eram prováveis casos de leptospirose (12).

1.2.3 Leptospirose em Moçambique

Os dados sobre a prevalência de casos de leptospirose em Moçambique são ainda escassos.

Um estudo realizado em pacientes febris com idades compreendidas entre 18 a 50 anos atendidos em um hospital da cidade de Maputo concluiu que 10% das doenças febris não específicas podiam ser atribuídos a leptospirose (20).

1.3 Biologia das Espiroquetas

O agente etiológico da leptospirose é uma espiroqueta que compartilha sua forma espiralada com outras espiroquetas como *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme) e *Treponema pallidum* (sífilis). Estas são bactérias helicoidais móveis, possuem corpo espiralado, membrana lipídica e parede celular com camadas de peptidoglicano (3,19). Os membros do género leptospira diferem dos outros espiroquetídeos por apresentarem uma forma helicoidal com espiras muito apertadas e regulares, por possuírem uma ou ambas extremidades em forma de gancho e por serem os únicos que atravessam os filtros com uma porosidade igual a 0,22 µm. Estes microorganismos espiralados têm uma morfologia muito característica com um diâmetro de 0,1µm e um comprimento de 6 a 20 µm (8,33).

1.3.1 Morfologia, divisão e motilidade das leptospiras

Em relação a sua estrutura observa-se que as leptospiras têm uma membrana dupla característica que partilham com outras espiroquetas conforme mostra a figura 1. Além disso, as leptospiras possuem um envelope exterior que envolve a membrana citoplasmática e a parede celular, sendo esta última a estrutura responsável pela forma helicoidal da bactéria (3,19).

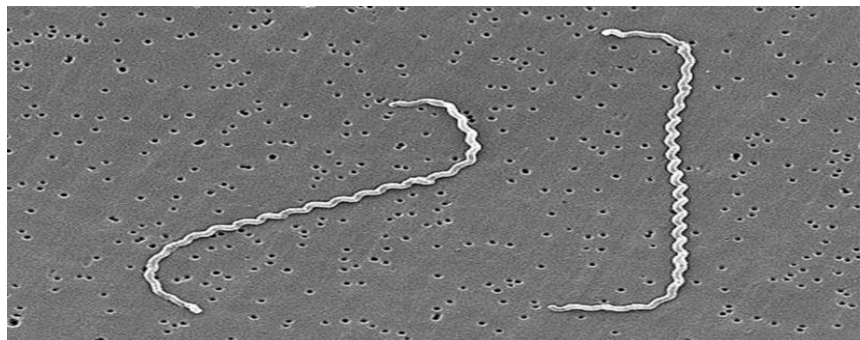


Figura 1. Fotomicrografia eletrônica mostrando a morfologia da leptospira sp. Fonte Adler, 2015.

Dentre as características deste microorganismo, a motilidade é uma em particular, admitindo-se que tem origem no filamento axial que atravessa toda a bactéria conhecido como flagelo ou endoflagelo (19).

No que se refere a motilidade, as leptospiiras seguem os seguintes movimentos: de rotação (tipo “saca-rolhas”) em torno do seu eixo de alongamento-encurtamento e de translação consoante a natureza do meio (sólido, semi sólido ou líquido) (19).

Em relação a divisão celular as leptospiiras se reproduzem por fissão binária transversal (19).

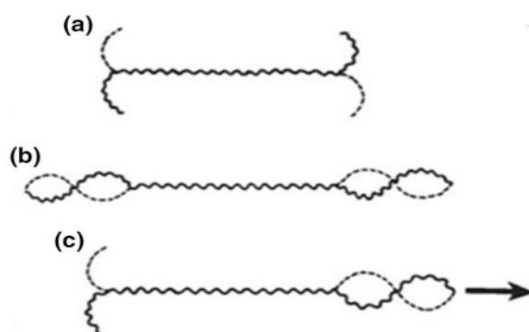


Figura 2. Motilidade das leptospiiras. Fonte: Adler, 2015

a) Forma com dois ganchos nas duas extremidades **(b)** Forma em espiral nas duas extremidades **(c)** Forma em gancho numa extremidade e espiral noutra.

1.3.2 Proteínas de membrana externa (OMPs)

A identificação e estudo das proteínas antigênicas expressas no decurso de uma infecção são muito importantes para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e vacinas (19).

As OMP's têm uma grande importância na área da investigação e não só, devido a sua localização estratégica visto que fazem a interação entre o patógeno e o hospedeiro. Acredita-se que as OMP's participam nos mecanismos de invasão da resposta imune durante a colonização das espiroquetas no hospedeiro (19,34).

A membrana externa das espiroquetas é responsável pela interface entre a célula e o meio externo. Ela possui a função de barreira selectiva, além de ser a primeira estrutura a entrar em contacto com o sistema imune do hospedeiro. Durante a infecção, as leptospiiras devem ser capazes de fugir do sistema imune do hospedeiro para efectuar uma apropriada colonização (35).

As moléculas associadas à membrana devem mediar esta interação entre o hospedeiro e o microorganismo. As leptospiiras possuem em comum com outras espiroquetas uma típica estrutura de membrana dupla na qual a membrana

citoplasmática e a parede celular são fortemente associadas e cobertas por uma membrana externa (PME) (34).

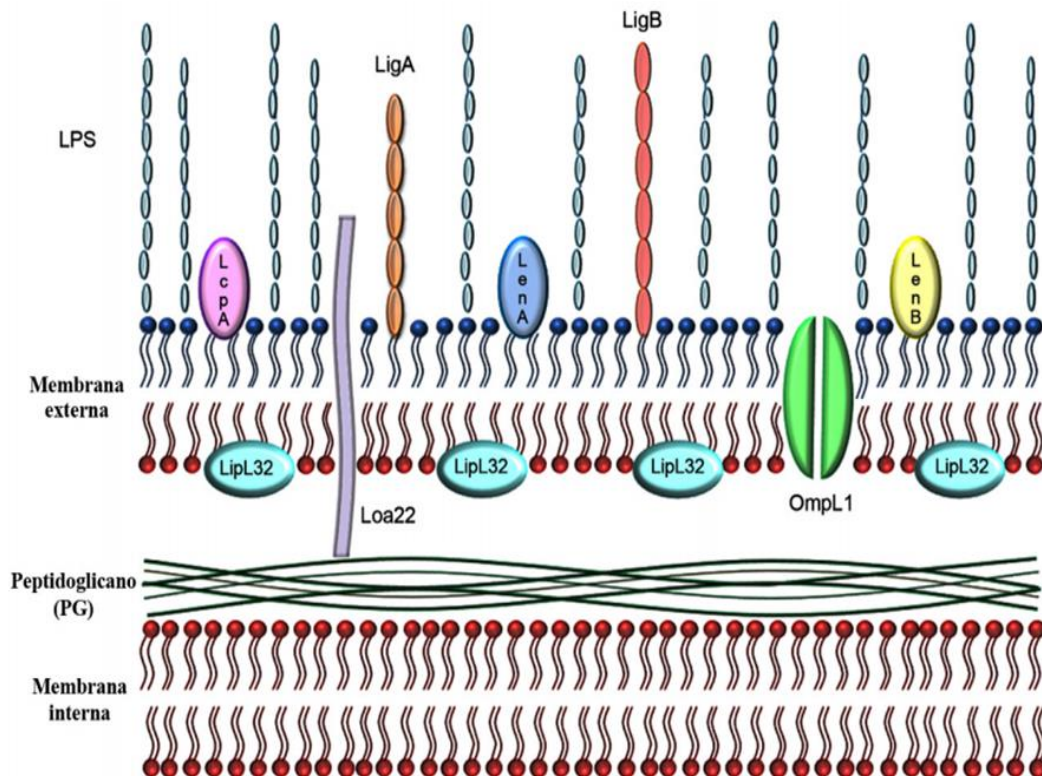


Figura 3. Representação da membrana de *leptospira*. Fonte: Adler,2015

1.3.3 Lipopolissacarídeo (LPS)

LPS é um componente muito importante da membrana das leptospiras e seus polissacáridos dominam a superfície das bactérias (19).

Os lipopolissacarídeos da membrana externa das leptospiras possuem composição similar aos LPS de outras bactérias gram negativas, mas sua actividade endotóxica é considerada menor (3).

As leptospiras possuem uma membrana dupla contendo lipopolissacarídeo (LPS) que conferem características próprias de bactérias gram-negativas, só que também apresentam uma parede de peptidoglicano estreitamente associada a membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas (34).

O LPS é um dos principais antígenos da membrana das leptospiras, suas diferenças na estrutura localização e composição constituem um ponto importante para a classificação sorológica das mesmas. A membrana externa é composta principalmente de lipopolissacarídeos (LPS) e lipoproteínas tais como: LipL32, LigA, LigB, Loa22 e a proteína porina OmpL1(34,36).

1.3.4 LipL32

A lipoproteína LipL32 é uma das mais abundantes na membrana externa de *leptospiras spp.* Essa proteína é presente somente em leptospirosas patogênicas e intermediárias, sendo um provável fator de virulência (34).

Existem também fortes evidências de que a LipL32 é expressa durante a infecção visto que já foi evidenciado a sua marcação em ensaios por imunohistoquímica em LipL32 nos rins de animais infectados (34).

A LipL32 está presente na fase aguda e convalescente da doença.

Estudos recentes demonstraram que o antígeno LipL32 está relacionado com a resposta humoral em humanos mostrando maior sensibilidade e especificidade na fase aguda e convalescente da doença (19).

1.3.5 Loa 22

A lipoproteína denominada Loa 22 também já foi descrita como proteína presente na superfície de leptospirosas e também liga-se ao OmpA peptidoglicano (34).

Essa proteína é a segunda proteína mais abundante em *L. interrogans* contudo, a sua função permanece ainda desconhecida (19).

1.3.6 A família Lig

Uma família de três proteínas de alto peso molecular das leptospirosas (LigA, LigB e LigC) foram identificadas como um novo membro de imunoglobulinas (Ig) (37).

A família Lig de lipoproteínas foi descoberta na seleção de uma biblioteca de antígenos com soros convalescentes de humanos de *L. kirschneri* e *L. interrogans*.

Essas novas proteínas codificadas foram designadas de proteínas (ligA, ligB e ligC) .

As proteínas contêm uma série de 12-13 domínios dos quais os primeiros seis domínios são idênticos entre si conforme mostra a figura 4 (35,37).

A proteína LigA é encontrada somente nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, enquanto a LigB é encontrada em todas as espécies de leptospirosas patogênicas (37).

Os pacientes com leptospirose têm uma forte resposta imune para os domínios repetitivos das imunoglobulinas, sugerindo que as repetições Lig recombinantes seriam bons antígenos para o desenvolvimento de diagnósticos e vacinas. Atualmente, vários grupos vêm utilizando as Ligs como marcadores para o diagnóstico laboratorial (37,38).

As Lig são consideradas factores de virulência pois os membros da superfamília Ig-like bacteriana medeiam interações celulares entre o patógeno e o hospedeiro tais como invasão e a fixação da célula hospedeira em outras bactérias (37).



Figura 4. Estrutura genética do locus *ligA* e *ligB*. Fonte: Matsunaga, 2003

1.3.7 Taxonomia e classificação das *leptospiras*

A classificação e a nomenclatura das espécies de leptospiras é algo ainda muito complexo. Actualmente existem duas formas de classificação de *leptospira spp* uma molecular, baseada em análises gênicas (técnicas de hibridação de DNA) e outra sorológica, baseada em determinantes antigênicos (3,39).

Até 1989, o gênero *leptospira* era dividido em duas espécies *L. Interrogans* (patogênica) e *L. biflexa* (saprófita). A diversidade dos sorovares reside na heterogeneidade dos hidratos de carbono que compoem a cadeia lateral dos lipopolissacarídeos da membrana bacteriana (19).

Devido à necessidade de estudos taxonômicos e o surgimento de novas técnicas principalmente as de biologia molecular na actualidade a classificação mais aceite é a genética a qual indica a existência de pelo menos 19 espécies: 13 espécies patogênicas e 6 saprófitas (3). Sete destas espécies nomeadamente, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, e *L. alexanderi* são as principais causadoras da leptospirose (40).

Todas espécies patogênicas reconhecidas de leptospiras são classificadas em 250 sorovares divididos em 24 sorogrupos com base na expressão dos lipopolissacarídeos (LPS) expostos na superfície (3).

As diferenças estruturais dos hidratos de carbono que compoem a cadeia lateral dos LPS determinam a diversidade antigênica entre os numerosos grupos de sorovares. Os sorovares que tiverem a sobreposição de determinantes antigênicos são classificados em um sorogrupo maior (3,19).

Uma análise filogenética do gene 16S que codifica para o ácido ribonucleico ribossomal (RNAr) sugere que espécies de leptospira se dividem em três grupos distintos : patogênicas, intermediárias e saprófitas (10). Nesta classificação, o grupo das espécies patogênicas possui 8 espécies *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L.*

borgpetersenii, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* e *L. alstonii*). Enquanto o grupo das saprófitas possui 7 (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*). Outro ramo possui 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 (3,13,19).

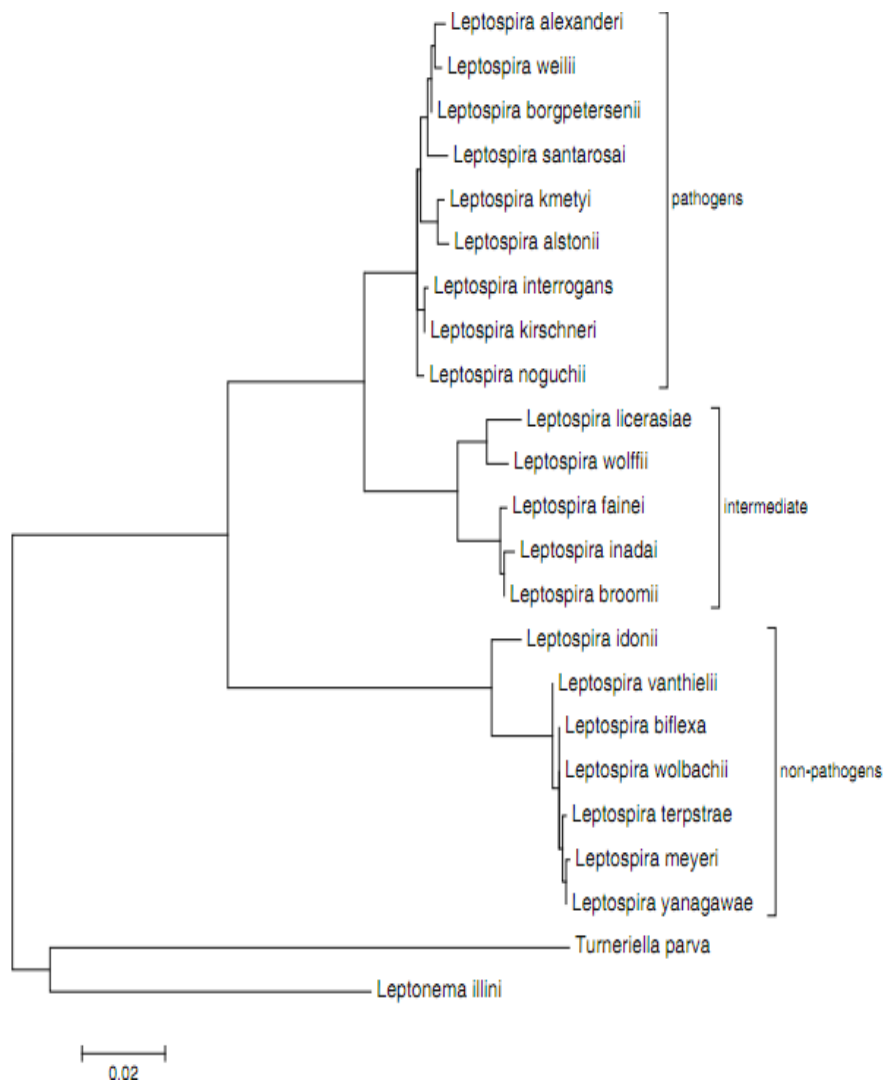


Figura 5. Análise filogenética do gene 16S. Fonte: Adler, 2015

1.3.8 Genoma da *leptospira*

Até o momento foram sequenciados os genomas de dois agentes causadores de leptospirose: *L. interrogans* sorovar Lai cepa 56601 e *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (2,19,41).

Ambos os genomas revelaram número muito pequeno de cópias dos genes *rrf*, *rrs* e *rrl*, que codificam as subunidades ribossômicas 5S, 16S e 23S, respectivamente.

Esse achado pode explicar parcialmente o crescimento fastidioso das leptospiras (42).

O ciclo de vida da leptospira requer a capacidade de responder a um repertório amplo de condições ambientais. Assim, os mecanismos de transdução de sinais são mediados por ao menos 79 genes que codificam componentes de vias de transdução de sinal mediadas por fosforilação (43).

Os mecanismos de virulência das leptospiras patogênicas como motilidade e resposta quimiotáxica permitem a penetração nos tecidos dos hospedeiros durante a infecção. Ambos os genomas contêm ao menos 50 genes relacionados à motilidade e o aparato de quimiotaxia parece ser mais complexo do que o de outras espiroquetas (19,42).

Estruturalmente o genoma compreende uma parte de 4.400 Kb e outra de 350 Kb ligadas ao cromossoma não existindo outros plasmídeos descritos. Genes de 16S e 23S e rRNA ligados aos ribossomos são também descritos (19).

Numerosos outros genes pertencentes a leptospira foram clonados e analisados incluindo os que codificam ou regulam a síntese de aminoácidos, proteínas, RNA polimerase, proteínas de choque térmico, esfingomielinase, hemolisinas, proteínas de membrana, proteínas flagelares e síntese de lipopolissacarídeos (3).

1.4 Reservatórios

O hospedeiro natural geralmente é uma espécie silvestre e algumas vezes animais domésticos. Os roedores desempenham o papel como um dos principais reservatórios naturais pois albergam as leptospiras nos seus rins eliminando no ambiente e contaminando água, solo e os alimentos (2,7).

Estes animais sobrevivem a infecção por mecanismos de tolerância imunitária, tornando-se assintomáticos e eliminando as leptospiras por toda a vida através da urina (13).

Dentre os roedores domésticos destacam-se o *Rattus norvegicus* (rato do esgoto) *Rattus rattus* (rato preto) *Mus musculus* (camundongo). O *R. norvegicus* se destaca por ser portador clássico da *L. icterohaemorrhagiae*, a mais patogênica ao homem (10).

De princípio qualquer mamífero pode ser infectado por um dos 250 sorovares da espécie patogênica *L. interrogans* mas verifica-se que na prática existe uma relação

preferencial de certos sorovares para causar infecção a determinadas espécies de animais (13).

No entanto, é fundamental ter em conta que a associação dos sorovares patogénicos com determinadas espécies animais não é exclusiva podendo variar de região para região devido às diferentes condições ecológicas (1).

Deste modo, o mesmo sorovar pode estar adaptado a mais do que um hospedeiro e a mesma espécie animal pode ser hospedeira de manutenção para alguns sorovares mas ser hospedeira accidental de outros que causam nesse caso doença grave (3).

A maioria dos sorovares possui uma determinada distribuição geográfica sendo que diferentes sorovares de leptospiros são mais prevalentes em determinadas regiões estando associados com um ou mais hospedeiros (natural ou de manutenção) os quais servem como reservatórios da infecção (44).

Tabela 1. Sorovariedades de *leptospira interrogans* e seus hospedeiros de manutenção

Sorovariedades	Hospedeiro de Manutencao
<i>Canicola</i>	Cães
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Ratos
<i>Pomona</i>	Gado, porcos
<i>Bratislava</i>	Porcos
<i>Hardjo</i>	Bovinos
<i>Ballum</i>	Camundongos

Fonte: Levett, 2001

1.5 Ciclo de transmissão

A transmissão da leptospirose envolve o meio ambiente, o hospedeiro e o reservatório. A mesma pode ser directa ou indirecta. A directa é quando as leptospiros presentes em tecidos, fluídos corporais ou urina de animais infectados entram em contacto com novos hospedeiros que é comum entre grupos ocupacionais que trabalham com animais ou seus tecidos (45).

A indirecta é quando animas ou humanos entram em contacto com leptospiros presentes no meio ambiente oriundas geralmente da urina de hospedeiro (45).

As principais vias de entrada das leptospiras nos hospedeiros são: a pele lesionada, mucosas por onde as bactérias parecem penetrar pelo tecido íntegro após exposições prolongadas à água por mecanismos ainda não bem compreendidos. Os mamíferos selvagens e domésticos podem ser portadores assintomáticos de leptospiras patogênicas a qual pode ficar alojada durante meses ou até anos em locais do organismo com alguma restrição imunológica tal como o túbulo contornado proximal do rim (7).

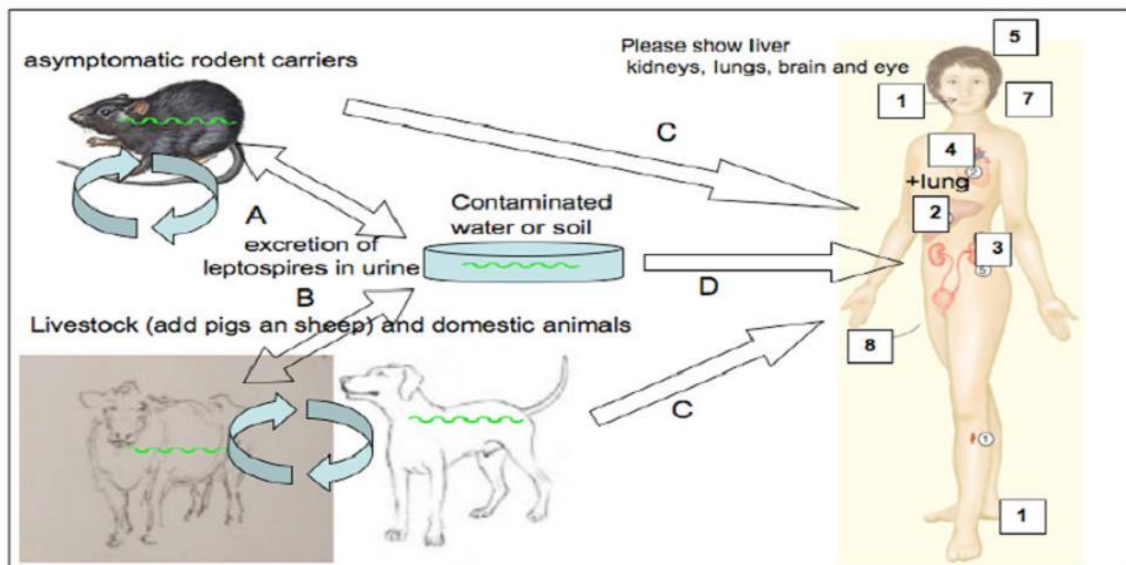


Figura 6. Ciclo de transmissão da leptospirose. Espécies de mamíferos (ratos) excretam o patógeno (*leptospiras*) em sua urina e servem como reservatórios da doença e principais fontes de transmissão. As *leptospiras* são mantidas em ambientes silvestres e domésticos entre as espécies de roedores. Nestes reservatórios (roedores) a infecção passa de assintomática para crônica e persistente nos túbulos renais, onde *L. interrogans* forma agregados (A). As *leptospiras* infectam gado e animais domésticos e provocam uma série de doenças. A leptospirose é transmitida aos seres humanos por contacto directo com animais reservatórios (C) ou exposição a água de superfície do ambiente ou solo contaminado com urina (D). As *leptospiras* penetram pela pele ou pelas mucosas (1) infectando a corrente sanguínea e disseminando-se por todos os tecidos do corpo. A infecção causa uma doença febril aguda durante a fase inicial que progride para a fase tardia causando manifestações graves tais como: disfunção hepática e icterícia (2) insuficiência renal aguda (3) síndrome pulmonar hemorrágico (4) e miocardites meningoencefalites (5). As *leptospiras* podem persistir por longo tempo em locais imunoprevilegiados tais como a câmara anterior e vítreo do olho causando uveíte (7) e meses após a infecção as mesmas podem aparecer na urina (8). Fonte: Ko et al 2009.

1.6 Factores de virulência das leptospiras

A leptospirose é o resultado da relação existente entre as leptospiras e o hospedeiro sendo um processo dinâmico envolvendo tanto factores relacionados ao agente quanto ao hospedeiro. Esta relação possui alto grau de complexidade sendo necessário um estudo de seus factores separadamente (35). Importa referir que todas as leptospiras patogênicas podem deixar de expressar os seus factores de virulência sobre determinadas condições como por exemplo estando grande período

de manutenção em meios de cultivo o que as torna reactivamente não virulentas, mas nunca não patogênicas (19).

Algumas proteínas de superfície exercem um papel muito importante na colonização do hospedeiro e devido a sua localização estas proteínas desempenham diversas funções relacionadas a adaptação e interação com o ambiente (35). Alguns estudos demonstraram que as leptospiras são resistentes a fagocitose por neutrófilos sendo apenas fagocitados por macrófagos e na presença de anticorpos opsonizantes específicos (35).

1.7 Aspectos clínicos

A leptospirose humana apresenta manifestações clínicas muito variáveis com diferentes níveis de gravidade (46). A maioria das infecções caracteriza-se por uma apresentação subclínica no qual são geralmente observados sinais e sintomas tais como: cefaléia, mialgia, dor abdominal, náuseas, vômitos e sufusão conjuntival (13). As formas iniciais da doença podem ser confundidas com outras doenças febris agudas como influenza, dengue e hepatites devido a inespecificidade dos sinais e sintomas (13,19).

As formas graves da leptospirose costumam ter um curso clínico rapidamente progressivo caracterizado pelas mesmas manifestações vistas nas formas iniciais adicionadas à icterícia, insuficiência renal e sangramentos (13). 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 (9).

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 (1,34).

1.7.1 Outras manifestações clínicas

Na infecção por leptospiras a trombocitopénia ocorre em mais de 50% dos casos e está relacionada ao desenvolvimento da falência renal aguda (3).

A incidência do envolvimento pulmonar na leptospirose tem crescido nos últimos anos e pode ocorrer nas formas ictéricas e anictéricas da doença (3). A forma pulmonar severa é a manifestação clínica mais grave da leptospirose. Os sintomas

pulmonares normalmente surgem entre o quarto e o sexto dia de doença e podem levar à morte em menos de 72 horas com taxa de mortalidade de até 60% (47).

a) Formas de leptospirose

A leptospirose pode assumir duas formas clínicas distintas: a forma anictérica e a forma ictérica. Em qualquer das formas é possível verificar duas fases distintas: a fase de leptospirémia ou septicémia e a fase de leptospiúria ou imunológica (48).

a.1) Forma anictérica

Dura cerca de 3 a 7 dias e caracteriza-se por aparecimento súbito de febres altas, náuseas, vômitos, dor abdominal, arrepios, e dores musculares nos membros inferiores. Os sintomas atingem o ponto alto entre o 4^o e o 7^o dia (3).

A maior parte dos casos de infecção por leptospiras em seres humanos é subclínica ou com sintomatologia inespecífica e uma proporção menor de pacientes (casos confirmados) apresenta uma síndrome anictérico febril, cujos principais sintomas são: febre, calafrios, mialgias, cefaléia, dores abdominais, dores retro-orbitais, fotofobia, alterações conjuntivais podendo ocorrer também encefalite, miosite e pneumonite (3,46). No caso das formas subclínicas a taxa de mortalidade é baixa e os sintomas normalmente desaparecem em uma semana coincidindo com a soroconversão (3,9). Como a sintomatologia é inespecífica deve-se proceder ao diagnóstico diferencial com infecção por vírus influenza, dengue, hantavirose, febre amarela e algumas infecções bacterianas como brucelose e rickettsiose (2,3,49).

a.2) Forma ictérica

Cerca de 10% dos casos de leptospirose se apresentam como uma síndrome ictérica febril, denominada Síndrome de Weil cuja evolução clínica é rápida e progressiva (3).

Alguns sintomas associados a Síndrome de Weil são febre, icterícia, insuficiência renal aguda, trombocitopénia, comprometimento pulmonar, alterações cardíacas e comprometimento ocular. A taxa de mortalidade varia de 15 a 40% (27).

A icterícia típica da Síndrome de Weil é devida a níveis séricos de bilirrubina bastante elevados e simultaneamente ocorre elevação moderada nos níveis séricos de transaminases e fosfatase alcalina. A bilirrubinémia sérica costuma ser

desproporcionalmente alta quando comparada às outras provas de função hepática (3).

b) Fases da doença

A primeira fase (fase septicêmica) dura de 3 a 7 dias e é caracterizada por hepatomegalia, esplenomegalia, hemorragia digestiva alta, mialgia que envolve panturrilhas, coxa, abdome, fotofobia, dor torácica, tosse seca, petéquias, hiperemia de mucosas e sufusão conjuntival (3,19).

As leptospiras podem ser isoladas do sangue e do líquido cérebro espinhal dos indivíduos infectados. Após esse período inicia-se a fase imune com início no sétimo dia de sintomas, e é nesse período que se inicia a produção de anticorpos (3,13).

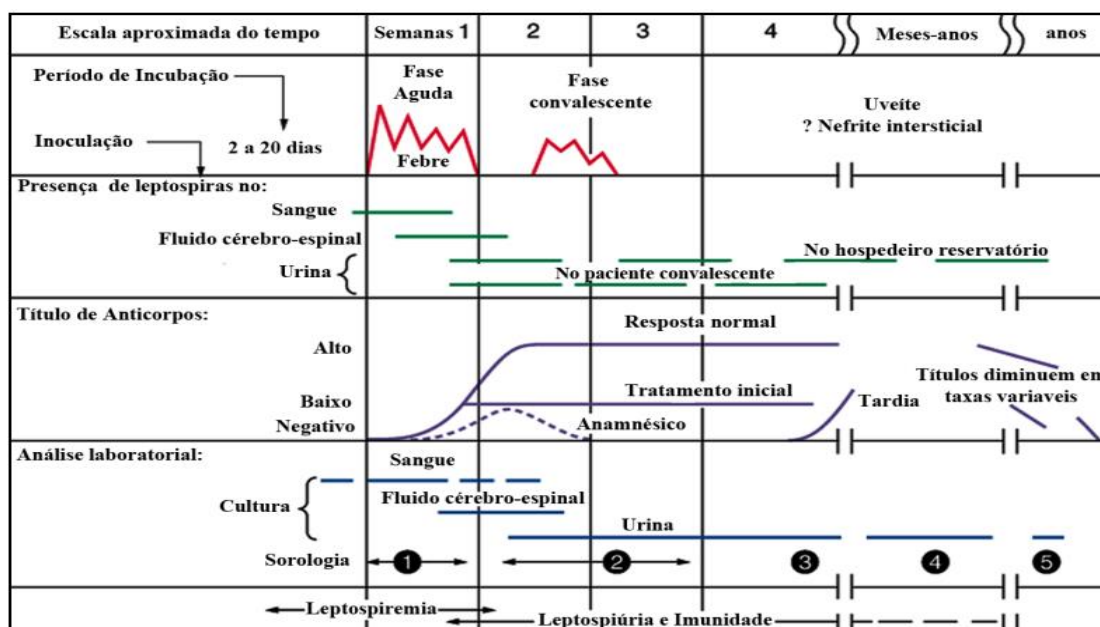


Figura 7. Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença. Fonte: Adaptado de Levett, 2001

1.7.2 Patogenia da leptospirose

Após ter superado os mecanismos de defesa não-específicos as leptospiras se multiplicam no sangue, na linfa, no fluido cerebral espinhal e em todos os tecidos constituindo a fase aguda da doença que cursa com leptospirémia (10). Os órgãos alvos são os rins e fígado podendo causar lesão aguda, insuficiência renal e lesões dos hepatócitos resultando em necrose hepática (46).

A infecção com *leptospira spp* produz um estado de inflamação generalizada durante o período de invasão tecidual. A colonização renal caracteriza a fase de leptospirúria onde as leptospiras são eliminadas pela urina entre o sétimo e o

décimo dia da evolução da doença. Nesta fase ocorre a formação de complexos imunes e reação inflamatória o que leva vários órgãos a uma vasculite generalizada principalmente no fígado, rins, coração, e pulmões (19,50).

1.8 Diagnóstico da leptospirose

O diagnóstico da leptospirose deve apoiar-se da integração dos aspectos clínicos-epidemiológicos e laboratoriais. Na maioria dos casos a história epidemiológica, os sinais e sintomas clínicos da doença não permitem o diagnóstico sendo necessária à confirmação laboratorial (19).

A confirmação definitiva da infecção baseia-se na demonstração da presença do microrganismo ou dos anticorpos específicos (51).

A confirmação precoce da leptospirose é importante para o sucesso do tratamento que deverá iniciar na fase de leptospiremica logo na primeira semana da doença para prevenir a evolução de uma infecção subclínica (3).

1.8.1 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser feito por dois tipos de exames:

Exames directos, através da visualização microscópica em fundo escuro “*in vitro*” de isolados (cultura) e da detecção do DNA (tecnologia de PCR) (44).

Exames indirectos, através de provas sorológicas que permitem a pesquisa de anticorpos específicos anti-*leptospira* em circulação (3). A escolha do tipo de exame depende fundamentalmente dos dias de evolução da doença, em relação a fase do ciclo biológico das leptospiras no organismo (52).

a) Exames directos (pesquisa do agente)

a.1) Cultura das *leptospiras*

As leptospiras são bacterias aeróbicas obrigatórias e necessitam de temperatura entre 28°C e 30°C e pH de 7,2 a 7,6 para melhor crescimento. As leptospiras se nutrem através de cadeias de ácidos graxos . O crescimento é fastidioso (4 a 15 semanas) sendo necessário o uso de meio enriquecido com albumina bovina e ácido graxos de cadeia longa (19,48). As leptospiras podem ser cultivadas *in vitro* em meios de cultura. O meio de cultura mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-

Johnson-Harris (EMJH) que é enriquecido com soro de coelho ou albumina bovina (BSA) e livre de proteína (3).

As densidades das culturas chegam a atingir concentrações de 10^7 à 10^8 leptospiras/ml com turbidez visível a partir do quarto ou quinto dia (19). As cepas são mantidas muitas das vezes nos laboratórios em meio semi-sólido, contudo devem ser replicadas para o meio líquido duas ou três vezes antes da execução do teste para que os antígenos possam ser bem homogeneizados quando diluídos em PBS (7,19).

A manutenção das culturas é feita semanalmente através microscopia de campo escuro a fim de avaliar a pureza das culturas. Um dos procedimentos de rotina dos laboratórios é avaliar as culturas com mais de 10 dias de cultivo, pois a partir daí iniciam o processo de morte celular o que compromete a utilização das mesmas no MAT (13).

Existem diferentes meios utilizados para isolamento e cultivo de leptospiras como demonstra a tabela abaixo.

Tabela 2. Os principais meios de cultivo para leptospirose

Natureza do meio	Enriquecido com soro	Soro substituído por albumina	Meio definido quimicamente
Líquido	Meio de Korthof	Meio EMJH	Meio de
	Meio de Stuart	Meio PLM-5	Shenberg
	Meio de Vervoort	Leptospira 5x	Meio de Vogel
		Meio livre de proteína	Meio de Hunter
Semi-sólido	Meio de Fletcher	Meio semi-sólido de	
	Meio de Noguchi	EMJH	
Sólido	Meio de Cox		
	Meio de Korthof		

Fonte : Bharti, 2003

a.2) Molecular (PCR)

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de um fragmento específico de DNA do gênero *leptospira* através de ciclos sucessivos com

multiplicação exponencial do amplicon desejado até que a quantidade do produto em questão seja amplificada de modo a ser visualizado (10).

Os resultados na PCR são positivos na fase de bacterémia que é na primeira semana da doença. A partir da segunda semana da doença as bactérias e os fragmentos de DNA são encontrados na urina (3).

b) Exames indirectos (técnicas de rastreio)

b.1) MAT

O teste de microaglutinação (MAT) é considerado o "padrão ouro" pela Organização Mundial de Saúde para o diagnóstico da leptospirose (1). A base do ensaio é formada pela reação antigênica de cepas de leptospira (antígenos vivos) com os possíveis anticorpos presentes no soro dos indivíduos suspeitos. A avaliação é realizada através da aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno dos LPS da membrana das leptospiros (51).

Devem ser utilizadas culturas em meio líquido. Nesta técnica são feitas diluições seriadas do soro do paciente suspeito e incubadas a 28°C com uma suspensão de leptospiros vivas e após duas horas é observada se houve ou não presença de aglutinação através da microscopia de campo escuro (1,6).

Como o teste é sorotipo específico, o painel de antígenos utilizados devem incluir as sorovariedades representativas de todos os sorogrupos preconizadas pela OMS (1). Sendo um teste indirecto ele não é capaz de diferenciar infecções activas de inactivas sendo por isso bastante difícil interpretar os resultados em pacientes que foram previamente vacinados (17,36).

Outra desvantagem importante é que o resultado fornecido pelo MAT pode depender da avaliação do aumento do título de reactividade o que requer análise de amostras pareadas colhidas com intervalo de 15 dias (53). Além disso, os soros de indivíduos com títulos positivos geralmente apresentam reações cruzadas com uma variedade de sorovariedades dificultando assim a identificação da sorovariedade infectante (16,19).

b.2) ELISA (ensaio imunoenzimático)

Os métodos sorológicos são os mais usados e recomendados para fazer o diagnóstico de leptospirose pois eles visam à identificação de anticorpos anti-leptospiros em soros de humanos e animais infectados pela bactéria (3,19). Essas

provas podem ser realizadas em líquido cefalorraquidiano, pleural, sinovial e humor aquoso (10).

Devido à complexidade do MAT, outros testes serológicos com base em ELISA foram desenvolvidos. Os ensaios baseados em ELISA têm como finalidade permitir um diagnóstico precoce em torno de 5 a 7 dias após o início da doença, entretanto ocorre mais frequentemente a partir de 10 dias após o início da doença (19). A ELISA é um teste de alta sensibilidade e que permite detectar anticorpos mais precocemente quando comparado com o MAT (3).

A principal diferença entre os ensaios de ELISA empregados no diagnóstico da leptospirose é o antígeno utilizado na etapa de sensibilização das placas do teste, visto que esses antígenos podem ser extractos bruto de diferentes sorovares ou apenas um único sorovar incluindo cepas patogênicas e não patogênicas (3,53). 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 (53).

Em amostras convalescentes a sensibilidade do ELISA pode alcançar mais que 94% quando comparado com o MAT como padrão (3,51,53).

O ELISA indirecto tem como vantagens a existência de kits comerciais sendo de fácil execução em comparação com o MAT pois minimiza interpretações equivocadas do técnico que executa o teste. Dentre as outras vantagens os reagentes podem ser conservados por longos períodos sem perderem a reactividade e a capacidade de distinção entre uma infecção ocorrida no passado e uma recente por meio da detecção de imunoglobulinas específicas da classe IgM e IgG (53,54).

b.3) Outros testes

Diversos testes sorológicos e testes rápidos foram desenvolvidos, dentre eles a reação de hemaglutinação indirecta, Lepto-disptick e DPP (Dual Path Platform) (16,55).

O teste de hemaglutinação indirecta foi descrito por muitos autores como sendo uma técnica rápida, prática e com alta sensibilidade e especificidade, enquanto os testes rápidos nos formatos Lepto-disptick e lateral-flow são considerados mais promissores para utilização na rotina clínica e reconhecimento precoce de casos (49).

Uma outra plataforma de teste rápido disponível é o DPP, sua tecnologia permite a redução do tempo de resposta do diagnóstico laboratorial (55).

1.8.2 Diagnóstico diferencial

Em relação ao diagnóstico diferencial da leptospirose a maior dificuldade reside nos indivíduos que desenvolvem as formas anictéricas que embora correspondam à maioria dos casos da doença as mesmas passam despercebidas e são confundidas com outros diagnósticos do ponto de vista clínico (2).

Na forma ictérica o número de possíveis diagnósticos incorrectos por conta de outras doenças é minimizado, pois os sinais clínicos tais como: presença de febre, mialgia e icterícia pode conduzir o clínico a suspeitar de leptospirose (44).

Para realizar um diagnóstico diferencial mais correcto diante do panorama epidemiológico devemos levar em consideração as seguintes doenças na fase septicémica: dengue, influenza, hantavirose, apendicite aguda, bacteremias e septicemias, febre tifóide, infecção de vias aéreas superiores e inferiores, malária, pielonefrite aguda, riquetsioses, toxoplasmose, meningites entre outras. E na fase imune: colangite, febre amarela, hepatite, malária, síndrome hepatorenal, septicemias entre outras (2,7,10).

1.8.3 Exames complementares

Os exames complementares para o diagnóstico da leptospirose são usados para indicar as alterações funcionais nos diferentes órgãos infectados pela leptospira. Entre esses exames podemos citar: Hemograma, urinálise, Bioquímica (33,52).

O hemograma pode demonstrar anemia, plaquetopenia e leucocitose. Os valores de bilirrubina podem chegar a níveis bastante elevados principalmente à custa da bilirrubina directa (3).

Os níveis de uréia e creatinina podem estar bastante elevados e ao contrário de outras causas de insuficiência renal aguda pode ocorrer hipocalcemia. Exames de gasometria, raios-x de tórax e eletrocardiograma também auxiliam no acompanhamento clínico da leptospirose (33).

1.9 Prevenção e tratamento

A prevenção da leptospirose é baseada no controle de animais reservatórios por meio de medidas de saneamento do meio, políticas de controle da população de roedores, protecção individual e colectiva contra a infecção directa com animais ou indirecta com ambientes contaminados por *leptospira ssp* (2,10). As pessoas que

realizam actividades de risco tais como veterinários, pessoas que recolhem lixo entre outros devem estar bem instruídos em relação as medidas de segurança trabalhando sempre com equipamento de protecção individual (6).

Os casos graves da doença devem ser tratados com penicilina G intravenosa imediatamente após o diagnóstico. Contudo, nos casos leves é recomendado o tratamento oral com doxiciclina, azitromicina, ampicilina, e amoxicilina (19).

Em relação as medidas profiláticas existem vacinas disponiveis actualmente em países como China, Cuba e França que são baseadas em células inteiras e possuem limitações devido aos eventos adversos, níveis de protecção insuficientes, multidoses e sorovares específicos (36,56).

2. JUSTIFICATIVA

A febre aguda continua sendo uma das maiores causas de procura dos serviços de saúde primários. O conhecimento da etiologia de febre por parte dos clínicos irá permitir o uso racional de medicamentos, bem como a identificar novos agentes etiológicos existentes no país. Desta forma poderá propor-se novos algoritmos no manejo de casos de febre aguda caso. Os dados epidemiológicos para leptospirose em Moçambique são ainda escassos. Para tal, estudos para conhecer a prevalência devem ser conduzidos.

Moçambique é um país em vias de desenvolvimento e com grandes desafios no que diz respeito ao saneamento do meio ambiente e do diagnóstico correcto da doença. A falta de saneamento do meio, o baixo nível educacional, as frequentes chuvas intensas resultantes em grandes inundações, o problema na recolha inadequada dos resíduos sólidos (lixo), a desordenação dos bairros periféricos são alguns dos factores que podem condicionar a ocorrência de casos de leptospirose. Torna-se relevante a realização deste estudo uma vez que o mesmo irá fornecer dados novos sobre a frequência da doença, tipo de sorogrupos circulantes, o que irá contribuir para uma nova abordagem para ajudar a traçar as novas políticas e directrizes para o sistema nacional de saúde. Para além de que irá ajudar a fazer-se um bom rastreamento das doenças por parte dos clínicos evitando assim casos de sub notificação e tratamentos inadequados.

3. OBJECTIVOS

3.1 Objectivo Geral

- ❖ Determinar a frequência da leptospirose em pacientes febris atendidos em hospitais de Moçambique (2012 - 2014).

3.2 Objectivos Específicos

- ❖ Determinar a frequência da leptospirose em pacientes febris atendidos no Hospital Distrital de Caia e Hospital Geral da Polana Caniço (2012 – 2014).
- ❖ Comparar a frequência da leptospirose dos pacientes da região sub-urbana da cidade de Maputo e na região rural no Distrito de Caia (2012 - 2014).
- ❖ Identificar os sorogrupos e sorovares de leptospirose prevalentes para cada área de estudo.
- ❖ Identificar os sinais e sintomas mais frequentes em casos de leptospirose.
- ❖ Determinar a frequência de casos de leptospirose em pacientes febris ao longo do ano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho e população do estudo

Foi conduzido um estudo descritivo transversal em pacientes com síndrome febril agudo atendidos no serviço do ambulatório do Hospital Geral Polana Caniço e do Hospital Distrital de Caia entre os períodos de Julho de 2012 a Setembro 2014. De cada paciente foram colhidas 10ml de amostras pareadas de sangue correspondente a fase aguda e de convalescência da doença febril.

O Hospital Geral da Polana Caniço é uma unidade sanitária pertencente a área de saúde de Mavalane na Cidade de Maputo. Este Hospital está situado na região sub-urbana da cidade de Maputo, enquanto o Hospital Distrital de Caia está situado no distrito de Caia que é uma zona rural situado na província de Sofala no centro do país.

4.2 Distrito de Caia

O distrito de Caia é limitado pelo distrito de Chemba a Nordeste e rio Zambeze a Este, a Nordeste e Oeste faz limite com o distrito de Maringue, e a Sul limitado pelos distritos de Cheringoma e Marromeu (57).

O distrito de Caia possui uma superfície de 3.542 km² e uma população estimada à data de 1/1/2005 em 107.477 habitantes com uma densidade populacional de 30 hab/km². O clima de Caia é em geral sub-árido moderado ao longo do vale e para Norte a sub-húmido no interior e para Sul. A precipitação média anual é de 987mm sendo o regime de chuvas constante na região de Novembro à Março. A população é jovem (45% abaixo dos 15 anos de idade), maioritariamente feminina e de matriz rural (taxa de urbanização de 12%). A agricultura e a pecuária são actividades dominantes que envolvem quase todos agregados familiares (57).

Com 80% da população analfabeta predominantemente por mulheres, o distrito de Caia tem uma taxa de escolarização muito baixa, constatando-se que somente ¼ dos seus habitantes frequentam ou já frequentaram cursos de alfabetização ou a escola primária (57).

O sistema de distribuição de água canalizada é escassa no distrito, verifica-se que na sua maioria a população recorre directamente a poços ou furos (82%) ou nos rios (17%). Em termos de electrificação o distrito possui energia eléctrica em uma percentagem muito baixa (1,4%), tendo também disponível algumas alternativas tais como petróleo, carvão, vela, bateria e lenha (57).

4.3 Bairro da Polana Caniço

O bairro da Polana Caniço A, tem um efectivo populacional de 45 528 habitantes o que equivalente a 4,7% da população total da cidade de Maputo, sendo que 22.322 são homens e 23.561 são mulheres (58).

A Norte e Este, é limitado pelo Bairro da Polana Caniço B, a Sul pelo Bairro Sommerschild, a Oeste pelo Bairro da Maxaquene C. A localização deste bairro é estratégica na medida em que seus limites são algumas avenidas da cidade de Maputo que permitem o fácil acesso ao centro peri-urbano, como é o caso da avenida Julius Nyerere e Avenida Vladimir Lenine (58).

O comércio constitui a principal actividade económica e fonte de renda da maioria dos habitantes deste centro urbano e para a população residente na área em estudo.

Em relação ao abastecimento de água, a maior parte da população dispõe de ligações domiciliárias, mas também existe no bairro duas fontenárias para abastecer água potável as populações sem condições para a ligação domiciliária (58).

O bairro dispõe da energia eléctrica da rede nacional. A maioria da população que vive nesta região é abrangida pelo sistema de fornecimento de energia domiciliária, contudo uma minoria usa energias alternativas como carvão vegetal, gás e petróleo em parte para iluminação das respectivas casas e em outra para a cozinha e outros usos (58).

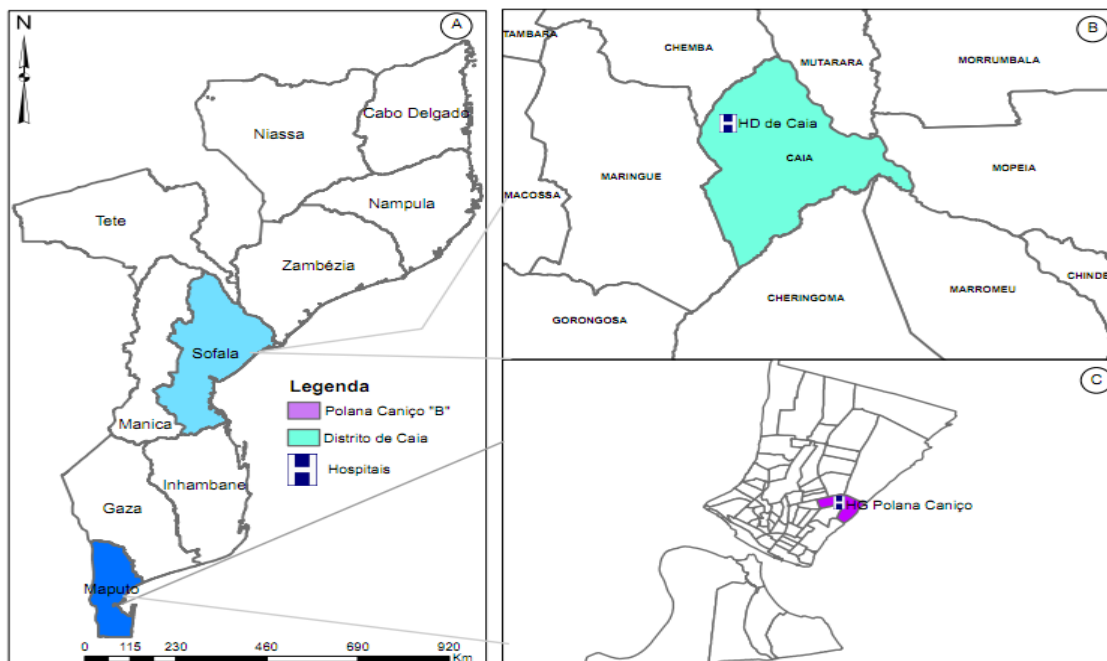


Figura 8. Mapa geográfico da área de estudo **A.**localização geográfica de Moçambique. Localiza-se na África Austral. **B.**Localização geográfica do distrito de Caia localizado na província de Sofala no centro de Moçambique. **C.**Localização geográfica do Bairro da Polana Caniço B pertencente a área de saúde de Mavalane na cidade de Maputo.

4.4 Tamanho Amostral

O tamanho amostral foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$n = Z^2 [P (1-P)] / D^2$$

$$= 1,96^2 [16 (1-16)] / 5^2$$

$$= 693$$

n tamanho amostral,

Z valor da distribuição normal padrão correspondente ao nível de confiança desejado (Z= 1,96 para intervalo de Confiança - IC 95%),

P prevalência esperada (16%)

D erro máximo aceitável na estimativa (5%).

4.5 Critérios de inclusão ao estudo

- ❖ Aceitar a participar no estudo e dar o consentimento informado,
- ❖ Ter idade \geq 5anos,
- ❖ Paciente com quadro febril (temperatura axilar \geq 38 °C), e que tenham mais um dos seguintes sintomas: mialgia, calafrios dores nas articulações, febres, diarreia, vômitos, náuseas, hemorragias, conjuntivite, cefaleias de causa desconhecida.

4.6 Critérios de exclusão ao estudo

- ❖ Mulheres grávidas por considerarem-se grupos vulneráveis
- ❖ Pacientes imunossuprimidos e doentes mentais

4.7 Definição de caso de leptospirose

4.7.1 Caso suspeito: Todo o indivíduo que cumpre com os requisitos para inclusão no estudo

4.7.2 Caso presumptivo: Todo indivíduo suspeito que cuja serologia para leptospirose seja IgM(+)/MAT \geq 100&MAT<400.

4.7.3 Caso confirmado: Todo o caso presumptivo cuja serologia para leptospirose seja MAT \geq 400.

4.8 Colheita e Processamentos das amostras

As amostras foram colhidas na unidade sanitária onde os estudos foram realizados.

De cada paciente foram colhidas amostras pareadas correspondentes a fase aguda e de convalescência. A amostra aguda foi colhida no momento em que o paciente se apresentou na consulta, e a amostra convalescente 15 dias após a 1ª consulta.

As amostras foram centrífugadas a 800G por 10 minutos. O soro foi colocado em alíquotas com ajuda de uma pipeta seguindo as normas de GCP e armazenadas a -70°C. De seguida as amostras foram transportadas para o laboratório do Instituto Nacional de Saúde onde foram armazenadas até o seu reenvio ao Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro para o seu processamento.

A técnica de ELISA foi feita no laboratório de tecnologia de diagnóstico (LATED) em Bio- Manguinhos/Fiocruz. As avaliações pela técnica do MAT (padrão de ouro)

foram realizadas no Centro Nacional de Referência para a Leptospirose no Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

4.9 Testagem Laboratorial

4.9.1 ELISA (Microarranjo de proteínas recombinantes)

O teste de ELISA foi realizado usando um protocolo *in house* que foi padronizado usando duas proteínas purificadas recombinantes da espécie *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Os fragmentos das proteínas LigA e LigB denominados LigANI e LigB7-11 nas concentrações de 1,6mg/ml e 2,3mg/ml foram as proteínas usadas para o desenvolvimento dos ensaios.

Foram utilizadas as placas de poliestireno de fundo chato de marca NUNC™ com cavidade para 96 poços. As placas foram sensibilizadas com a concentração de 100ng de proteína por poço em tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH de 9,6 incubadas em geladeira overnight (2-8°C). Após essa etapa as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (0.5% BSA e 10% de soro bovino). O soro foi adicionado 100µl de soro diluído em diluente da amostra nas diluições de 1:100 e incubados por 30min a 37°C. A seguir as placas foram lavadas por 5x com o tampão de lavagem (PBS-Tween) em uma lavadora automática de marca Hydroflex modelo TECAN fornecida pela RCHISTO. Para revelação foram usados os anticorpos secundários (conjugados) anti-IgG humana marcada com peroxidase (Fab specif) SIGMA A0293 1ml lote: 023M4856 e o anti-IgM humana marcada com peroxidase lote:154EXCJHP001Z. Foram adicionados 100µl de conjugado diluído com o diluente da amostra (2x) a 1:2000 para IgM e 1:2500 para IgG e incubados por 30min a 37°C. Em seguida foi repetido o procedimento de lavagem de acordo com descrito após a etapa de incubação com o soro acima. Após a etapa de lavagem acrescentou-se 100µl de solução reveladora (TMB) e incubou-se no escuro por 10 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando ácido sulfúrico a 2M. Procedeu-se a leitura fotocolorimétrica na leitora de placa de marca Sunrise modelo TECAN fornecida pela RCHISTO com nr de série 1011004911 com um filtro de 450nm através de um programa de nome Magellan V.8. As amostras testadas foram consideradas positivas para IgM/IgG quando a leitura fotocolorimétrica ultrapassar a média dos títulos de soros controles-negativos e

acima de três (3) desvio padrão (valores do cut-off): 0,224 para IgM e 0,279 para IgG.

4.9.2 Cálculo do *Cut off*

O cut off foi determinado utilizando a seguinte fórmula: Cut-Off: $CO = X \text{ CN} \times 2,3$

CO = Cut-Off

X CN = Média da densidade óptica dos poços do controle negativo

As amostras foram consideradas reactivas: as que apresentarem densidade óptica igual ou superior ao Cut-Off.

Amostras não reactivas: as que apresentarem densidade óptica igual ou inferior ao Cut-Off

Cálculo da Faixa Cinza (FC): $FC = CO \times 1,2$

4.9.3 Perfil das amostras de soro usados para controle.

Foram usados 113 soros conhecidos dos quais 29 soros positivos e 84 soros negativos provenientes de áreas endêmicas (Hemoba) e áreas não endêmicas (Hemorio) do Estado de Salvador da Baía, Rio de Janeiro.

Foram também testadas amostras de grupo de pacientes conhecidos para as seguintes doenças: 15 casos para HCV, 15 casos para HIV, 15 casos para HBV, 15 casos para Sífilis, 15 casos para dengue (NS1) e 15 casos para malária (*plasmodium falciparum* e *Vivax*)

4.9.3.1 Amostras de controle Positivo: Foram usadas 29 amostras de pacientes confirmados com leptospirose em fase convalescente e fase aguda provenientes de área endêmica (Salvador da Baía).

4.9.3.2 Amostras de controle Negativo: As 84 amostras de soro de Hemoba foram usadas como controle negativo.

4.9.4 MAT

A base diagnóstica do MAT é formada pela reacção de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno para os diferentes srotipos circulantes da leptospira (ver anexo II).

A técnica de aglutinação microscópica em tubos com 19 painéis de antígenos vivos com leitura em campo escuro foi realizada segundo recomendações da Organização

Mundial de Saúde. Foram utilizadas culturas de cepas-padrão de *Leptospira*, em meio líquido de Ellinghausen (EMJH), sendo dezanove variantes sorológicas de *leptospiras* patogênicas.

Tabela 3. Soros imunes de referência recomendados pela OMS utilizados no teste de MAT para identificação de sorovares

Código	Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Cepa
1	<i>L.interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagia e	RGA
2	<i>L.interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
3	<i>L.interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
4	<i>L.Kirshneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva
5	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
6	<i>L.interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
7	<i>L.interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
8	<i>L.borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón 3
9	<i>L.Kirshneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
10	<i>L.borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
11	<i>L.noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
12	<i>L.interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
13	<i>L.interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitn o
14	<i>L.borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
15	<i>L.biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc I
16	<i>L.borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepeletsin
17	<i>L.interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
18	<i>L.interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
19	<i>L.interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705

Fonte: WHO,2003

4.9.5 Interpretação dos Resultados

4.9.5.1 ELISA

Amostras reactivas: As que apresentarem densidade óptica igual ou superior ao Cut-Off

Amostras não reactivas: As que apresentarem densidade óptica igual ou inferior ao Cut-Off

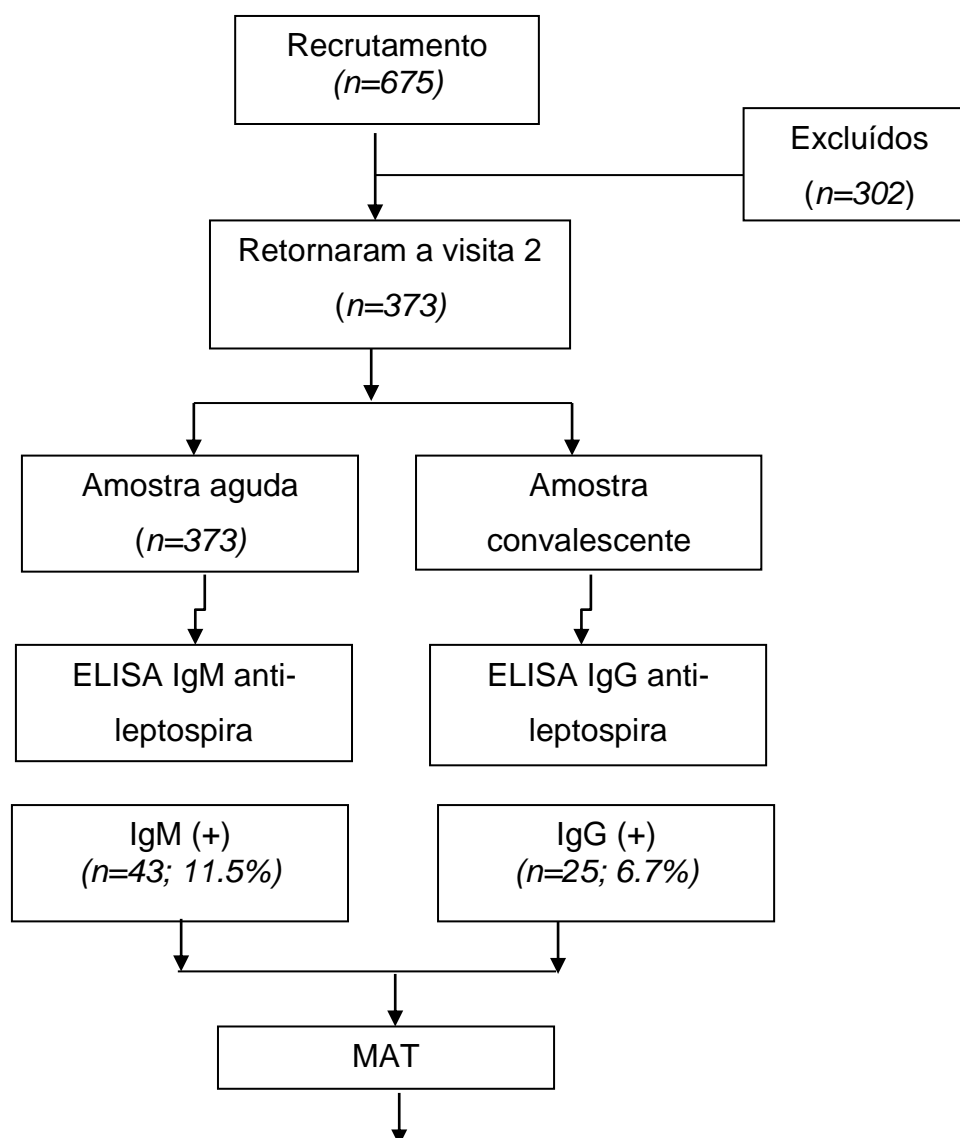
Cálculo da Faixa Cinza (FC): $FC = CO \times 1,2$

4.9.5.2 MAT

Para este estudo considera-se caso confirmado de leptospirose o seguinte:

Critério clínico-laboratorial - presença de sinais e sintomas clínicos compatíveis com a doença e resultado confirmado pelo laboratório: [MAT>400].

5. FLUXOGRAMA DE TESTAGEM DAS AMOSTRAS



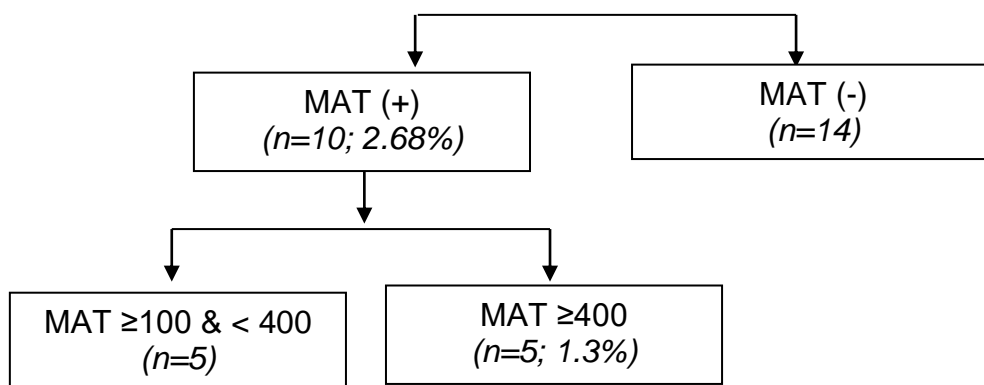


Figura 9. Fluxograma do recrutamento de pacientes e testagem das amostras. Um total de 675 pacientes foram recrutados dos quais 302 não retornaram à 2ª visita de seguimento e foram excluídos. A amostra aguda de 373 indivíduos foi testada por ELISA IgM e as amostras de convalescença foram testadas por ELISA IgG. Um total de 43 amostras agudas e 25 amostras de convalescença foram positivas por IgM e IgG, respectivamente, das quais 24 eram positivas para ambas IgM (+) e IgG (+) e todas as amostras IgM(+) e IgG(+) foram testadas por MAT e 10 foram positivos.

6. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram introduzidos no programa estatístico Epi-info versão 7 e analisados no programa estatístico SPSS V.20 para elaboração das tabelas e os respectivos gráficos. Para a comparação dos grupos do estudo foi usado o teste de Fisher para as variáveis categóricas e o teste Kruskal wallis para variáveis numéricas. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os protocolos foram submetidos ao Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) e tiveram as suas aprovações com a Ref: 222/11 para SIFA (ver anexo IV) e Ref: 316/CNBS/12 para VFA (ver anexo V).

8. RESULTADOS

8.1 Características gerais dos participantes e prevalência de leptospirose

Entre Julho de 2012 à Setembro de 2014, foram recrutados 675 pacientes febris agudos, dos quais 302 não retornaram para visita de seguimento no período de convalescência e foram excluídos do estudo. Dos 373 que retornaram a visita de seguimento, 208 eram do Hospital Geral Polana Caniço e 165 eram do Hospital Distrital de Caia. O tempo médio entre a amostra aguda e a amostra convalescente foi de 21 dias. A idade média dos pacientes atendidos no Hospital Geral Polana Caniço foi de 33 anos (IQR: 24 - 47 anos) e 51% (106/208) eram do sexo masculino. Por outro lado, a idade média dos pacientes atendidos no Hospital Distrital de Caia foi de 12 anos (IQR: 8-28 anos) e 61% (100/165) eram do sexo feminino.

A frequência de anticorpos IgM anti-leptospira nas amostras agudas foi de 11,5% (43/373) e a frequência de anticorpos IgG anti-leptospira nas amostras convalescentes foi de 6,7% (25/373). Um total de 24 pacientes foram duplamente IgM/IgG positivo (6,4%). O MAT foi realizado em todos os pacientes com IgM (+) e IgG (+), dos quais 10 tiveram títulos reactivos entre 1:100 à 1:800.

De acordo com a definição de caso, um total de 38 (10,2%) pacientes responderam à definição de infecção presumptiva [IgM(+) / MAT \geq 100 & MAT <400] e um total de 5 (1,3%) pacientes responderam à definição de infecção recente confirmada MAT \geq 400 (ver tabela 4).

Tabela 4. Casos de indivíduos presumptivos e confirmados no diagnóstico da leptospirose de acordo com a área de estudo.

Proveniência	Total de indivíduos	ELISA	Casos Presumptivos	Casos Confirmados
		[IgM(+)]	[IgM(+)/MAT \geq 100 & MAT <400]	[MAT \geq 400]
		n (%)	n (%)	n (%)
Hospital Geral Polana Caniço	208	9 (21)	6 (16)	3 (60)
Hospital Distrital de Caia	165	34 (79)	32 (84)	2 (40)
Total	373	43 (11.5)	38 (10.2)	5 (1.3)

8.2 Características clínicas e demográficas dos grupos do estudo

A idade mediana dos casos confirmados foi ligeiramente superior à dos casos presumptivos (15 anos nos casos presumptivos versus 32 anos nos casos confirmados, respectivamente), e a mediana dos casos negativos foi de 27,5. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0.241$). A prevalência nos casos presumptivos de leptospirose foi maior na faixa etária dos [5 - 15] anos, mas em relação aos pacientes confirmados e negativos verificou-se uma distribuição similar em relação as outras faixas etárias (ver tabela 5).

Relativamente a distribuição dos participantes por sexo, a maior parte dos pacientes com infecção presumptiva assim como confirmada pertenciam ao sexo feminino 66% (25/38) e 60% (3/5), respectivamente.

Dos 5 casos confirmados, 60% (3/5) viviam em áreas suburbanas, mas analisando a combinação dos casos presumptivos e casos confirmados verificou-se que 79,1% (34/43) eram provenientes de uma zona rural. 60,3% (199/330) dos pacientes com resultado negativo viviam em áreas suburbanas.

Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p=0.432$) no que concerne ao nível de escolaridade entre os casos presumptivos e os casos confirmados.

O contacto com roedores foi analisado entre pacientes presumptivos/confirmados em relação aos casos negativos, e constatou-se que 46,5% (20/43) dos casos presumptivos/confirmados tiveram contacto com roedores, comparado com os 41,8% (138/330) dos casos negativos. E quando comparamos o contacto com roedores de casos confirmados em relação a casos presumptivos, verificou-se que 100% (5/5) dos casos confirmados tinham contacto com roedores comparado a 39,5% (15/38) dos casos presumptivos.

A cefaleia, calafrios, náuseas e anorexia com 100% (5/5), respectivamente, foram os principais sinais e sintomas associados a casos confirmados de leptospirose (tabela 5).

Tabela 5. Características dos pacientes presumptivos e confirmados dos dois locais do estudo.

Dados epidemiológicos	Total de casos n (%)	Casos presumptivos (IgM+/MAT≥100 & < 400) n (%)	Casos confirmados (MAT≥400) n (%)	Casos negativos n (%)	*p-value
Total	373 (100)	38 (10.2)	5 (1.3)	330 (88.5)	
Idade					
Mediana	26	15	32	27,5	0.241
IQR	14-40	9-27	17-50	18-42	
Sexo					
Masculino	171 (45.8)	13 (34.2)	2 (40.0)	156 (47.3)	**0.299
Feminino	202 (54.2)	25 (65.8)	3 (60.0)	174 (52.7)	
Faixa etaria					
[5 - 15]	97 (26.0)	18 (47.4)	1 (20.0)	78 (23.6)	
[16 - 25]	76 (20.4)	6 (15.8)	1 (20.0)	69 (20.9)	
[26 - 35]	77 (20.6)	7 (18.4)	0 (0.0)	70 (21.3)	
[36 - 45]	49 (13.1)	4 (10.15)	2 (40.0)	43 (13.0)	0.072
[46 - 55]	48 (12.9)	1 (2.6)	0 (0.0)	47 (14.2)	
[56 - 65]	18 (4.8)	2 (5.3)	1 (20.0)	15 (4.6)	
> 66	8 (2.1)	0 (0)	0 (0)	8 (2.4)	
Regiao					
Sub-urbana (Maputo)	208 (55.8)	6 (15.8)	3 (60.0)	199 (60.3)	0.000
Rural (Caia)	165 (44.2)	32 (84.2)	2 (40.0)	131 (39.7)	
Nivel de escolaridade					
Nenhum	115 (30.8)	16 (42.1)	1 (20.0)	98 (29.7)	
Primario	152 (40.8)	17 (44.7)	2 (40.0)	133 (40.3)	0.432
Secundario	102 (27.4)	5 (13.2)	2 (40.0)	95 (28.8)	
Universitario	4 (1.1)	-	-	4 (1.2)	-
Contacto com roedores					
Sim	158 (42.4)	15 (39.5)	5 (100)	138 (41.8)	0.031
Nao	215 (57.6)	23 (60.5)	0 (0)	192 (58.2)	
Sinais e sintomas					
Cefaleias	373 (100)	38 (100)	5 (100)	330 (100)	-
Calafrios	350 (93.8)	37 (97.4)	5 (100)	308 (93.3)	0.524
Nauseas	320 (85.8)	31 (81.6)	5 (100)	284 (86.1)	0.496
Anorrexia	300 (80.4)	31 (81.6)	5 (100)	264 (80.0)	0.525
Tosse	215 (57.6)	15 (39.5)	4 (80.0)	196 (59.4)	0.037
Dor Abdominal	200 (53.6)	15 (39.5)	4 (80)	181 (54.9)	0.097
Mialgia	197 (52.8)	15 (39.5)	4 (80)	178 (53.9)	0.113
Artralgia	184 (49.3)	14 (36.8)	3 (60.0)	167 (50.6)	0.245
Fotobia	106 (28.4)	11 (28.9)	1 (20.0)	94 (24.5)	0.914
Vomitos	84 (22.5)	7 (18.4)	0 (0)	77 (23.3)	0.378
Ictericia	12 (3.2)	0 (0)	0 (0)	12 (3.6)	0.446

*Teste Qui-quadrado; ** Test Mann Whitney.

8.3 CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE

ELISA.

Os cálculos de sensibilidade e especificidade dos testes (IgM e IgG) foram feitos com base numa tabela 2x2 ver anexo I.

8.3.1 Sensibilidade: Das 29 amostras positivas (indivíduos sabiamente conhecidos como tendo leptospirose) teve 88% para ELISA IgM e 81% para ELISA IgG.

8.3.2 Especificidade: Das 84 amostras negativas (indivíduos sabiamente conhecidos como não tendo leptospirose) teve 99% para ELISA IgM e 95% para ELISA IgG.

8.3.3 Valor Preditivo Positivo (VPP): O VPP expressa a probabilidade da doença quando o resultado do teste é positivo. O ELISA IgM teve um VPP de 97% e o ELISA IgG teve um VPP de 86%

8.3.4 Valor Preditivo Negativo (VPN): Refere-se à probabilidade de não-ocorrência da doença quando o resultado do teste é negativo. O ELISA IgM teve um VPN de 95% e o ELISA IgG teve um VPN de 93%.

8.3.5 Eficiência do teste: Refere-se aos verdadeiros positivos mais os verdadeiros negativos em relação ao total de amostras. A eficiência do ELISA IgM foi de 96 % e do ELISA IgG foi de 91%.

8.4 Desempenho do teste ELISA IgM anti-leptospira.

O teste ELISA baseado em microarranjo de duas proteínas por nós desenvolvido mostrou-se bastante sensível na fase inicial da doença. A figura abaixo demonstra que houve um predomínio de casos positivos para leptospirose no 1º, 2º e 3º dias após o início da febre.

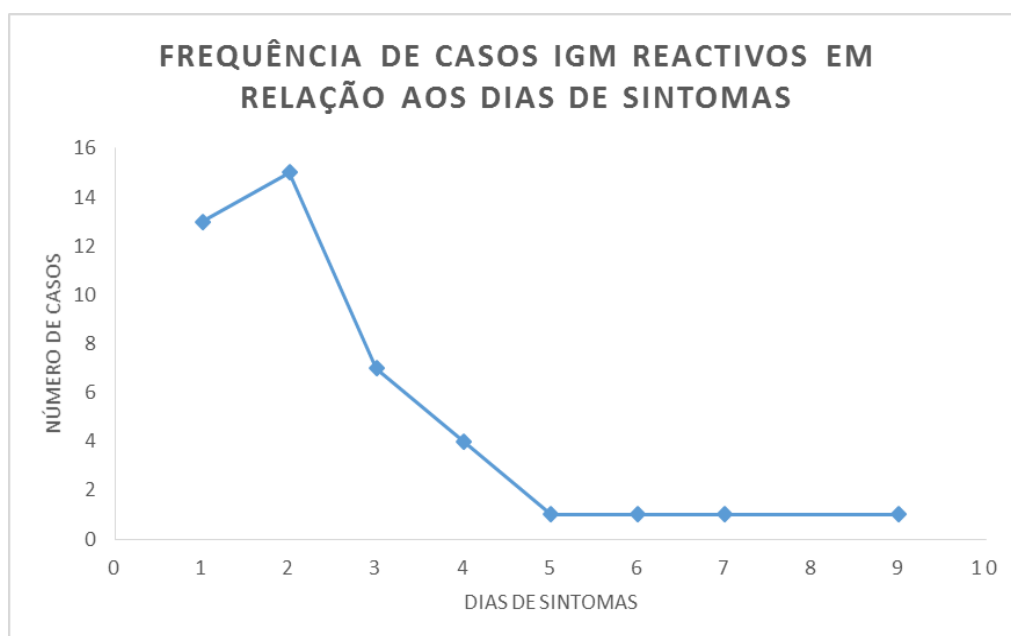


Figura10. Frequência de indivíduos IgM reactivos pelo método ELISA em diferentes dias após o início da febre.

8.5 Sorogrupos e sorovares de leptospirose

Dos 24 pacientes que foram positivos no ELISA, 10 foram confirmados pelo MAT (teste confirmatório). O sorogrupo *Australis* foi o mais predominante com 40% (4/10) seguido do *Icterohaemorrhagiae* com 30% (3/10).

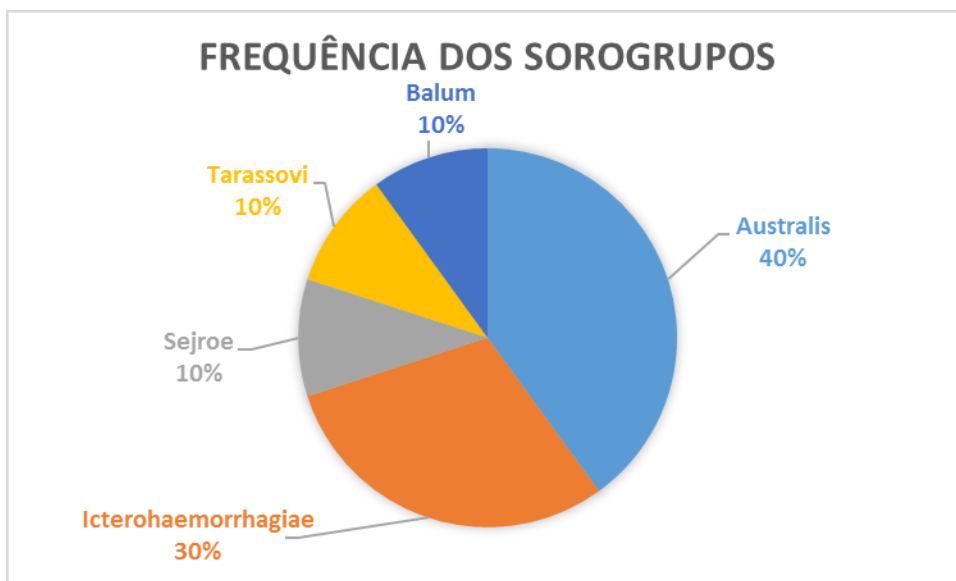


Figura 11. Frequência dos sorogrupos confirmados no MAT

Os sorovares mais encontrados neste estudo foram o *Australis* com 25% (4/16) e seguido de *Icterohaemorrhagiae*, *Tarassovi*, *Autumnalis* com 12,5% (2/16) respectivamente.

Outros sorovares encontrados foram *Copenhageni*, *Sejroe*, *Castellonis*, *Grippothyphosa*, *Hebdomadis* e *Wolfii* com 6,3 % (1/16) cada.

O título de 1:100 apesar de ser o mais baixo foi o mais predominante com 50% (8/16).

As titulações das amostras variaram entre títulos 1:100 e 1:800.

Os títulos mais altos (1: 800) foram encontrados na área rural (distrito de Caia) e todos eram do sorovar *Australis* (ver tabela 6).

Tabela 6. Frequência dos sorovares e respectivos títulos confirmados por MAT

Sorovar	Título				Total	%
	1:100	1:200	1:400	1:800		
<i>Australis</i>	-	1	1	2	4	
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	1	-	-	2	25
<i>Copenhageni</i>	1	-	-	-	1	12.5
<i>Sejroe</i>	-	-	1	-	1	6.25
<i>Tarassovi</i>	1	1	-	-	2	6.25
<i>Autumnalis</i>	2	-	-	-	2	12.5
<i>Castellonis</i>	-	-	1	-	1	12.5
<i>Grippothyphosa</i>	1	-	-	-	1	6.25
<i>Hebdomadis</i>	1	-	-	-	1	6.25
<i>Wolffi</i>	1	-	-	-	1	6.25
						6.25

Dois pacientes foram reactivos simultaneamente para dois sorovares diferentes e outros dois foram reactivos para três sorovares. A *L.interrogans* foi a espécie mais frequente com 70% (7/10), seguido por *L.borgpetersenii* com 20% (2/10) e *L. Kirshneri* com 10% (1/10).

Todos os pacientes que tiveram a definição de caso confirmado de leptospirose foram testados para malária e os mesmos foram negativos. Mesmo assim, 80% (4/5) dos mesmos foram tratados com antimaláricos (ver tabela 7).

Tabela 7. Relação dos sorovares, sorogrupos e espécies encontrados em pacientes confirmados, bem como a sua abordagem terapêutica de acordo com a sua área de proveniência

#	Prov.	Dias de sintomas	Data de Recrutamento	Teste de Malaria	Tratamento	Título	Sorovar	Sorogrupo	Espécie
1		2	4/09/2013	Negativo	Antibiótico	1:200	Tarassovi	Tarassovi	<i>L.interrogans</i>
2	Hospital Geral da Polana Caniço	2	31/10/2013	Negativo	Antimalárico	1:200	Ictero	Ictero	<i>L.interrogans</i>
3		3	11/02/2014	Negativo	Antibiótico	1:400	Australis	Australis	<i>L.interrogans</i>
4		3	12/03/2014	Negativo	Antimalárico	1:400	Sejroe	Sejroe	<i>L.borgpetersenii</i>
5		1	22/04/2014	Negativo	Antimalárico	1:400	Grippothyphosa	Grippothyphosa	<i>L. Kirshneri</i>
						1:800	Castellonis	Ballum	<i>L.borgpetersenii</i>
6		1	23/02/14	Negativo	Antimalárico	1:100	Australis	Australis	<i>L.interrogans</i>
						1:100	Autumnalis	Autumnalis	<i>L.interrogans</i>
						1:100	Tarassovi	Tarassovi	<i>L.borgpetersenii</i>
7	Hospital Distrital de Caia	2	27/04/14	Negativo	Antibiótico	1:100	Ictero	Ictero	<i>L.interrogans</i>
						1:100	Copenhageni	Ictero	<i>L.interrogans</i>
						1:800	Australis	Australis	<i>L.interrogans</i>
8		4	2/06/14	Negativo	Antimalárico	1:100	Autumnalis	Autumnalis	<i>L.interrogans</i>
						1:100	Hebdomadis	Hebdomadis	<i>L.interrogans</i>
9		7	17/08/14	Negativo	Antibiótico	1:200	Australis	Australis	<i>L.interrogans</i>
10		3	9/09/14	Negativo	Antimalárico	1:100	Wolffi	Sejroe	<i>L.interrogans</i>

8.6 Distribuição de casos de leptospirose ao longo do ano (2012 – 2014).

Os casos confirmados de leptospirose foram registados entre os meses de Fevereiro a Maio.

Tabela 8. Número de casos de leptospirose ao longo do ano (2012 – 2014).

Mês	Total de participantes n	Casos presumptivos (IgM+/MAT≥100) n (%)	Casos confirmados (MAT≥400) n (%)	Casos negativos n (%)
Total	373	38 (10.1%)	5 (1.3%)	330 (88.5)
Janeiro	33 (8.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	33 (10.0)
Fevereiro	26 (7.0)	1 (2.60)	2 (40.0)	23 (7.0)
Marco	35 (9.4)	3 (7.9)	1 (20.0)	31 (9.4)
April	45 (12.1)	3 (7.9)	1 (20.0)	41 (12.4)
Maio	49 (13.1)	7 (18.4)	1 (20.0)	41 (12.4)
Junho	24 (6.4)	5 (13.2)	0 (0.0)	19 (5.8)
Julho	28 (7.5)	3 (7.9)	0 (0.0)	25 (7.6)
Agosto	47 (12.6)	10 (26.3)	0 (0.0)	37 (11.2)
Setembro	35 (9.4)	3 (2.6)	0 (0.0)	32 (9.7)
Outubro	22 (5.9)	1 (5.3)	0 (0.0)	21(6.4)
Novembro	21 (5.6)	2 (5.3)	0 (0.0)	19 (5.8)
Dezembro	8 (2.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (2.4)

9. DISCUSSÃO

Neste estudo encontramos uma frequência de leptospirose de 11,5% utilizando ELISA e 1.3% utilizando MAT. Estas percentagens podem não espelhar a real situação da frequência da doença nestas duas regiões do país, uma vez que tivemos quase metade dos participantes excluídos do estudo por não possuírem amostras de convalescência. De acordo com (33), a obtenção da amostra convalescente permanece ainda um grande desafio para o diagnóstico da leptospirose.

A técnica ELISA tem sido muito utilizada na triagem de casos de leptospirose por acreditar-se que possui alta sensibilidade na fase inicial da doença em relação a técnica MAT. Neste estudo a sensibilidade do teste ELISA IgM baseado no microarranjo de duas proteínas (Lig ANI e LigB) foi de 88% para amostra aguda no 1º, 2º e 3º dias de sintomas, reforçando o grande papel que estas duas proteínas tem no diagnóstico laboratorial da leptospirose na fase inicial da doença. Estes achados são similares aos encontrados em estudos já publicados (33).

Microarranjos de proteínas constituem uma ferramenta muito importante na caracterização de anticorpos específicos contra patógenos após exposição a um agente infeccioso (59).

A menor frequência encontrada no MAT comparada ao ELISA pode ser explicada pelo facto de que alguns dos sorovares que são prevalentes na região subsaariana não terem sido incluídos no painel usado neste estudo, por exemplo, o sorovar Sokoine que é conhecido por ser altamente prevalente na África não foi utilizado em nosso estudo (29).

Por outro lado, embora o MAT seja considerado o padrão-ouro, a sua sensibilidade é inferior em comparação com o ELISA principalmente durante a fase aguda da doença (3,16).

Um estudo realizado na Tanzânia mostrou que após a incorporação do sorovar Sokoine no painel usado para MAT, a prevalência de leptospirose aumentou de 0,26% para 10,75% (29).

A falta de cepas vivas que são isoladas localmente em África para serem incluídas no painel MAT foi considerada uma das grandes limitações para a detecção de casos de leptospirose na região (29).

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que relata os sorovares e sorogrupos de leptospirose encontrados em Moçambique. Os sorogrupos mais comuns

encontrados neste estudo foram *Australis* e *Icterohaemorrhagie*, estes resultados vão de acordo com os achados na maioria dos manuscritos publicados na África subsaariana (29–31).

A frequência de contacto com roedores foi ligeiramente maior quando comparado os pacientes confirmados/presumptivos com aqueles com resultados negativos, mas foi significativamente maior quando comparamos pacientes confirmados com aqueles com infecção presumptiva. Isso é difícil de interpretar, pois esperávamos que ambos grupos tanto os confirmados assim como os presumptivos tivessem maior exposição aos roedores. No entanto, esta situação pode ser explicada pelo facto de que os pacientes com infecção presumptiva tenham tido uma infecção anterior por leptospirose.

A presença de sorogrupos *Australis* e *Icterohaemorrhagiae* que são conhecidos por serem portadores reservatórios de roedores e bovinos, sugerem que a exposição directa ou indirecta a esses animais ou pelo contacto com a urina dos roedores representa uma importante fonte de infecção (30,31). Curiosamente, um estudo recente realizado na Tanzânia encontrou alta prevalência de leptospirose em humanos, animais domésticos e roedores, demonstrando o papel desses animais na cadeia de transmissão (31). No entanto, em Moçambique não existem dados sobre a leptospirose em animais.

A espécie *L.interrogans* foi a espécie mais frequente seguida por *L.borgpetersenii* e *L. Kirshneri*. De acordo com (30) em sua recente revisão sobre a epidemiologia da leptospirose na África Subsaariana relataram achados semelhantes.

Nosso estudo mostrou evidências da existência de casos confirmados de leptospirose entre os participantes do Distrito de Caia (zona urbana), bem como também dos participantes que vivem nas áreas suburbanas da cidade de Maputo, reforçando evidências actuais de que a leptospirose está se expandindo de seu ambiente tradicional para as cidades (11,22). Assumindo que nas próximas décadas a maior parte da população mundial estará vivendo em ambientes suburbanos (4,60), com o aquecimento global e por consequência uma maior incidência de acidentes naturais (4), podemos antecipar que a leptospirose se tornará uma grande ameaça para a saúde pública, agravado ainda por ser uma doença negligenciada a nível global (3,4,11,12,61).

Moçambique está particularmente exposto ao risco de surtos ou de epidemia de leptospirose uma vez que o país é classificado como o terceiro país mais vulnerável

a eventos climáticos extremos no continente Africano e além disso possui a maior população urbana da África Oriental (62,63).

Um total de quatro indivíduos apresentaram reactividade positiva para mais de um sorovar, dentre os quais um na área suburbana e três na área rural. Possivelmente, estes indivíduos poderão ter sido expostos a diferentes sorovares situação comum na área rural em comparação com a área suburbana. Contudo, devemos ter em consideração a limitação metodológica do estudo quando formos analisar a questão da reactividade cruzada entre alguns sorovares e sendo assim devemos considerar como caso positivo para leptospirose aquele indivíduo que apresentar o sorovar com o maior título. Estes achados já foram relatados por autores anteriores (3,11,31).

A maioria dos casos confirmados eram do sexo feminino. Embora isso possa ser parcialmente explicado pelo facto de que mais de 50% dos participantes eram do sexo feminino, por outro lado este foi um achado inesperado. Importa salientar que não existe diferença entre ambos sexos no que se refere a infecção por leptospirosas, e que os dois tem a mesma probabilidade de estarem infectados quando expostos a diferentes fontes de infecção (45,46).

Resultados de estudos realizados por outros grupos em várias partes do mundo, mostraram que os homens tem um maior risco de adquirir leptospirose devido à sua maior exposição ocupacional e recreativa (6).

Quando avaliamos a variável faixa etária, nossos dados mostraram que a leptospirose era mais comum em jovens e adultos, o que condiz com os achados de outros estudos que demonstraram que esses grupos etários estão mais expostos à leptospirose por participarem com maior frequência em actividades recreativas ou ocupacionais (6).

Os sinais e sintomas mais comuns de pacientes com leptospirose confirmada foram cefaleias, calafrios, náuseas e anorexia com 100%, respectivamente. Não houve relatos de nenhum caso grave. Embora esses achados sejam semelhantes aos relatados por (3), reconhecemos que o desenho do nosso estudo não foi apropriado para identificar pacientes com leptospirose grave uma vez que os pacientes foram recrutados de uma consulta ambulatória nos serviços de cuidados de saúde primários onde a maioria dos pacientes se apresenta com diversas sintomatologias e o foco era identificar outras doenças e não leptospirose. Este factor deve ser considerado como um factor importante que teve bastante influência

na baixa de frequência de leptospirose encontradas em nosso estudo em Moçambique.

Devemos ter em mente que a maioria dos casos de leptospirose se apresentam de diversas formas, desde formas agudas a formas mais graves e que as mesmas podem ser confundidas com sintomas de diversas doenças comuns em nosso país (3,19).

Em nosso estudo identificamos um total de quatro pacientes que cumpriram a definição de infecção recente por *leptospira* no qual foram tratados com antimaláricos embora os resultados da malária fossem negativos. A malária é doença negligenciada e de elevada incidência em Moçambique, sendo assim a maioria dos casos de leptospirose são diagnósticos de forma errada como casos de malária. Existe uma necessidade urgente de se melhorar os algoritmos nacionais de manuseio da febre e da malária em Moçambique para evitar o uso inadequado de antimaláricos e garantir um diagnóstico correcto para que os doentes possam receber o tratamento adequado (64).

A falta de conhecimento sobre a doença, a falta clara de sinais e sintomas específicos da leptospirose, além da deficiência de capacidade laboratorial para o diagnóstico são as principais razões que contribuem para que a leptospirose continua sendo negligenciada não só em Moçambique mas em muitos países da África subsariana (12,30).

Os casos confirmados de leptospirose foram registados entre os meses de Fevereiro á Maio.

Um estudo publicado cita que a incidência da leptospirose ocorreu principalmente no período de maior precipitação, ou seja entre Fevereiro a Maio e que em Junho a doença ainda era registada (65). Dados similares aos encontrados em nosso estudo. As fortes chuvas e inundações são muitas vezes, mas nem sempre associados a surtos de leptospirose em torno do mundo. É provável que a combinação de alterações climáticas, aumento do risco de inundações, crescimento populacional e a urbanização levam a um aumento da casos de leptospirose (1,4,12,65).

10. CONCLUSÕES

Nosso estudo mostrou que os sorogrupos e serovares de leptospiras patogênicas são prevalentes em pacientes febris tanto em áreas rurais bem como em áreas sub-urbanas em Moçambique e que a doença deve ser considerada no diagnóstico diferencial de febre no país.

A frequência de leptospirose em pacientes febris foi de 11,5% para anticorpos IgM anti-leptospira e 1,3% para casos confirmados.

O sorogrupo e sorovar *Australis* foi o mais frequente para ambas regiões do estudo.

A cefaleia, calafrios, náuseas e anorexia foram os sintomas mais frequentes no estudo.

Os casos de leptospirose foram frequentes tanto na época chuvosa bem como na época seca.

Os casos de leptospirose não são diagnosticados sendo que os mesmos são considerados como malária, o que leva ao consumo excessivo de antimaláricos.

11. PERSPECTIVAS/RECOMENDAÇÕES

Recomendamos um desenho experimental mais voltado a estudar a prevalência da leptospirose e expansão para outras partes do país com vista a se conhecer a distribuição desta bactéria em outras regiões. Que se façam mais estudos similares com maior ênfase na zona Norte de Moçambique, porque o mesmo faz fronteira com a Tanzânia que é um país endêmico para leptospirose e que já tem cepas isoladas localmente.

Como orientação outros estudos deveriam ser conduzidos para monitorar a leptospirose em animais (roedores e domésticos), pois são reservatórios para infecção em seres humanos.

Os resultados do nosso estudo sugerem para uma reavaliação dos algoritmos nacionais para a gestão de febre aguda e da malária.

São necessárias intervenções urgentes para reverter o cenário actual e inclui: implementação de sistemas de vigilância para a leptospirose no país, aumento da conscientização clínica e estabelecimento de capacidade e de diagnóstico.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terpstra WJ, World Health Organization, International Leptospirosis Society, editores. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization; 2003. 109 p.
2. Brazil, editor. Guia de vigilância epidemiológica. 6a ed., [1a reimpressão]. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2006. 815 p. (Série A--Normas e manuais técnicos).
3. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 1 de Abril de 2001;14(2):296–326.
4. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Trans R Soc Trop Med Hyg. Outubro de 2010;104(10):631–8.
5. da Cruz Nunes F. ANÁLISE ESPACIAL DA LEPTOSPIROSE NA CIDADE DE SALVADOR-BAHIA, NO PERÍODO DE 1996-2006. 2017;
6. de SOUZA AAT, Ferreira FC, Rezende HD, de Lima Arruda JF, others. Variação sazonal e aspectos clínico-epidemiológicos da Leptospirose humana na cidade de Itaperuna-RJ. Acta Biomed Bras. 2015;4(1):49–56.
7. Araújo WN de, others. Aspectos epidemiológicos da leptospirose no Brasil, 2000 a 2009 e a avaliação do conhecimento e das atitudes sobre a doença em uma favela na cidade de Salvador, Bahia [Internet]. 2010 [citado 25 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4324>
8. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in Humans. Em: Adler B, editor. Leptospira and Leptospirosis [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015 [citado 25 de Julho de 2017]. p. 65–97. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45059-8_5

9. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* Janeiro de 2010;140(3–4):287–96.
10. Gonçalves AT da S. Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* sp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos [Internet]. 2009 [citado 31 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/2385>
11. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, et al. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. Gurtler RE, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 23 de Abril de 2008;2(4):e228.
12. de Vries SG, Visser BJ, Nagel IM, Goris MGA, Hartskeerl RA, Grobusch MP. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. *Int J Infect Dis.* Novembro de 2014;28:47–64.
13. Bharti et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet infect dis* 2003, 3 757- 71. 2003;15(757–771).
14. Palaniappan RUM, Chang Y-F, Jusuf SSD, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, et al. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 1 de Novembro de 2002;70(11):5924–30.
15. Srimanote P, Wongdeethai N, Jieanampunkul P, Samonkiert S, Leepiyasakulchai C, Kalambaheti T, et al. Recombinant ligA for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. *J Microbiol Methods.* Janeiro de 2008;72(1):73–81.

16. Brandão AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva MV, Abrão RV. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3138–3142.
17. Riediger IN. Comparação dos diagnósticos sorológico e molecular da leptospirose humana na região metropolitana de Curitiba, Paraná. 2007 [citado 25 de Julho de 2017]; Disponível em: <http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13635/Disserta?sequence=1>
18. Balks E, Gyra H, Kobe B, Cussler K, Werner E. Development and validation of a serological potency test for the release of *Leptospira* vaccines – Requirements in the European Union. *Biologicals.* Setembro de 2013;41(5):325–9.
19. Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015 [citado 25 de Julho de 2017]. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 387). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45059-8>
20. Collares-Pereira M, Gomes AC, Prasad M, Vaz RG, Ferrinho P, Stanek G, et al. Preliminary survey of Leptospirosis and Lyme disease amongst febrile patients attending community hospital ambulatory care in Maputo, Mozambique. *Cent Afr J Med.* Agosto de 1997;43(8):234–8.
21. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J. Environmental and behavioural determinants of leptospirosis transmission: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0003843.
22. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(5):605–610.

23. Stern EJ, Galloway R, Shadomy SV, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C, et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de Março de 2010;50(6):843–9.
24. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 2008;33(4):557–569.
25. Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, et al. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(5):249–254.
26. Tangkanakul W, Tharmaphornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasien P, et al. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(3):204–208.
27. Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P. Leptospirosis disease burden estimation and surveillance networking in India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003;34 Suppl 2:170–7.
28. Vados Solis. Clical Epidemiological study of Leptospirosis in Human an Reservoirs in Yucatan Mexico. *Dezembro de 2002;6(44 (6) 335-340).*
29. Mgone GF, Machang'u RS, Mhamphi GG, Katakweba A, Mulungu LS, Durnez L, et al. Leptospira Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common Leptospira Isolates and Reservoir Hosts. Zinsstag J, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 1 de Dezembro de 2015;9(12):e0004251.
30. Allan KJ, Biggs HM, Halliday JEB, Kazwala RR, Maro VP, Cleaveland S, et al. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. Zinsstag J, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 14 de Setembro de 2015;9(9):e0003899.

31. Assenga JA, Matemba LE, Muller SK, Mhamphi GG, Kazwala RR. Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania. Small PLC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 25 de Março de 2015;9(3):e0003607.
32. Biggs HM, Hertz JT, Munishi OM, Galloway RL, Marks F, Saganda W, et al. Estimating Leptospirosis Incidence Using Hospital-Based Surveillance and a Population-Based Health Care Utilization Survey in Tanzania. Ribeiro GS, editor. PLoS Negl Trop Dis. 5 de Dezembro de 2013;7(12):e2589.
33. Santos AC dos, others. Diagnóstico sorológico da leptospirose: benefício de amostra aguda tardia na confirmação de casos [Internet]. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; 2011 [citado 31 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7184>
34. Haake DA, Zückert WR. The Leptospiral Outer Membrane. Em: Adler B, editor. Leptospira and Leptospirosis [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015 [citado 25 de Julho de 2017]. p. 187–221. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45059-8_8
35. Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. FEMS Microbiol Rev. Junho de 2004;28(3):291–318.
36. Fraga T. Estudo de potenciais antígenos. Vacinas de leptospira Interrogans Sorovar Copenhageni. Universidade de Sao Paulo; 2009.
37. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol. 2003;49(4):929–946.
38. Croda J, Ramos JGR, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, et al. Leptospira Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. J Clin Microbiol. 1 de Maio de 2007;45(5):1528–34.

39. Parra MB, Gómez AP, Rodríguez PH. Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp. *Rev Med Vet.* 2010;(19):101–111.
40. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* Outubro de 2009;7(10):736–47.
41. Levett PN. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 de Março de 2006;56(3):671–3.
42. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis.* Fevereiro de 2016;10(2):e0004403.
43. Figueredo JM, Siqueira GH, de Souza GO, Heinemann MB, Vasconcellos SA, Chapola EGB, et al. Characterization of two new putative adhesins of *Leptospira interrogans*. *Microbiol Read Engl.* Janeiro de 2017;163(1):37–51.
44. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine Mal Infect.* Janeiro de 2013;43(1):1–9.
45. Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet Lond Engl.* 4 de Setembro de 1999;354(9181):820–5.
46. Silva HR, Tavares-Neto J, Bina JC, Nascimento RJM. Leptospirose-infecção e forma subclínica em crianças de Salvador, Bahia. 2003 [citado 25 de Julho de 2017]; Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/2663>
47. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review.

- Small PLC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 17 de Setembro de 2015;9(9):e0003898.
48. Sambasiva RR, Naveen G, P B, Agarwal SK. Leptospirosis in India and the rest of the world. Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis. Junho de 2003;7(3):178–93.
 49. Ahmad FMH AS. Laboratory Diagnosis of leptospirosis. Pubmed ID 16333192. 2005;51:195-200.
 50. Wagenaar JFP, Goris MGA, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu ATA, De Kruif MD, et al. What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis?: Coagulation disorders and pathogenesis of leptospirosis. Trop Med Int Health. 13 de Dezembro de 2006;12(1):111–22.
 51. Niloofa R, Fernando N, de Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, Dikmadugoda N, et al. Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test. Dellagostin OA, editor. PLOS ONE. 18 de Junho de 2015;10(6):e0129236.
 52. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. J Microbiol Immunol Infect. Agosto de 2013;46(4):245–52.
 53. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol. Fevereiro de 2003;41(2):803–9.
 54. Wynwood SJ, Burns M-AA, Graham GC, Weier SL, McKay DB, Craig SB. Validation of a microsphere immunoassay for serological leptospirosis diagnosis in human serum by comparison to the current gold standard. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(3):e0003636.

55. Nabity SA, Ribeiro GS, Lessa Aquino C, Takahashi D, Damião AO, Gonçalves AHO, et al. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of Human Leptospirosis. Lukehart S, editor. PLoS Negl Trop Dis. 1 de Novembro de 2012;6(11):e1878.
56. Zhang C, Wang H, Yan J. Leptospirosis prevalence in Chinese populations in the last two decades. Microbes Infect. Abril de 2012;14(4):317–23.
57. Ministerio Administracao Estatal. Perfil do distrito de Caia Provincia de Sofala. Ministerio de Administracao Estatal; 2005.
58. Silva AN da, others. Dinâmica socioespacial e produção habitacional na periferia de Maputo-Moçambique a partir da década de 1970: destaque para os bairros Polana Caniço " A" e " B". 2011 [citado 4 de Agosto de 2017]; Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/95099>
59. Aquino CL, others. Identificação de antígenos imunodominantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni através de microarranjo de proteínas [Internet]. 2013 [citado 25 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13345>
60. UNFPA. Situacao da populacao mundial 2007. Desencadeando o potencial do crescimento urbano. Fundo da populacao das nacoes unidas; 2007.
61. Riley LW, Ko AI, Unger A, Reis MG. Slum health: diseases of neglected populations. BMC Int Health Hum Rights. 7 de Março de 2007;7:2.
62. Ambiental MpaCdA. Avaliação da Vulnerabilidade as Mudanças Climáticas e Estratégias de Adaptação Ministério para a Coordenação da Acção Ambiental 2005. 2005.
63. Cunguara B, Falgide G, Garrett J, Headey D. Growth without change ? A case study of economic transformation in Mozambique. 2.^a ed. 2012;

64. Salomão CA, Sacarlal J, Chilundo B, Gudo ES. Prescription practices for malaria in Mozambique: poor adherence to the national protocols for malaria treatment in 22 public health facilities. *Malar J* [Internet]. Dezembro de 2015 [citado 25 de Julho de 2017];14(1). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/483>
65. Guimarães RM, Cruz OG, Parreira VG, Mazoto ML, Vieira JD, Asmus CIRF. [Temporal analysis of the relationship between leptospirosis and the occurrence of flooding due to rainfall in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2007-2012]. *Cienc Saude Coletiva*. Setembro de 2014;19(9):3683–92.

Anexos

Anexo I. Cálculo de sensibilidade e especificidade do teste Elisa IgM/IgG usando a tabela 2x2.

IgM

Teste	Padrao de Ouro		Total
	(+)	(-)	
(+)	28	1	29
(-)	4	80	84
Total	32	81	113

x2	89.47666
Sensibilid	0.88
Especifici	0.99
FP	0.01
FN	0.13
VPP	0.97
VPN	0.95
Eficiencia	0.96

IgG

Teste	Padrao de Ouro		Total
	(+)	(-)	
(+)	25	4	29
(-)	6	78	84
Total	31	82	113

x2	67.69213
Sensibilid	0.81
Especifici	0.95
FP	0.05
FN	0.19
VPP	0.86
VPN	0.93
Eficiencia	0.91

Anexo -II - Teste de aglutinação microscópica (MAT)

Objectivo: Realizar o teste de aglutinação microscópica

Procedimento

Preparação dos soros: Diluir o soro do paciente na proporção 1:50 (100µl de soro + 4,9ml de PBS estéril). Após a diluição, observar se o soro apresenta turvação. Caso isso ocorra, deve-se filtrar usando um filtro com porosidade de 0,22µm, para a retenção de qualquer tipo de sólido em suspensão que possa interferir na leitura do microscópio.

Preparação dos antígenos: Observar as culturas que serão utilizadas como antígenos quanto ao crescimento por microscopia. A densidade ideal da cultura é aquela em que se observa “um tapete” homogêneo de leptospiros no campo. Nos casos em que o crescimento apresenta-se exagerado, deve-se diluir os tais antígenos em PBS estéril.

Triagem

Separar uma placa de microaglutinação (96 poços com fundo chato) e identificar na lateral com o número do paciente

Colocar 50µl do soro do doente diluídos em 19 poços da placa (números de antígenos presentes no painel de bactérias)

Colocar em cada poço da placa 50µl de cada antígeno já diluído e homogeneizar

Incubar por 1h 30 min a temperatura ambiente para que ocorra a reação antígeno-anticorpo.

Após a incubação, colocar uma gota da mistura de cada poço, em fila em uma lâmina de vidro para microscopia.

Examinar ao microscópio de campo escuro, sem lamela com objectiva de 10x se ha ou nao aglutinação.

O critério para avaliação da aglutinação foi estabelecido como 1, 2, 3, ou 4 cruces correspondendo a 25, 50, 75 e 100% de *leptospiras* aglutinadas. O grau de aglutinação é determinado considerando-se a quantidade de *leptospiras* livres no campo microscópico ou a quantidade aglutinada.

Os antígenos que apresentarem aglutinação nesta etapa, devem ser utilizados na etapa seguinte onde os soros serão diluídos para determinação dos títulos frente a estes antígenos.

Titulação

Em uma placa de microaglutinação proceder da seguinte forma em cada fileira horizontal:

1º poço: 50µl de salina estéril (controle do antígeno reagente na triagem)

2º poço 100µl do soro previamente diluído 1:50. Este poço não recebe salina

3º ao 12º poço: 50µl de salina tamponada (para a diluição do soro)

Com um pipetador automático, retirar 50µl do soro do 2º poço e juntar com os 50µl da salina do 3º poço. Homogenizar

Passar 50µl para o poço seguinte e assim sucessivamente ate o 12º poço, desprezando 50µl no final

Colocar 50µl do antígeno reactivo na triagem em todos os poços da fileira

Incubar por 1h 30 min a temperatura ambiente para que ocorra a reação antígeno-anticorpo

Proceder a leitura em microscópio de campo escuro da mesma forma que na etapa de triagem

Para o resultado considera-se como ponto final de reação a diluição mais alta de soro capaz de aglutinar cerca de 50% das leptospiras em relação ao controle

Para cada poço aglutinado atribui-se um valor para o título conforme a tabela abaixo:

Poço	Aglutinação	Título
1	Sem aglutinação (controle do antígeno)	----
2	Aglutinação positiva	100
		1ª diluição
3	Aglutinação positiva	200
4	Aglutinação positiva	400
.....	Ate onde houver aglutinação

Anexo –III. Protocolo de Microaglutinação (MAT) para leptospirose

Antígenos	Soros									
	Controle		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4	
	T	Título	T	Título	T	Título	T	Título	T	Título
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
Data de Triagem										
Data de Titulação										

Responsável Técnico: _____

Anexo –IV. Aprovação ética (SIFA)

TÍTULO DO PROJECTO

Etiologia do Síndrome Febril Agudo em pacientes atendidos no Centro de Saúde Polana
Caniço em Maputo

Data e versão do protocolo

(Versão 4.0 de 5 de Outubro de 2012)

Patrocinador

Nome da Agência Patrocinadora: IANPHI	Data: 6 de Junho de 2011
Nome do Representante desta Agência: Courtenay Dusenbury	

Patrocinador

Nome da Agência Patrocinadora: Fiocruz	Data: 6 de Junho de 2011
Nome do Representante desta Agência: Felix J. Rosenberg	

Investigador Principal do Protocolo

Nome do Investigador Principal: Ivan N. A. Manhiça	Data: 6 de Junho de 2011
--	--------------------------

Aprovações Éticas

Comité Nacional Bioética de Moçambique	Maputo: Ref: 222/11
Nome do Presidente do Comité: João Fumane	

Anexo -V Aprovação ética (Arbovírus)



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE IRB00002657

Exmo Senhor
Dr. Eduardo Samo Gudo
INS

Ref: 316/CNBS/12

Data 31 de Agosto de 2012

Assunto: *Aprovação do Protocolo "Prevalence and molecular epidemiology of arbovirus among mozambican individuals with acute febrile syndrome."*

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: "*Prevalence and molecular epidemiology of arbovirus among mozambican individuals with acute febrile syndrome.*" Sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:


O CNBS não vê nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

Contudo recomenda aos investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.

O Presidente


Dr. João Fernando Lima Schwalbach