

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu***  
**Mestrado Em Saúde Única**

**REJANE CRISTINA LUCCO**

**E quando não é dengue? Estimativa do subdiagnóstico de leptospirose e redefinição de áreas de risco usando amostras de pacientes com suspeita de dengue atendidos na rede de saúde municipal de São Paulo**

São Paulo

2024

REJANE CRISTINA LUCCO

**E quando não é dengue? Estimativa do subdiagnóstico de leptospirose e redefinição de áreas de risco usando amostras de pacientes com suspeita de dengue atendidos na rede de saúde municipal de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Única.

**Orientador:**

Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

São Paulo

2024

L967q

Lucco, Rejane Cristina.

E quando não é dengue? Estimativa do subdiagnóstico de leptospirose e redefinição de áreas de risco usando amostras de pacientes com suspeita de dengue atendidos na rede de saúde municipal de São Paulo / Rejane Cristina Lucco. – São Paulo, 2024.

55 p. : il., color.

Orientador: Bruno Alonso Miotto.

Dissertação. (Mestrado em Saúde Única) - Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. Detecção Molecular. 2. Coágulo Sanguíneo. 3. Subdiagnóstico. I. Miotto, Bruno Alonso, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 616.9

## **Rejane Cristina Lucco**

### **E quando não é dengue? Estimativa do subdiagnóstico de leptospirose e redefinição de áreas de risco usando amostras de pacientes com suspeita de dengue atendidos na rede de saúde municipal de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Única.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

São Paulo, 23 de janeiro de 2024

#### **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto  
Orientador  
Universidade Santo Amaro

---

Profa. Dra. Adriana Cortez  
Universidade Santo Amaro

---

Prof. Dr. Felipe Fornazari  
Universidade Estadual Paulista

Conceito Final: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me guiado até aqui e por todas as bênçãos que me concede diariamente.

Expresso minha gratidão ao meu orientador Bruno, pela orientação, paciência e apoio ao longo deste processo. Seu conhecimento e persistência foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora, agradeço a atenção dispensada à leitura deste trabalho e pelos valiosos “insights” fornecidos durante a defesa.

Quero estender meus agradecimentos aos meus colegas de pesquisa, Stephanie, Gabi, Rafael, Bianca e Luciano pela troca constante de ideias, debates construtivos e pelo apoio mútuo durante todo o percurso, sem vocês teria sido impossível finalizar esse trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação da universidade, expresso minha eterna gratidão pelo incentivo e compreensão. As palavras de encorajamento de cada um de vocês, foram a força motriz que impulsionou meu progresso. Vocês são verdadeiros heróis.

Agradeço também a UNISA pela infraestrutura oferecida, recursos disponíveis, pelo ambiente propício à pesquisa e pela oportunidade, foi uma honra.

Finalmente, dedico este trabalho aos meus amigos e familiares que sempre acreditaram em mim, especialmente, à Jana que mesmo nos momentos mais desafiadores, nunca soltou a minha mão e me deu forças para continuar.

*Eu pedi força e Deus me deu dificuldades para me fazer forte. Pedi sabedoria e Deus me deu problemas para resolver. Pedi prosperidade e Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar. Pedi coragem e Deus me deu perigos para superar. Pedi amor e Deus me deu pessoas para ajudar. Eu não recebi nada do que pedi... Mas recebi tudo que precisava.*

H. Jackson Brown Jr.

## RESUMO

Há anos, estudos têm ilustrado as dificuldades no diagnóstico diferencial entre leptospirose e dengue, seja devido à semelhança do quadro clínico, ou mesmo à sobreposição dos períodos de maior ocorrência de ambas as enfermidades. Esse estudo buscou identificar casos de leptospirose humana no município de São Paulo pela detecção da infecção leptospírica em pacientes com suspeita clínica de dengue que não tiveram confirmação da infecção viral. Para as análises, foram utilizadas de forma inédita, amostras de coágulo sanguíneo, obtidos após utilização do soro dos pacientes para a realização do teste de ELISA para detecção da proteína NS1, capaz de identificar pacientes com infecção aguda pelo vírus da dengue. Entre agosto e setembro de 2023, 200 amostras de coágulos sanguíneos foram selecionadas para investigação da presença de DNA leptospírico. A seleção foi feita com base no Distrito Administrativo da residência dos pacientes (DA) de acordo com estudo recente que identificou os DAs com maior probabilidade de apresentar casos subnotificados. Os coágulos sanguíneos foram descongelados e separados do gel após centrifugação por dois minutos com o tubo invertido. Após a recuperação, foi realizada a quebra mecânica do coágulo adaptando a metodologia proposta por Tas (1990) e em seguida, a amostra foi tratada e então, foi realizada a extração do DNA para realização da PCR. Após reação de amplificação de fragmento do gene 16S, foram identificadas 7 amostras positivas (3,5%; IC95% 1.6%-6.7. Todos os controles positivos do processo de extração foram positivos à PCR, com bandas únicas e intensas. Embora o baixo número de pacientes positivos tenha impossibilitado a identificação de áreas de risco para o subdiagnóstico da enfermidade, os resultados indicam a viabilidade da detecção molecular de leptospiras em coágulos sanguíneos, sinalizando uma abordagem alternativa e viável para o diagnóstico precoce e a estimativa do subdiagnóstico da leptospirose. Reforçam também a necessidade de aprimorar métodos diagnósticos precisos para orientar intervenções clínicas e autoridades sanitárias na prevenção e tratamento da leptospirose humana.

**Palavras-Chave:** Leptospirose, Dengue, Detecção Molecular, Coágulo Sanguíneo, Subdiagnóstico, PCR, qPCR, Epidemiologia.

## ABSTRACT

For years, studies have illustrated the difficulties in the differential diagnosis between leptospirosis and dengue, whether due to the similarity of the clinical picture or the overlap of the peak periods of both diseases. This study aimed to identify cases of human leptospirosis in the municipality of São Paulo by detecting leptospiral infection in patients with clinical suspicion of dengue who did not have confirmation of viral infection. For the analyses, samples of blood clots, obtained after using the patients' serum for the ELISA test to detect NS1 protein, capable of identifying patients with acute dengue virus infection, were used in an unprecedented way.

Between August and September 2023, 200 samples of blood clots were selected to investigate the presence of leptospiral DNA. The selection was based on the Administrative District of the patients' residence (DA) according to a recent study that identified the DAs with the highest probability of presenting underreported cases. The blood clots were thawed and separated from the gel after centrifugation for two minutes with the tube inverted. After recovery, mechanical disruption of the clot was performed adapting the methodology proposed by Tas (1990), and then the sample was treated, followed by DNA extraction for PCR. The selection of the blood clot samples was based on a study conducted by Esteves, which mapped the DAs with the highest number of underreported cases in the city of São Paulo in 2019.

One of the study's objectives was to identify regions of the municipality with a higher occurrence of underdiagnosed cases through spatial distribution analysis of confirmed cases and spatial risk analysis. For this purpose, some data were retrieved from the Matrix database (LABZOO), such as the patient's SINAN number and NS1 protein ELISA results. Data related to the patient's epidemiological and sociodemographic characteristics were obtained from the SINAN database. The location data (latitude and longitude or ZIP code) were retrieved from the Zoonosis Surveillance Division (DVZ) system.

After amplification reaction of the 16S gene fragment, 7 positive samples were identified (3.5%; 95% CI 1.6%-6.7%). All positive controls from the extraction process were positive for PCR, with single and intense bands.

Although the low number of positive patients prevented the identification of risk areas for underdiagnosis of the disease, the spatial analysis did not allow the identification of risk areas due to the limited number of samples. However, the results indicate the feasibility of molecular detection of leptospires in blood clots, signaling an alternative and viable approach for early diagnosis and estimation of leptospirosis underdiagnosis. They also reinforce the need to improve accurate diagnostic methods to guide clinical interventions and health authorities in the prevention and treatment of human leptospirosis, despite the limitations of the techniques used.

**Keywords:** Leptospirosis, Dengue, Molecular Detection, Blood Clot, Underdiagnosis, PCR, qPCR, Epidemiology.

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
2	Revisão de Literatura.....	18
	2.1 Panorama da leptospirose.....	17
	2.1.1 Transmissão e fatores de risco em seres humanos.....	18
	2.2 Leptospirose versus Dengue.....	21
	2.3 A ocorrência de leptospirose em pacientes dengue-negativos no Brasil..	24
3	Objetivos.....	287
	3.1. Objetivo geral .....	287
	3.2. Objetivos específicos .....	287
4	Materiais e Método .....	29
	4.1. Parcerias e bioética.....	298
	4.2. Desenho experimental, amostras e critérios de inclusão/exclusão .....	298
	4.3. Recuperação e tratamento dos coágulos.....	309
	4.4 Extração de DNA e PCR.....	30
	4.5 Padronização do banco de dados e mapas.....	31
	4.6 Análises espaciais e de geoprocessamento.....	31
	4.7 Análise estatística .....	32
5	Resultados.....	32
	5.1 Detecção de leptospiras.....	33
	5.2 Distribuição espacial dos casos .....	36
	5.3 Recuperação de dados do SINAN .....	37
6	Discussão .....	387
7	Conclusão.....	44
	Referências Bibliográficas .....	45
	ANEXO A – Parecer consubstanciado da plataforma brasil .....	52
	ANEXO B - Parecer pedido de autorização para realização de projeto de pesquisa .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A febre constitui um dos sintomas que mais frequentemente motivam a busca por assistência médica no mundo (CRUMP, 2012). As causas de febre podem ser diversas, e na maioria dos casos, o histórico médico e o exame físico são insuficientes para identificação precisa de sua etiologia (HALLIDAY *et al.*, 2020).

Diversos estudos têm ressaltado a relevância de variados agentes infecciosos na etiologia da febre aguda. Em trabalho recente de revisão sistemática da literatura, Moreira *et al.* (2020) demonstraram que as causas de febre relatadas com mais frequência foram as infecções virais e bacterianas. O vírus da dengue se destaca como o patógeno mais relevante, seguido por outros arbovírus e hantavírus. Já entre as bactérias, as mais frequentemente relatadas foram *Staphylococcus spp.*, *Rickettsia spp.*, e *Leptospira spp.*

A dengue é uma enfermidade febril ocasionada por um arbovírus, que pode levar a quadros graves e por vezes fatais. Sua transmissão é mediada por diversas espécies de mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Aedes*, especialmente pelo vetor *Aedes aegypti* (GONÇALVES *et al.*, 2020). Dentre seus principais sintomas, destacam-se febre elevada, mialgia, desconforto retro-orbital, cefaleia, perda de apetite e aparecimento de erupções cutâneas vermelhas pelo corpo (DOS SANTOS; HONÓRIO; NOBRE, 2019).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a ocorrência global da dengue varia de 67 a 136 milhões de casos sintomáticos por ano, concentrados principalmente na Ásia e nas Américas (OPAS/OMS, 2023b). Em 2022, a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) reportou 4.169.060 casos suspeitos e aproximadamente 2 milhões de casos confirmados de dengue somente no continente americano (OPAS/OMS, 2023a). No Brasil, país com maior número de casos das Américas, ocorreram 1.450.270 casos prováveis de dengue neste mesmo período, segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (SAÚDE, 2023). Já em 2023, até o início de dezembro houve aumento de 15,8% (1.601.848) nos casos de dengue, quando comparado ao mesmo período de 2022 (1.382.665).

Apesar dos números expressivos, grande parte dos pacientes com suspeita de dengue não apresentam diagnóstico laboratorial definitivo da infecção viral,

demonstrando que a etiologia da doença febril, na maioria dos casos, permanece indeterminada (FORNAZARI *et al.*, 2021). Em 2022, por exemplo, dos 656.023 casos notificados no estado de São Paulo, somente 50,61% (332.033) tiveram o diagnóstico da arbovirose confirmado (CVE, 2023). No município de São Paulo, a proporção de casos negativos para dengue entre pacientes com a suspeita da doença é ainda maior; em 2022 foram notificados 43.695 casos suspeitos, dos quais somente 11.920 (27,28%) foram confirmados. Já em 2023, até o início de outubro, foram contabilizados 54.440 casos suspeitos, dos quais foram confirmadas infecção viral em somente 12.439 (22,85%) (CVE, 2023).

Devido à semelhança de sintomas entre a dengue e diversas doenças infecciosas, combinada com a superestimação da doença em regiões tropicais onde há a ocorrência concomitante de outros patógenos, estima-se que ocorra, em determinadas regiões, uma subnotificação sistemática de vários agentes infecciosos que produzem sintomatologia inespecífica e semelhante à provocada pelo arbovírus. Nesse cenário, destaca-se a leptospirose como um desses agentes (MOREIRA *et al.*, 2018).

A leptospirose é uma infecção bacteriana de natureza zoonótica, causada por espiroquetas helicoidais patogênicas e altamente móveis do gênero *Leptospira* (PICARDEAU, 2013). Ela está entre as principais causas zoonóticas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com estimativas anuais de 1,03 milhão de casos e 59.900 mortes (COSTA, *et al.* 2015). É uma doença que está associada tanto a fatores comportamentais quanto a circunstâncias socioambientais (MARTINS; SPINK, 2020), o que faz dela um desafio arquetípico da abordagem "One Health" (SYKES *et al.*, 2022a). É frequentemente observada em regiões carentes com baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico, o que impacta significativamente na saúde de populações de alta vulnerabilidade (HOTEZ; FUJIWARA, 2014; SOUZA *et al.*, 2011). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas (SAÚDE, 2023).

A leptospirose é uma enfermidade de diagnóstico desafiador, e em áreas tropicais, pode ser indistinguível de outras doenças febris, como a dengue (FORNAZARI *et al.*, 2021). Considerando o amplo espectro clínico da doença, os principais diagnósticos diferenciais são: influenza (síndrome gripal), malária,

riquetisioses, doença de Chagas aguda, toxoplasmose, febre tifóide, dengue, entre outras (SAÚDE, 2023).

Há anos, estudos têm ilustrado as dificuldades no diagnóstico diferencial entre leptospirose e dengue, seja devido à semelhança do quadro clínico, ou mesmo à sobreposição dos períodos de maior ocorrência de ambas as enfermidades (BEZERRA *et al.*, 2015; CONROY *et al.*, 2014). A intercorrência desses sintomas, muito similares em ambas as doenças, pode resultar no retardo da identificação da leptospirose durante o curso da doença nos pacientes acometidos, o que, por sua vez, está associado a um aumento nas taxas de mortalidade (FLANNERY *et al.*, 2001). Ressalta-se que a maioria dos casos é uma doença não complicada, anictérica, com cerca de 10 dias de febre e uma taxa de mortalidade inferior a 1%, sendo esses casos, os mais propensos a serem subdiagnosticados. Estima-se que apenas de 10% a 15% dos casos de leptospirose apresentem as manifestações mais graves da doença, sendo então, mais propensos a serem corretamente diagnosticados (PEREIRA *et al.*, 2018).

No Brasil, entre 2010 e 2022, foram confirmados 44.907 casos de leptospirose, dos quais 19% foram registrados no estado de São Paulo (DATASUS 2022; SAUDE, 2023). Na capital paulista, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), foram registrados 1.858 casos de 2012 a 2022, o que representa uma média de 185 casos por ano (CVE, 2023). A ocorrência nitidamente subnotificada de casos registrados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), dificulta a identificação de áreas de risco e os fatores socioambientais associados a ela. Assim, estima-se que a identificação de casos subnotificados possa auxiliar no mapeamento do risco, dando mais resolução às áreas de risco já estabelecidas anteriormente. A definição ou redefinição dessas áreas é imprescindível para adoção de medidas preventivas eficazes no combate à doença. Considerando a leptospirose como um problema socioecológico, frequentemente associado ao contexto de desigualdade social, é necessário priorizar investimentos em intervenções que visem assegurar condições ambientais adequadas e mitigar possíveis deficiências de infraestrutura comuns aos enclaves populacionais mais pobres (RODRIGUES, 2017). Adicionalmente, é importante mencionar que a leptospirose é uma doença de notificação compulsória, e equívocos no processo diagnóstico têm como

consequência o subdiagnóstico e/ou subnotificação de casos da enfermidade (RODRIGUES, 2019).

A presente proposta tem como objetivo identificar casos subnotificados de leptospirose em pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos nos serviços de saúde do município de São Paulo, e cujo diagnóstico da arbovirose não foi confirmado. Pretende, portanto, utilizar a logística já implementada na vigilância e diagnóstico da dengue para dar visibilidade à leptospirose, doença de alto impacto em saúde humana e altamente negligenciada, e sobretudo, possibilitar a definição ou redefinição de áreas de risco dentro do município.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Panorama da leptospirose

A leptospirose é uma doença bacteriana zoonótica causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que são capazes de sobreviver em coleções aquosas ambientais, mas cuja replicação depende majoritariamente da infecção e permanência em mamíferos hospedeiros (SYKES *et al.*, 2022b).

A leptospirose são atualmente classificadas sorologicamente em mais de 260 sorovares, que estão agrupados em 24 sorogrupos com base nas heterogeneidades estruturais de moléculas de superfície de lipopolissacarídeos (Cerqueira e Picardeau, 2009). As leptospirose também podem ser classificadas a partir das sequências nucleotídicas de seu DNA, e a recente análise de sequenciamento de DNA de alto rendimento permitiu uma nova classificação das leptospirose em dois clados, com quatro subclados contendo 64 espécies diferentes (VINCENT *et al.*, 2019).

A leptospirose pode afetar praticamente qualquer espécie de mamífero, que pode abrigar o patógeno em seus túbulos renais e liberar a bactéria pela urina, contribuindo de forma determinante para a disseminação do patógeno no meio ambiente. Esses animais são considerados hospedeiros de manutenção, pois normalmente apresentam intensa e prolongada eliminação urinária de leptospirose, sem quaisquer sinais clínicos evidentes, impondo sérias dificuldades para prevenir a transmissão da doença (FAINE *et al.*, 1999). A infecção normalmente depende do contato indireto com solo ou água contaminados, mas também pode ocorrer através do contato direto com urina, sangue e tecidos contaminados de animais infectados (HAAKE E LEVETT, 2015).

A epidemiologia da leptospirose é bastante complexa, pois envolve uma grande diversidade de fatores demográficos, socioambientais e comportamentais que têm o potencial de influenciar o risco de transmissão (FELZEMBURGH, 2014). Estudos recentes apontam que tanto as leptospirose patogênicas quanto as saprofíticas se multiplicam no solo encharcado, que demonstrou ser um reservatório potencial para a bactéria. Essa descoberta pode explicar a ocorrência de surtos de leptospirose após inundações, geralmente com um intervalo de 1 a 3 meses, levando a uma

reconfiguração do papel do ambiente na epidemiologia da doença (YANAGIHARA *et al.*, 2022).

Além disso, estudos indicam que a composição das comunidades microbianas pode impactar positivamente na sobrevivência e persistência de leptospiros no ambiente (VINOD KUMAR *et al.*, 2015). Leptospiros patogênicos são capazes de se agregar a outros microrganismos, como a bactéria *Azospirillum brasilense*, possibilitando também a sua sobrevivência dentro de biofilmes bacterianos ambientais presentes em água de campos de arroz, esgotos e água parada da chuva (KUMAR *et al.*, 2019). Portanto, pode-se dizer que a transmissão intra e interespecífica da leptospirose depende de 3 tipos de fatores e da interação, entre eles: 1) animais hospedeiros reservatórios nos quais os organismos se replicam e são eliminados na urina por longos períodos, 2) a persistência das espiroquetas no ambiente e 3) interações subsequentes entre humanos, animais e o ambiente (SYKES *et al.*, 2022b).

Assim, a leptospirose persiste como uma doença emblemática dentro da visão de Saúde Única, caracterizada pela abordagem multisetorial e transdisciplinar que procura equilibrar e otimizar a saúde humana, dos animais e dos ecossistemas nos quais eles estão inseridos (PAL; GEBREZABIHER; RAHMAN, 2014). Dessa forma, para compreender melhor os processos que contribuem para a ocorrência dessa enfermidade, bem como sua prevenção em habitats naturais, é essencial promover estudos que levem em consideração as relações dinâmicas dentro de ecossistemas locais (ALLAN *et al.*, 2015), bem como, compreender os fatores de risco associados à sua transmissão.

Há um consenso na literatura sobre as principais vias de transmissão da leptospirose, contudo, a relevância de cada componente e os fatores de risco ambientais correspondentes ainda não estão totalmente esclarecidos e demandam mais pesquisas (MWACHUI *et al.*, 2015).

### **2.1.1 Transmissão e fatores de risco em seres humanos**

A propagação da leptospirose está intrinsecamente ligada à interação de elementos cruciais, como o reservatório animal, o hospedeiro acidental e o

reservatório ambiental. Este último parece desempenhar um papel crucial como elo na transmissão entre animais e seres humanos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Os roedores sinantrópicos são reconhecidos como os principais reservatórios naturais, desempenhando um papel fundamental na transmissão de leptospira em áreas urbanas (DE FARIA *et al.*, 2008). Isso ocorre devido às características essenciais desses animais, que favorecem a manutenção das leptospiras *in vivo*, incluindo a presença de infecção renal crônica com excreção contínua de leptospira, pH urinário relativamente alcalino e a ausência de sinais e sintomas clínicos típicos da doença. Portanto, esses animais têm a capacidade de abrigar leptospiras nos rins, eliminando-as ativamente e em concentrações significativas através da urina no ambiente (SAMPAIO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2015b; BARRAGAN *et al.*, 2017).

Porém, a literatura contém muitos exemplos de casos de leptospirose em humanos sem evidências claras de contato direto com animais, sendo, portanto, provavelmente a exposição ao solo ou à água contaminados com a urina de animais infectados com leptospira a forma mais comum pela qual os seres humanos contraem a doença (BARRAGAN *et al.*, 2017).

De acordo com um estudo realizado por Mwachui, *et al.* (2015), em países com recursos limitados, inundações e precipitações são particularmente importantes na transmissão da leptospirose, enquanto atividades recreativas em água são mais relevantes em países desenvolvidos. Roedores estão associados a um aumento no risco da doença, mas esse risco pode sofrer variação e fatores de saneamento e comportamentais estão quase sempre fortemente associados à leptospirose.

Esse estudo é corroborado por Rodrigues (2016) ao descrever que os fatores de risco para contrair leptospirose podem ser agrupados de acordo com quatro pilares que representam a integração de complexos processos de relação do ser humano, animais e meio ambiente: (A) Atividades ocupacionais e globalização da economia; (B) Atividades recreacionais relacionadas a corpos d'água e áreas de manutenção de elevada umidade; (C) Desastres naturais e demais causas de inundação e (D) Iniquidade socioeconômica e baixa qualidade dos indicadores sanitários que afetam a população.

No Brasil, em área urbana, leptospirose é comumente associada às condições de pobreza, sendo relacionada a diversos fatores, como renda, escolaridade, acesso

a saneamento ambiental e condições de moradia (RODRIGUES, 2017). No estudo realizado por Baquero e Machado (2018), a umidade do solo foi o fator de risco mais significativo, seguido por pobreza e precipitação. Um melhor gerenciamento de resíduos foi um fator protetor, todavia, segundo os autores, o analfabetismo não foi um fator de risco direto.

No entanto, vale ressaltar que alguns estudos demonstram a ocorrência da leptospirose em locais com boas condições de saneamento e de melhores condições econômicas, o que representa mais um desafio no que concerne ao diagnóstico dessa doença. Por exemplo, Tassinari *et al.* (2004), realizaram uma pesquisa na cidade do Rio de Janeiro e verificaram a ocorrência da leptospirose em locais com boas condições sanitárias. Uma das teorias propostas para esse fenômeno sugere que a leptospira pode atingir locais incomuns devido às inundações frequentes durante o verão no Rio de Janeiro. Isso poderia resultar na contaminação da população humana por meio de outras vias além do contato direto com águas contaminadas.

Referente ao ambiente rural, há uma escassez de estudos realizados em relação a leptospirose em humanos, sendo, portanto, necessário o aprofundamento sobre a transmissão e manutenção da doença nessas áreas. Recomenda-se a implementação de iniciativas educativas direcionadas às atividades ocupacionais no ambiente rural. Por exemplo, a utilização de equipamentos de proteção individual pode desempenhar um papel crucial na redução dos casos de leptospirose, conforme destacado por Pelissari (2011).

O fato é que por sua associação direta com a precariedade em saneamento, a leptospirose é uma doença de difícil prevenção, pois exige políticas voltadas a melhorias estruturais e combate à pobreza, que demandam volumes significativos de recursos do orçamento público. Mesmo diante do impacto em saúde humana, a prevenção da leptospirose no Brasil segue contando com poucos investimentos governamentais, não havendo qualquer estímulo específico para aprimoramento na detecção de casos ou mapeamento de risco para a doença (RODRIGUES, 2017).

Diante dos diferentes fatores associados à leptospirose a prevenção da doença deve focar nas fontes de contaminação, fatores de risco apontados pelos estudos e, especialmente, em um trabalho de disseminação de informação sobre a doença para a população e para os profissionais de saúde.

## 2.2 Leptospirose versus dengue

Na literatura, muitos trabalhos já demonstraram que a distinção diagnóstica entre dengue e leptospirose representa um enorme desafio aos profissionais de saúde, especialmente em áreas com alta incidência de dengue, fato que pode induzir a superestimação da infecção viral e, conseqüentemente, a subestimar a ocorrência da leptospirose (BROWN *et al.*, 2010; FERNANDO *et al.*, 2016; FONTES *et al.*, 2015a; LAROCQUE *et al.*, 2005).

Há décadas estudos realizados em escala global demonstram que um número considerável de pacientes dengue negativos apresentam quadro leptospírico agudo, especialmente em regiões onde existem fatores ambientais e epidemiológicos propícios à ocorrência de ambas as doenças (LE TURNIER *et al.*, 2019; LIBRATY *et al.*, 2007; SETHI *et al.*, 2013).

Levett, Branche e Edwards (2000) observando que os dados epidemiológicos sugeriam que alguns casos de leptospirose estavam sendo diagnosticados incorretamente e tratados de forma inadequada em Barbados conduziram uma pesquisa entre 1995 e 1997 na qual o diagnóstico de leptospirose foi confirmado em 31 (22%) dos 139 pacientes em 1995, em 1996, 29 (31%) dos 93 pacientes e em 25 (22%) dos 116 pacientes em 1997.

Na Índia, um estudo prospectivo, demonstrou que ocorreu um surto simultâneo de leptospirose e dengue nas favelas da cidade de Mumbai, de 20 de junho a 14 de novembro de 2002, crianças que deram entrada no hospital com suspeita de leptospirose ou dengue foram admitidas. Das 90 crianças examinadas, 15 (16,7%) tinham leptospirose e 16 (17,8 %) tinham dengue (KARANDE *et al.*, 2005). Na Tailândia, uma pesquisa que também envolveu crianças, revelou que a leptospirose representava 19% dos casos dos quais a dengue configurava a principal suspeita, sendo que, nenhuma das crianças com leptospirose foi diagnosticada corretamente no momento da alta hospitalar e um terço (33%) foi diagnosticada erroneamente como dengue ou tifo silvestre (LIBRATY *et al.*, 2007).

No Havaí, foi realizado um estudo para avaliar se a incidência de leptospirose poderia ser substancialmente maior do que indicavam os números relatados. Eles avaliaram retrospectivamente a prevalência de anticorpos IgM anti-*Leptospira* em

amostras obtidas entre maio de 2001 a abril de 2002 de pacientes com doença febril durante um surto de dengue, foram testados 1.206 pacientes negativos para dengue, dos quais 54 (4,5%) tiveram os resultados positivos para leptospirose (ELLIS *et al.*, 2008).

Em Porto Rico, Sanders *et al.* (1999), utilizaram um sistema de vigilância laboratorial de dengue em toda a ilha para determinar o aumento de leptospirose após enchentes geradas pelo furacão Hortense. Todos os pacientes negativos para dengue (n = 142) com início da doença de 8 de agosto a 6 de outubro de 1996, nos grupos pré-furacão e pós-furacão, foram investigados para leptospirose, 4 (6%) dos 72 pacientes pré-furacão e 17 (24%) dos 70 pacientes pós-furacão tiveram casos confirmados laboratorialmente de leptospirose. Um estudo análogo, porém, realizado no Peru, avaliou 101 amostras dengue-negativas, das quais 33 (32,7%) foram consideradas positivas para leptospirose (DÁVILA *et al.*, 2019a). Ainda em Porto Rico, um estudo conduzido por Bruce *et al.* (2005) avaliou amostras negativas para dengue e entre 730, 36 (5%) foram positivas para leptospirose. Além disso, eles realizaram testes *post mortem* para leptospirose em 12 amostras disponíveis de casos suspeitos de óbitos relacionados à dengue e 10 (83%) foram positivos para leptospirose. Outro estudo, utilizou amostras de soro da fase aguda de pacientes febris em dois grandes hospitais em Dhaka, Bangladesh, durante um surto de dengue em 2001 e 18% (63) dos pacientes negativos para dengue (n=359) testaram positivo para leptospirose e a taxa de letalidade entre os pacientes com leptospirose (5%) foi maior do que entre os pacientes com dengue (1,2%) (LAROCQUE *et al.*, 2005b).

No México, um estudo com pacientes de todas as idades e gêneros que buscaram atendimento médico com um diagnóstico inicial de dengue durante os meses de julho a novembro de 2009 foram convidados a participar e dos 171, 6% (11) foram positivos para Leptospirose e 12% (20) foram positivos para ambas as patologias (DIRCIO MONTES SERGIO *et al.*, 2012).

No Peru, entre março e agosto de 2016, um total de 276 amostras de soro de pacientes com doença febril aguda e suspeita de diagnóstico para o vírus da dengue foram analisadas, sendo que, 31 pacientes (11,2%) foram positivos para Leptospirose e co-infecção por ambos os patógenos foi observada em 16 (5,9%) pacientes (DEL VALLE-MENDOZA *et al.*, 2021).

Na Malásia, de junho de 2016 a fevereiro de 2018, foram examinadas amostras de sangue de 321 pacientes com febre e diagnóstico presumível de uma doença semelhante a dengue, dessas, 255 amostras foram negativas para a doença e então, foram testadas para leptospirose e a prevalência geral da doença, com base nos resultados do PCR, foi de 4,7% (12/255), enquanto 18% (46/255) das amostras foram positivas para anticorpos IgM anti-*Leptospira*.

A literatura também possui diversos estudos que avaliam outras doenças além da dengue e da leptospirose. Lindo *et al.* (2013) realizaram um estudo na Jamaica onde durante os anos 2007 e 2008, uma epidemia de dengue foi identificada, das 5400 amostras de sangue enviadas ao Departamento de Microbiologia da Universidade das Índias Ocidentais para teste da presença de anticorpos IgM contra dengue, 3165 foram selecionadas, aleatoriamente, e dessas 2149 foram testadas para anticorpos contra *Leptospira* e malária e encontraram os seguintes resultados: a prevalência de infecção por dengue foi de 34,8%, enquanto a de leptospirose foi de 6,5% e a de malária foi de 6,0% e os autores destacaram ainda que uma pequena proporção (0,2% ou 4/2419) das amostras foram soropositiva para todas as três infecções estudadas. No entanto, houve 47 (1,9%) casos de co-infecção por dengue/leptospirose, 70 (2,8%) casos de co-infecção por dengue/malária e 10 (0,4%) casos de coinfeção por malária/leptospirose. No Peru, entre os 101 pacientes que testaram negativo para dengue (ELISA IgM e ELISA antígeno NS1), zika e chikungunya (ELISA IgM), 31,7% resultaram positivo para leptospirose através do MAT (DÁVILA *et al.*, 2019).

Na Tanzânia, foi realizado um estudo entre setembro de 2007 e agosto de 2008 e 831 amostras foram disponibilizadas para sorologia de leptospirose, sendo que, 453 (54,5%) participantes tinham tanto amostras agudas quanto de convalescença (pareadas), e 378 (45,5%) participantes tinham uma única amostra de soro (aguda ou de convalescença). Os resultados obtidos pelos pesquisadores foram: 40 (8,8%) dos 453 pacientes com amostras pareadas atenderam à definição de leptospirose confirmada. Daqueles com uma única amostra de soro, 30 (3,6%) dos 831 atenderam à definição de leptospirose provável e no total, 70 (8,4%) dos 831 participantes atenderam à definição de leptospirose, seja confirmada ou provável. Eles ressaltaram ainda que evidências de exposição a leptospirosas patogênicas foram encontradas em 277 (36,4%) dos 761 participantes que tinham um ou mais títulos disponíveis e não

preenchiam os critérios para leptospirose confirmada ou provável, de forma que, no total 346 (41,6%) dos 831 participantes apresentaram evidências de anticorpos reagindo a leptospiras patogênicas e os pesquisadores destacaram que entre os participantes posteriormente identificados com leptospirose confirmada ou provável, os diagnósticos clínicos provisórios mais comuns foram malária em 31 (44,3%), seguida por pneumonia em 18 (25,7%) e o diagnóstico clínico de leptospirose não foi feito em nenhum caso.

Na Índia, 398 pacientes foram avaliados para diferentes doenças que causam febre aguda e 12 (3%) foram positivos para leptospirose e desses um resultou em óbito (CHRISPAL *et al.*, 2010). Ainda na Índia, outros estudos similares encontraram amostras positivas para leptospirose, tais como 8 (0,6%) de 1258 amostras analisadas (ABHILASH *et al.*, 2016), 6 (11,3%) de 53 (BHATIA *et al.*, 2019) e 238 (18%) de 1324, sendo que, 20 (1,5%) pacientes com febre faleceram durante a hospitalização e entre estes, 11 (55%) mortes foram resultado de leptospirose (ANDREWS; ITTYACHEN, 2018).

### **2.3 A ocorrência de leptospirose em pacientes dengue-negativos no Brasil**

Apesar da abundância de relatos em escala global que indicam o diagnóstico de leptospirose em casos suspeitos de dengue ou outras doenças febris, no Brasil, há notável escassez de estudos que propõem esse tipo de investigação.

Em Salvador no estado da Bahia, durante intensas chuvas sazonais em 1996, ocorreram epidemias simultâneas de dengue e leptospirose, Flannery *et al.* (2001) identificaram casos de leptospirose em pacientes cuja suspeita inicial era dengue. De acordo com os autores, a dengue não foi responsável por mortes, já que os casos não desenvolveram formas graves, em contraste, a epidemia de leptospirose que se concentrou em bairros de baixa renda foi uma causa significativa de mortalidade, com uma taxa de letalidade de 15% e mais de 50 mortes identificadas durante o período epidêmico, embora menos casos tenham sido notificados, dessa forma, ficou nítido que o alto índice de suspeita de dengue contribuiu para um significativo atraso no

encaminhamento de casos de leptospirose para o hospital de referência em doenças infecciosas.

Um estudo no Estado de Mato Grosso do Sul, utilizou soros de pacientes com suspeita clínica inicial de dengue e hepatite viral, porém, sem confirmação laboratorial. Um total de 439 amostras foram avaliadas através de soroglutinação microscópica para leptospirose. Os índices de sororreagentes nas amostras com suspeita clínica de dengue e hepatite viral foram, respectivamente, 15,9% e 9% (SOUZA; NOGUEIRA; PEREIRA, 2007).

No Distrito Federal, entre janeiro e maio de 2008 foi realizado um estudo descritivo com 144 pessoas utilizando amostras secundárias de soro coletadas durante a convalescença. Todos os exames foram testados novamente para dengue, que foi confirmada em 11,8% (n = 17); as amostras que permaneceram negativas para dengue (n = 127) foram testadas para rubéola, com 3,9% (n = 5) de resultados positivos e entre os negativos (n = 122), foram realizados testes para leptospirose e hantavírus. Os testes positivos para leptospirose foram 13,9% (n = 17) e nenhum para hantavírus (SILVA; EVANGELISTA, 2010).

No Ceará, um estudo entre fevereiro e dezembro de 2010, as amostras de 86 pacientes com suspeita clínica de dengue foram avaliadas por diferentes técnicas diagnósticas e posteriormente, para leptospirose e 48 (55,8%) foram positivos para dengue em pelo menos um dos testes, ao passo que 5 (7,35%) apresentaram reações positivas indicativas de leptospirose (BEZERRA *et al.*, 2015). Ainda no Ceará, em outro estudo, o resultado de casos confirmados como leptospirose foi de 10,8% em 2008, 19,2% em 2010 e 30,8% em 2012, entre os casos suspeitos de dengue que resultaram negativos nos testes laboratoriais e os autores acreditam que aproximadamente 20% dos casos semelhantes à dengue podem ser de leptospirose em áreas onde as duas doenças são endêmicas (FONTES *et al.*, 2015b).

Em um estudo retrospectivo para detectar leptospirose em pacientes testados e negativados para dengue, foram utilizadas amostras de soro de 2017 pacientes de 48 cidades localizadas na região central do estado de São Paulo e eles encontraram uma prevalência geral de casos de leptospirose de 21 (1,04%), sendo que, no SINAN não tinha registros para 16 pacientes positivos para leptospirose que, então, foram considerados casos não notificados (FORNAZARI *et al.*, 2021).

Esteves (2023), realizou uma investigação retrospectiva de casos subnotificados de leptospirose em pacientes atendidos na rede pública de saúde do município de São Paulo entre maio e dezembro de 2019 com suspeita clínica de dengue e negativadas por exames laboratoriais, as 7064 amostras com resultado negativo para o teste de IgM-Dengue foram selecionadas para o teste de detecção de anticorpos IgM anti-*Leptospira* spp e dessas, 6936 amostras foram utilizadas, sendo que, 786 (11,3%) foram positivas para leptospirose. Ressalta-se que no mesmo período, foram registrados somente 65 casos de leptospirose no SINAN.

Conforme demonstrado por esses estudos, não é incomum uma suspeição exagerada de casos de dengue e, como consequência, uma subestimação concomitante do número de casos de outras patologias com sintomas semelhantes, como é o caso da leptospirose.

Segundo Tomashek *et al.* (2017), uma das estratégias mais eficazes para detectar a subnotificação da leptospirose em áreas onde a suspeita de dengue é frequente consiste em realizar uma análise detalhada da doença em indivíduos que apresentam suspeita clínica de dengue e não obtiveram confirmação da infecção viral pelos testes preconizados. Assim, identificar casos subnotificados de leptospirose em pacientes negativados para dengue nos serviços de saúde do município de São Paulo, pode ser fundamental para salvar vidas, evitar internações e custos associados ao cuidado tardio de casos agudos de leptospirose.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Identificar casos de leptospirose humana no município de São Paulo pela detecção da infecção leptospírica em pacientes com suspeita clínica de dengue que não tiveram confirmação da infecção viral.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar a presença de DNA de leptospiras patogênicas pela PCR em amostras de coágulo sanguíneo de pacientes com suspeita clínica de dengue cujo diagnóstico laboratorial para o antígeno NS1 tenha sido negativo;
- Identificar as regiões do município com maior ocorrência de casos subdiagnosticados pela análise de distribuição espacial dos casos confirmados e análise espacial de risco;
- Avaliar a viabilidade da utilização de amostras de coágulos sanguíneos para detecção precoce de infecção por leptospiras em casos suspeitos de dengue.

## **4 MATERIAIS E MÉTODO**

### **4.1 Parcerias e bioética**

A execução do projeto tem como ponto de partida parceria firmada com a Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de São Paulo. Já em consonância com os termos regidos pela nova Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD), os termos dessa parceria foram estabelecidos especificamente para a investigação proposta nesse projeto. Garantem a concessão de amostras de pacientes com suspeita de dengue que tiveram amostras processadas no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores - Divisão de Vigilância de Zoonoses (LABZOO-DVZ), assim como o acesso aos dados de geolocalização dos pacientes.

O projeto contou com aprovação dos comitês de ética da Secretaria de Saúde Municipal de São Paulo (CAAE 72485623.9.3001.0086) e da Universidade Santo Amaro (UNISA), número de protocolo da aprovação do registro da pesquisa: 181/2023, (CAAE 72489323.2.0000.0081). Não necessitou de TCLE, pois as amostras foram obtidas diretamente do banco de amostras do LABZOO-DVZ.

Não houve qualquer risco de identificação dos pacientes ou divulgação de dados sensíveis, pois não foram acessados dados que identifiquem o paciente, apenas o Código de Endereçamento Postal (CEP) ou coordenadas geográficas, assim como o número SINAN. As coordenadas tiveram o número de casas decimais reduzido de 5 para 3, a fim de diminuir a precisão, impossibilitando a recuperação do endereço do paciente por geocodificação reversa. O erro aplicado foi de aproximadamente 50m, tanto para latitude como para longitude.

### **4.2 Desenho experimental, amostras e critérios de inclusão/exclusão**

Trata-se de estudo observacional, de caráter transversal, que avaliou a presença direta do agente etiológico da leptospirose em pacientes que apresentavam suspeita de dengue com até 3 dias de sintomas, que tiveram amostras de soro

sanguíneo encaminhadas para diagnóstico da arbovirose nas instalações do LABZOO-DVZ.

Foram utilizadas amostras de coágulo sanguíneo, obtidos após utilização do soro dos pacientes para a realização do teste de ELISA para detecção da proteína NS1, capaz de identificar pacientes com infecção aguda pelo vírus da dengue. Como critério de inclusão, foram utilizadas somente amostras de pacientes que apresentaram negatividade no ELISA-NS1 (dengue-negativos). Como critério de exclusão, foram desconsideradas todas as amostras de pacientes que residiam fora do município de São Paulo, além da exclusão de amostras que não possuíam número de identificação no sistema SINAN.

Do universo total de amostras, recebidas entre 07/08/2023 e 15/09/2023, foram selecionadas 200 amostras para investigação da presença de DNA leptospírico. As amostras foram selecionadas com base no Distrito Administrativo da residência dos pacientes (DA), que por sua vez foram selecionados com base no estudo conduzido por Esteves (2023), que mapeou os DAs com maior número de casos subnotificados na cidade de São Paulo no ano de 2019.

Os dados relacionados à data de coleta da amostra, início dos sintomas, sintomas apresentados, número SINAN do paciente, Distrito Administrativo (DA), resultados ELISA da proteína NS1, endereço, sexo e data de nascimento, foram recuperados do banco de dados Matrix (LABZOO) e do sistema SINAN. Os dados obtidos foram organizados em planilha do Excel para análise descritiva dos dados.

### **4.3 Recuperação e tratamento dos coágulos**

O descongelamento das amostras de coágulos foi realizado em termobloco à 55° por aproximadamente 10 minutos. Foi realizada uma adaptação no protocolo desenvolvido por Se Fu Wong *et al.* (2007) para a recuperação do coágulo, já descongelado, do gel separador de soro. Os tubos com os coágulos foram centrifugados em posição invertida dentro de um tubo falcon por 2 minutos a 2.000 rpm para separação do gel. Foram preparados dois microtubos de 1,5ml tipo Eppendorf, devidamente identificados, e em cada um foi adicionado 100µl de PBS.

Após a recuperação, foi realizada a quebra mecânica do coágulo adaptando a metodologia proposta por Tas (1990). O coágulo foi depositado sobre papel alumínio a fim de evitar contaminação da capela e com a lateral da ponteira de 1000µl, repartidos em diversos pedaços de aproximadamente 0,5cm, que foram misturados para garantir homogeneização da amostra. Foram selecionados alguns pedaços do coágulo e adicionados até a marca de, no máximo, 0,25ml de cada microtubo, sendo que um deles foi armazenado à – 8°C e o outro foi efetivamente utilizado na etapa de tratamento e extração de DNA.

Para o tratamento da amostra, foi preparado para cada amostra em tubo falcon um mix com 180µl de Genomic Digestion Buffer e 20µl de proteinase K, disponíveis no kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.). Foram adicionados 200µl do mix às amostras que foram agitadas em vórtex por 10 segundos cada. Os microtubos foram alocados ao termobloco a 55°C até ocorrer a lise do coágulo (aproximadamente 3 horas). As amostras foram agitadas em vórtex em intervalos de 15-20 minutos para facilitar a digestão.

#### **4.4 Extração de DNA e PCR**

O DNA das amostras de coágulos dos pacientes foi extraído utilizando 200µL da amostra pré-digerida por meio do kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) de acordo com as especificações do fabricante e seguindo protocolos de estudos prévios que trabalharam com esse tipo de amostra (Lundblom *et al.* 2011; Abreu *et al.* 2018; Gutierrez-Loli *et al.* 2019; Mayta *et al.* 2019; Torrellas *et al.* 2020). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo e para o controle positivo nas extrações e reações PCR, foram adicionados 300 µl de cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar *Canicola* em um tubo seco de coleta de soro sanguíneo, que foi utilizado para a coleta de 6ml de sangue total de cavalo.

Para a amplificação de fragmento de 331 pb do gene 16S foram utilizados os primers descritos por Mérien *et al.* (1992). A reação utilizou Go Taq™ Green Master Mix (Promega Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. A solução foi submetida a desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido por 40 ciclos

de 94°C durante 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e então o ciclo final a 72°C durante 5 minutos.

Após a amplificação os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) submetidos à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5x. Após a corrida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta com auxílio de transiluminador para análise e registro dos resultados.

Os resultados de PCR foram confirmados pela reextração de DNA das amostras positivas e com resultados inconclusivos, com subsequente realização da PCR pelos mesmos métodos de amplificação utilizados inicialmente. Foram consideradas positivas somente as amostras com positividade nas duas reações de PCR (primo-amplificação e amplificação confirmatória).

#### **4.5 Padronização do banco de dados e mapas**

Os dados relacionados à data de coleta da amostra, número SINAN do paciente, resultados ELISA da proteína NS1 foram recuperados do banco de dados Matrix (LABZOO); os dados relacionados às características epidemiológicas e sociodemográficas do paciente do banco de dados do SINAN; e os dados de localização (latitude e longitude ou CEP) foram recuperados do sistema da Divisão de Vigilância de Zoonoses (DVZ).

A coleta de dados cartográficos do município de São Paulo foi conduzida nos sistemas do GeoSampa (<https://geosampa.prefeitura.sp.gov.br/>). Os atributos dos mapas e tabulações foram unidos de acordo com sua localização.

#### **4.6 Análises espaciais e de geoprocessamento**

A partir das bases de dados do SINAN, foram obtidos os dados de latitude e longitude dos pacientes e, para os pacientes sem esses dados, a aquisição da localização geográfica foi feita como coordenadas de latitude e longitude no formato decimal, usando 32atum WGS 89 e o software R (R Development Core Team, 2008),

em associação ao serviço do Google Maps para cálculo de um ponto randômico dentro do polígono do código de endereçamento postal fornecido. Os dados foram então transferidos para o software QGIS 3.14.0 para visualização espacial.

#### **4.7 Análise estatística**

Por tratar-se somente de um estudo observacional, foi feita somente a estatística descritiva dos dados, incluindo estimativas de média e mediana para as variáveis quantitativas, com determinação de intervalo de confiança de 95%, e descrição de frequências das variáveis qualitativas.

### **5 RESULTADOS**

Entre 07/08/2023 e 15/09/2023 foram recebidas no LABZOO um total de 369 amostras de coágulos sanguíneos de pacientes com suspeita de dengue, encaminhadas para o teste de ELISA para a presença do antígeno NS-1, e cujo resultados da investigação viral foram negativos.

Foram excluídas 26 (7%) amostras com incompletude de dados, resultando em 343 amostras disponíveis para o presente estudo. A Figura 1 ilustra a distribuição das amostras recebidas no período, de acordo com o distrito administrativo.

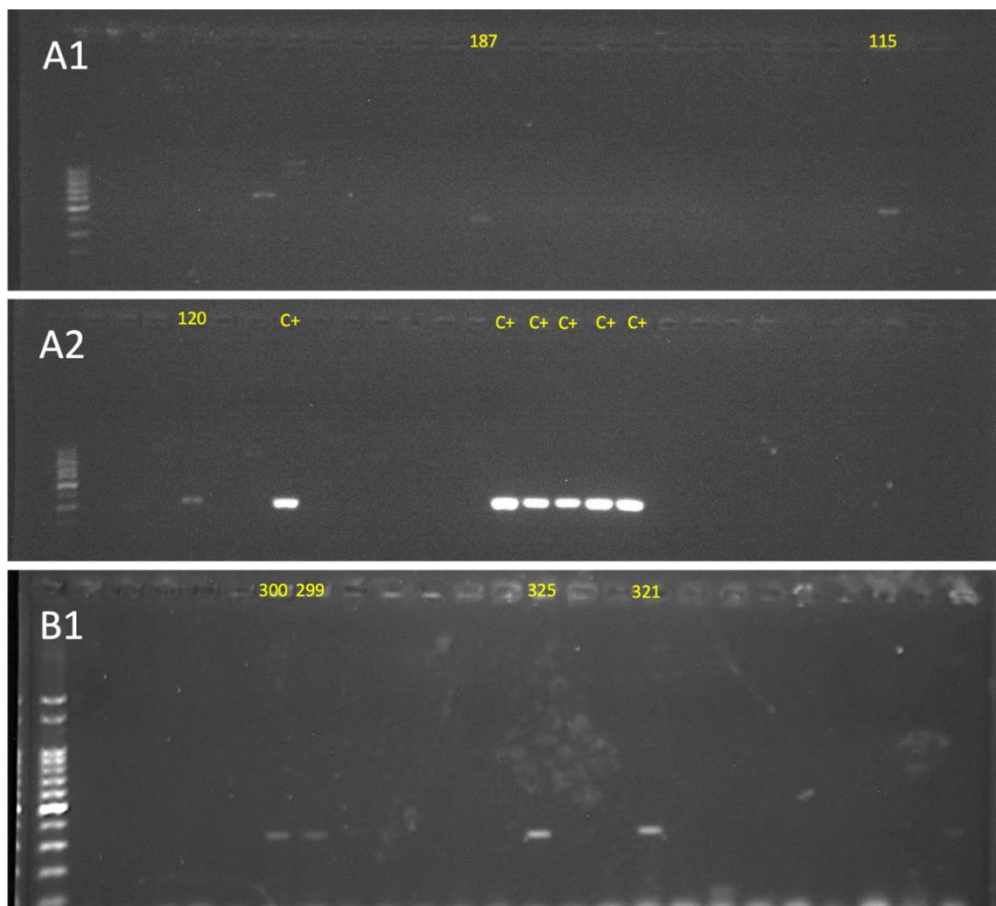


**Tabela 1** Distribuição de amostras testadas de acordo com os distritos administrativos selecionados de acordo com a maior probabilidade de apresentar casos subdiagnosticados.

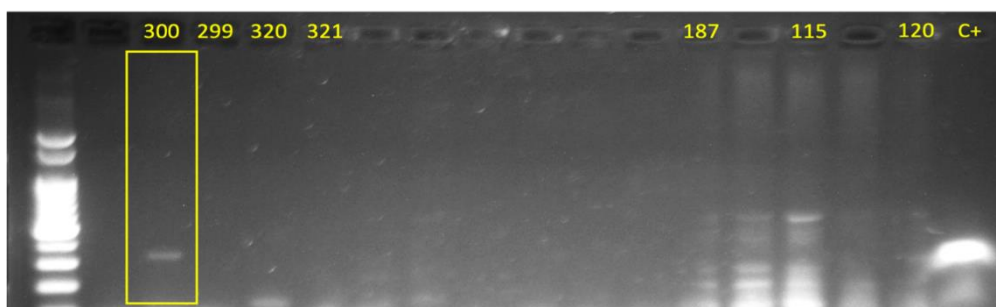
<b>Distrito Administrativo (DA)</b>	<b>N</b>	<b>% (IC95%)</b>
Cachoeirinha	105	52,5 (45,58-59,34)
Brasilândia	19	9,5 (6,02-14,14)
Campo Limpo	17	8,5 (5,23-12,96)
Guaianases	12	6 (3,32-9,94)
Jardim Ângela	12	6 (3,32-9,94)
Cangaíba	11	5,5 (2,96-9,32)
Tremembé	11	5,5 (2,96-9,32)
Freguesia Do Ó	4	2 (0,68-4,68)
Cidade Ademar	3	1,5 (0,42-3,95)
Sacomã	2	1 (0,21-3,17)
Jaraguá	1	0,5 (0,05-2,31)
Jardim São Luís	1	0,5 (0,05-2,31)
Rio Pequeno	1	0,5 (0,05-2,31)
Vila Andrade	1	0,5 (0,05-2,31)

Após reação de amplificação de fragmento do gene 16S, foram identificadas 7 amostras positivas (3,5%; IC95% 1.6%-6.7%), conforme ilustra a Figura 2. Todos os controles positivos do processo de extração foram positivos à PCR, com bandas únicas e intensas.

A confirmação dos resultados de PCR foi feita pelo reteste das amostras (reextração de DNA das amostras positivas e inconclusiva), utilizando o mesmo protocolo de amplificação. Após o reteste, foi confirmada amplificação de apenas 1 entre as 7 amostras inicialmente consideradas positivas, conforme demonstra a Figura 3.



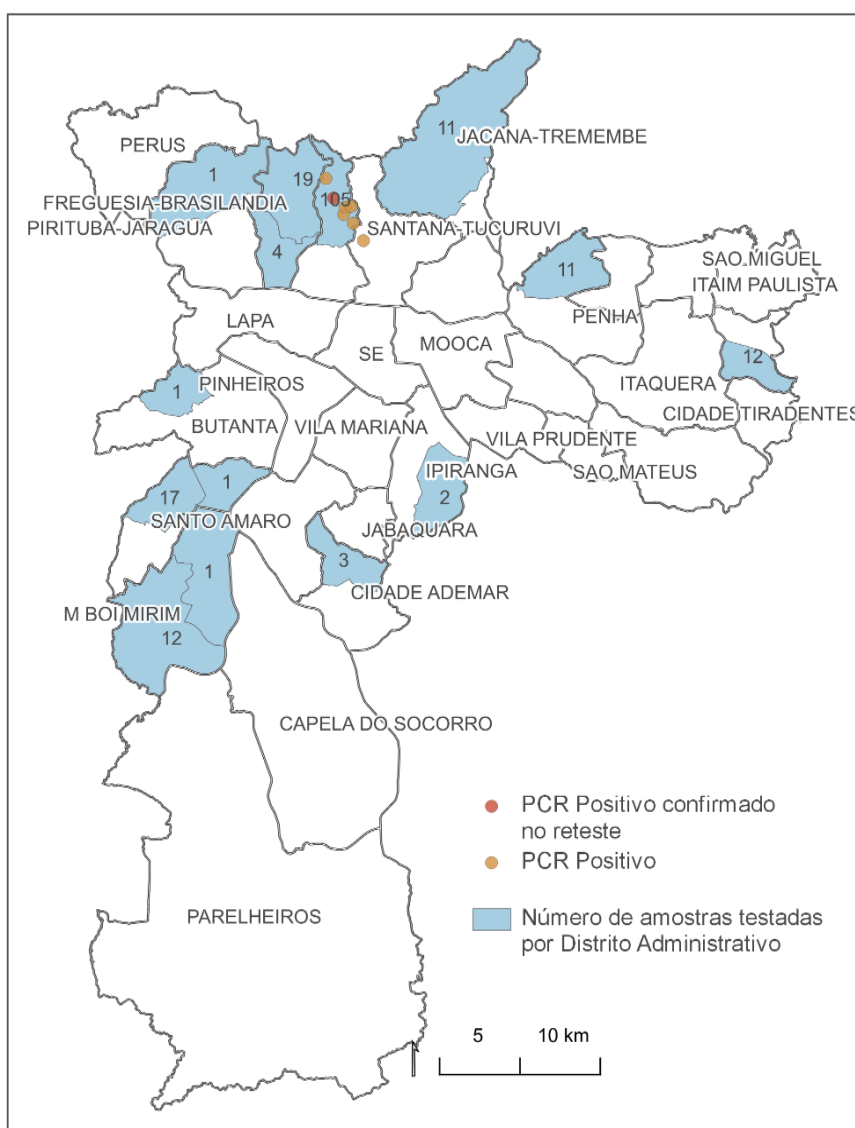
**Figura 2** Gel de eletroforese mostrando positividade das amostras 187 e 115 (A1), 120 (A2), 300, 299, 325 e 321 (B1). Os controles positivos de extração de todos os ensaios de extração foram positivos (A2). Fonte: Autor



**Figura 3** Gel de eletroforese mostrando positividade da amostra 300 no reteste das amostras que foram inicialmente consideradas positivas à PCR. Fonte: Autor

## 5.2 Distribuição espacial dos casos

O endereço residencial dos pacientes que obtiveram amplificação de DNA leptospírico foi utilizado para produção de mapa de distribuição dos casos positivos, conforme ilustra a Figura 4. Todos os casos se concentram no distrito de Cachoeirinha, que foi também o distrito com o maior número de amostras testadas.



**Figura 4** Distribuição dos casos positivos por distrito administrativo e quantitativo de amostras testadas de cada distrito selecionado. Fonte: Autor

### 5.3 Recuperação de dados do SINAN

Com base nos resultados do reteste, que atestam positividade de uma amostra (amostra 300), foi acessado dados do SINAN para obtenção de dados do atendimento do paciente.

O paciente tinha 21 anos, era do sexo masculino, de escolaridade desconhecida, pardo e residente do distrito de Cachoeirinha, subprefeitura de Casa Verde/Cachoeirinha. O paciente não foi hospitalizado, e no sistema não havia atualização de evolução no caso. Apresentou no momento do atendimento os seguintes sintomas: febre, mialgia, cefaleia, e dor retro-orbital. Não apresentou os seguintes sintomas: exantema, vômitos, náusea, dor nas costas, conjuntivite, artrite, artralgia ou petéquias. Não apresentou positividade na prova do laço e leucopenia. Da mesma forma, não apresentou sinais clínicos de hepatopatia ou insuficiência renal, hipertensão e diabetes.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi capaz de identificar a presença de DNA leptospírico em pacientes com doença febril que tiveram resultados negativos aos testes confirmatórios de dengue. Esses resultados demonstram que a abordagem utilizada foi capaz de identificar prováveis casos subnotificados da doença, sugerindo que a busca de casos de leptospirose aguda entre pacientes dengue-negativos é viável e pode contribuir para uma compreensão mais ampla do impacto da enfermidade em Saúde Pública.

Dos 200 pacientes testados, foi possível identificar a presença de DNA leptospírico em 7 indivíduos (3,5%), dos quais somente um paciente apresentou positividade no reteste (0,5%). Essas taxas de positividade encontradas podem ser consideradas relativamente baixas, semelhantes à reportada recentemente por Fornazari *et al.* (2021), que ao investigarem a presença de DNA leptospírico no soro sanguíneo de 305 pacientes com sintomas da infecção pelo vírus da dengue, foram capazes de identificar somente um paciente positivo à PCR.

Embora a literatura já aponte estudos sorológicos que identificam casos agudos de leptospirose em pacientes dengue-negativos, revelando frequentemente altas taxas de positividade, como evidenciado por Loong *et al.* (2022), que registraram 18% de casos positivos, e por Fontes *et al.* (2015), que obtiveram uma taxa de 30,8% de casos positivos, ambos utilizando métodos indiretos de detecção do patógeno, o presente estudo se caracteriza como a primeira tentativa, até o presente momento, de identificar pacientes acometidos por leptospiras a partir de amostras de coágulo sanguíneo, utilizando para tal técnicas de detecção direta.

Essa estratégia está alinhada com a urgente necessidade de aprimorar as estratégias para o diagnóstico precoce da leptospirose em humanos (FERNANDES, *et al.* 2022), uma vez que foram utilizadas amostras de pacientes com suspeita de dengue em que a identificação do antígeno NS1 do vírus não foi possível. Pelo fato de a investigação do antígeno NS1 ser realizada somente em pacientes com até 3 dias de sintomas (SAÚDE, 2014), o universo amostral investigado nesse estudo incluiu somente pacientes com curso superagudo de doença febril, e a identificação de pacientes com quadro leptospírico lança luz sobre a possibilidade do diagnóstico precoce da infecção por meio da abordagem adotada.

A investigação da infecção por leptospiras em amostras de coágulo pode ser estratégica para uma resposta diagnóstica rápida aos profissionais de saúde, podendo viabilizar a comunicação ágil também com os órgãos de controle e vigilância e eventual busca ativa dos casos identificados. A identificação precoce de casos pode auxiliar na melhor escolha terapêutica dos pacientes acometidos, podendo evitar internações e reduzir os custos associados ao cuidado tardio de casos agudos de leptospirose (SOUZA, *et al.* 2011). Ademais, a identificação de casos subnotificados por meio da abordagem aqui proposta também poderá futuramente auxiliar na identificação de áreas de risco para o subdiagnóstico da enfermidade, abrindo caminhos para a adoção de medidas estratégicas de prevenção nas áreas identificadas.

No presente estudo não foi possível determinar essas áreas de risco, conforme inicialmente proposto, devido ao número relativamente baixo de amostras testadas, assim como ao número baixo de indivíduos considerados positivos. A baixa positividade pode ser parcialmente explicada pela sazonalidade da doença, mais comum nos períodos chuvosos (BANDOUK *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014), uma

vez que foram processadas somente amostras de pacientes atendidos entre agosto e setembro, período esse que não abrange as épocas de alta pluviosidade e temperatura.

Outro aspecto que pode ter influenciado nas taxas de positividade é a amostragem adotada nesse estudo. No intuito de aumentar a chance de encontrar casos positivos, foram selecionadas amostras de forma intencional, a partir das áreas com maior subdiagnóstico da enfermidade de acordo com os resultados obtidos no estudo realizado por Esteves (2023). Esse estudo apontou que das 6.917 amostras negativas testadas para dengue entre maio e dezembro de 2019 no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores (LABZOO), da Divisão de Controle de Zoonoses (DVZ), 786 apresentavam positividade ao teste de ELISA IgM, totalizando 11,4% de casos prováveis e não detectados da doença. A distribuição espacial desses casos revelou dois clusters de alto risco para detecção de casos prováveis da enfermidade: um na Zona Norte do município, que engloba as subprefeituras Pirituba-Jaraguá, Freguesia-Brasilândia, Casa Verde-Cachoeirinha e Santana-Tucuruvi, somando 95 Unidades de Desenvolvimento Humano (UDHs); e outro na Zona Sul, que abrange as subprefeituras de Campo Limpo, M'Boi Mirim, Parelheiros e Capela do Socorro, somando 67 UDHs.

A utilização desses resultados para escolha de quais amostras deveriam ser testadas no presente trabalho, teve como racional a tentativa de aumentar a probabilidade de encontrar pacientes com infecção leptospírica aguda e subdiagnosticada. Ainda assim, essa abordagem pode ter enviesado a taxa de positividade encontrada, pois as áreas com maior risco para subdiagnóstico em 2019 podem ser distintas daquelas que ocorreram no período analisado.

O número relativamente pequeno de amostras positivas também pode ser parcialmente explicado pelas limitações intrínsecas às próprias técnicas utilizadas nesse estudo. Embora encontre precedentes em estudos que buscaram a identificação de outros patógenos utilizando amostras de coágulo sanguíneo, como *Leishmania* spp. (TORRELLAS *et al.* 2020), *P. falciparum* (LUNDBLOM *et al.* 2011; ABREU *et al.* 2018 ), *Toxoplasma gondii* (GUTIERREZ-LOLI *et al.* 2019) e *Trypanosoma cruzi* (MAYTA *et al.* 2019) o uso do diagnóstico molecular a partir desse tipo de amostra pode ser altamente desafiador, e falhas nas etapas de extração, e

principalmente no pré-condicionamento das amostras, podem determinar recuperação de menores quantidades de DNA.

A homogeneização do coágulo parece ser um requisito fundamental para a extração ótima de DNA da amostra como um todo (LUNDBLOM, 2011). Além disso, a maioria das amostras de coágulos são sólidas, sendo necessário liquefazê-las antes da extração de DNA. De acordo com Guangdi Zhou (2019) uma liquefação inadequada pode resultar em baixos rendimentos de extração. Outrossim, Stanzick *et al.* (2023) no seu estudo obtiveram um rendimento de DNA por volume de sangue significativamente menor após a extração de sangue coagulado em comparação com o sangue anticoagulado e segundo os autores, isso se deve não apenas aos diferentes protocolos de extração, mas também aos diferentes processos de coleta de sangue, tendo em vista que uma parte da coleta foi realizada de modo padronizado em ambiente laboratorial, enquanto, outra foi realizada em campo. Os autores concluíram, nesse estudo, que a concentração muito baixa de DNA foi causada mais pela pequena quantidade de sangue no tubo do que pela dependência do método de extração de DNA.

Diante desses desafios, diversos estudos já buscaram otimizar métodos de extração de DNA a partir de amostras de coágulo sanguíneo (BRITO, 2006; CARDOZO, 2009; LUNDBLOM, 2011; MARDAN-NIK 2019; STANZICK *et al.*, 2023). Para escolher um método de extração eficiente, diferentes fatores influenciadores devem ser considerados. A natureza das amostras biológicas e suas condições de armazenamento, questões técnicas, tempo e eficácia de custos são alguns exemplos (MARDAN-NIK 2019).

No presente estudo, além dos cuidados adotados para homogeneização de fragmentos dos coágulos utilizados, que se baseou na utilização de múltiplos fragmentos de um mesmo coágulo, as amostras foram também tratadas previamente à realização do processo de extração com um mix contendo buffer de digestão e proteinase K, no intuito de garantir adequada solubilização e conseqüentemente maior probabilidade de recuperação de DNA leptospírico nas amostras testadas. A presença de bandas fortes em gel de agarose obtidas a partir das amostras controle positivas indicam que o procedimento de extração foi bem-sucedido, sugerindo também sucesso do pré-condicionamento adotado nas amostras avaliadas. Não foi conduzido, entretanto, nenhum procedimento de controle endógeno dos processos de extração,

como por exemplo a amplificação de genes constitutivos da espécie-alvo, conforme descrito por Abdulmawjood; Roth; Bülte, 2002; Ahmed; Goris; Meijer, 2020; Gravekamp *et al.*, 1993 . Assim, não foi possível avaliar se o processo de extração conduzido foi de fato capaz de garantir adequada recuperação de DNA das amostras clínicas, que por sua vez poderiam ter quantidades muito inferiores de DNA que os controles positivos utilizados. Futuramente devem ser realizados testes adicionais visando aprimorar as etapas do processo de pré-preparo de amostras empregado neste estudo.

Para além das dificuldades impostas pela etapa de extração de DNA de amostras de coágulo, as limitações intrínsecas da técnica de PCR convencional também podem ter ocasionado falhas na detecção de pacientes com leptospiremia no presente estudo.

Embora seja de grande utilidade para o diagnóstico precoce da leptospirose aguda e clínica em humanos, conforme já reportado por (AHMED *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2007; VILLUMSEN *et al.*, 2010), a PCR apresenta também algumas desvantagens, como a necessidade de uma concentração mínima de bactérias nas amostras, e o fato da referida concentração de DNA ser dependente do êxito da lise celular, para a qual contribui a difícil solubilização das leptospiros (CARREIRA, 2009).

Dessa forma, é possível que o teste utilizado no presente estudo tenha apresentado resultados falso negativos devido à sensibilidade limitada da técnica (AGAMPODI, *et al.* 2012), ou mesmo pela presença de inibidores da reação. Não foram realizadas técnicas alternativas à detecção molecular empregada para confirmação dos resultados negativos obtidos. Assim, como a utilização de coágulo como amostra base para o diagnóstico de leptospirose é inédita, não há como afirmar e nem como descartar a hipótese de que a baixa sensibilidade da técnica possa ser uma das possíveis causas para o resultado das seis amostras negativadas no reteste. Em estudos futuros, entretanto, é aconselhável o uso em paralelo de outras técnicas reconhecidamente mais sensíveis que a PCR convencional, como a PCR em tempo real (AGAMPODI 2012; BOURHY *et al.*, 2011; STODDARD *et al.*, 2009).

É importante enfatizar que a aplicação da PCR em ambiente clínico também pode fornecer resultados falso-positivos. Estudos já demonstraram que existem riscos consideráveis de amplificação do DNA de bactérias comensais e ambientais ao utilizar o conjunto de primers que tem como alvo fragmento do gene 16S (FINK *et al.*, 2015),

o que pode prejudicar a sua utilização para confirmação da infecção por leptospirose em amostras clínicas. A associação com sequenciamento de DNA é altamente recomendada nesses casos para fornecer resultados mais confiáveis para comparação adequada com outras técnicas de diagnóstico (MIOTTO *et al.*, 2018).

Por fim, o perfil do paciente positivado, 21 anos e sexo masculino, corresponde ao perfil de maior prevalência apresentado na literatura, provavelmente devido a comportamentos específicos relacionados ao sexo e à idade que podem estar relacionados a maior exposição à leptospira (FORNAZARI *et al.*, 2021). Já os sintomas apresentados pelo paciente positivado nesse estudo, ou seja, febre, mialgia, cefaleia, e dor retro-orbital, demonstram a dificuldade já mencionada para diagnóstico diferencial entre a leptospirose e outras doenças febris como a dengue. Os casos com sintomas leves podem não ser corretamente diagnosticados devido à sua apresentação clínica inespecífica. Ressalta-se que aproximadamente, apenas 10 a 15% dos casos de leptospirose exibem sinais clínicos graves, facilitando as chances de um diagnóstico correto (COSTA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2018).

## 7 CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo demonstram a viabilidade da detecção molecular de leptospiros em amostras de coágulo sanguíneo, oferecendo uma abordagem alternativa para o diagnóstico precoce da leptospirose e estimativa de sua subnotificação. A utilização de coágulos como amostra para extração de DNA apresentou-se desafiadora, destacando a importância de se otimizar os procedimentos de extração para garantir resultados confiáveis na aplicação da PCR. Apesar das limitações, a abordagem inédita de utilizar coágulos sanguíneos para a detecção de leptospiros representa um passo importante na pesquisa diagnóstica. Testes adicionais, incluindo a padronização da reação de qPCR utilizando a tecnologia SYBR, estão em andamento para aprimorar a sensibilidade e especificidade do método.

A investigação revelou a presença de DNA leptospírico em uma amostra, ressaltando a necessidade de aprimorar as etapas do processo metodológico. Os sintomas manifestados pelo único paciente com resultado positivo evidenciam o desafio do diagnóstico diferencial entre a leptospirose e outras doenças febris, notadamente a dengue, especialmente em casos leves com apresentação clínica inespecífica. A complexidade em discernir entre essas enfermidades sublinha a necessidade de métodos diagnósticos mais precisos para orientar intervenções clínicas rápidas e eficazes.

Em conclusão, este estudo contribui para o avanço do conhecimento na detecção de leptospirose, apresentando desafios e perspectivas para futuras pesquisas visando melhorias nos métodos diagnósticos e, conseqüentemente, na resposta clínica eficiente à enfermidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMAWJOOD, A.; ROTH, S.; BÜLTE, M. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. **Molecular and cellular probes**, v. 16, n. 5, p. 335-339, 2002.

ABHILASH, K. P. P. et al. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 5, p. 335–339, 2002.

ABHILASH, K. P. P. et al. Acute undifferentiated febrile illness in patients presenting to a Tertiary Care Hospital in South India: Clinical spectrum and outcome. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 147–154, 2016.

DE ABREU, F. V. S. et al. Frozen blood clots can be used for the diagnosis of distinct *Plasmodium* species in man and non-human primates from the Brazilian Atlantic Forest. **Malaria Journal**, v. 17, p. 1-5, 2018.

AHMED, A. A.; GORIS, M. G. A.; MEIJER, M. C. Development of lipL32 real-time PCR combined with an internal and extraction control for pathogenic *Leptospira* detection. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241584>>.

AHMED, Ahmed et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 4–11, 2009.

ALLAN, K. J. et al. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for ‘One Health’ in Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–25, 2015.

ANDREWS, M. A.; ITTYACHEN, A. M. Aetiology of acute febrile illness: a multicentre study from the province of Kerala in southern India. **Tropical Doctor**, v. 48, n. 4, p. 322–325, 2018.

BANDOUK, A. C. et al. **Programa de Vigilância e Controle de Leptospirose e Roedores do município de São Paulo**São Paulo. Prefeitura do Município de São Paulo, 2013.

BAQUERO, O. S.; MACHADO, G. Spatiotemporal dynamics and risk factors for human Leptospirosis in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, out. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-33381-3>>.

BARRAGAN, V. et al. Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 19, 2017.

BEZERRA, L. F. de M. et al. Serological evidence of leptospirosis in patients with a clinical suspicion of dengue in the State of Ceará, Brazil. **Biomedica**, v. 35, n. 4, p. 557–562, 2015.

BHATIA, M. et al. Serological evidence of human leptospirosis in patients with acute undifferentiated febrile illness from Uttarakhand, India: A pilot study. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 11, n. 01, p. 011–016, 2019.

BOURHY, P. et al. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2154-2160, 2011.

BRITO, L. G. et al. Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos. 2006.

BROWN, M. G. et al. Leptospirosis in suspected cases of dengue in Jamaica, 2002–2007. **Tropical Doctor**, v. 40, n. 2, p. 92–94, 2010.

CARDOZO, D. M. et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 651-656, 2009.

CARREIRA, T. M. Vaz P. Q. **Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce de Leptospirose humana**. 2009. Tese de Doutorado. FCT-UNL.

CHRISPAL, A. et al. Acute undifferentiated febrile illness in adult hospitalized patients: The disease spectrum and diagnostic predictors – an experience from a tertiary care hospital in South India. **Tropical Doctor**, v. 40, n. 4, p. 230–234, 2010.

CONROY, A. L. et al. Host biomarkers distinguish dengue from leptospirosis in Colombia: A case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 17 set. 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>>

CRUMP, J. A. Typhoid Fever and the Challenge of Nonmalaria Febrile Illness in Sub-Saharan Africa. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 8, p. 1107–1109, 15 abr. 2012.

CVE. **Dengue. Distribuição dos casos de dengue notificados e confirmados (autóctones e importados) no Estado de SP, segundo o município de residência, por mês de início de sintomas**. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/arboviroses-urbanas/dengue/dados-estatisticos>>. Acesso em: 20 out. 2023.

DATASUS. **tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm**. Disponível em: <[tabnet.datasus.gov.br](http://tabnet.datasus.gov.br)>. Acesso em: 28 jun. 2023.

DÁVILA, X. A. et al. Leptospirosis en pacientes con resultado negativo para dengue, zika y chikungunya en Jaén, Perú. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 36, n. 3, p. 535–536, 2019.

DEL VALLE-MENDOZA, J. et al. Leptospirosis in febrile patients with suspected diagnosis of dengue fever. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2021.

DIRCIO MONTES SERGIO, A. et al. Leptospirosis prevalence in patients with initial diagnosis of dengue. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

DOS SANTOS, J. P. C.; HONÓRIO, N. A.; NOBRE, A. A. Definition of persistent areas with increased dengue risk by detecting clusters in populations with differing mobility and immunity in Rio de Janeiro, Brazilfile:///C:/Users/LENOVO/OneDrive/Documentos/\_\_\_Mestrado UNISA/\_\_\_Projeto Mestrado Lepto\_Dengue/Artig. **Cadernos de Saude Publica**, v. 35, n. 12, 2019.

ELLIS, T. et al. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001–2002. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 4, p. 541-548, 2008.

ESTEVEES, S. B. **Identificação de casos de leptospirose em pacientes com suspeita clínica de dengue no município de São Paulo, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses, Departamento de Medicina veterinária preventiva e saúde animal, 2023.

FELZEMBURGH, R. D.M. et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2927, 2014.

FERNANDO, N. et al. Protein carbonyl as a biomarker of oxidative stress in severe leptospirosis, and its usefulness in differentiating leptospirosis from dengue infections. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.

FINK, J. M. et al. Evaluation of three 5' exonuclease–based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 2, p. 159–166, 2015.

FLANNERY, B. et al. Referral pattern of Leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 657–663, 2001.

FONTES, R. M. et al. a New Possibility for Surveillance: Do We Identify All Cases of Leptospirosis? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 443–446, 2015.

FORNAZARI, F. et al. Leptospirosis diagnosis among patients suspected of dengue fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, n. August 2020, p. 1–7, 2021.

GONÇALVES, A. P. P. et al. Aspectos epidemiológicos da dengue e leptospirose em um município de região fronteira do Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 43085–43097, 2020.

GRAVEKAMP, C. et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 8, p. 1691–1700, 1993.

GUTIERREZ-LOLI, R. et al. Development of a novel protocol based on blood clot to improve the sensitivity of qPCR detection of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood specimens. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 1, p. 83, 2019.

HALLIDAY, J. E. B. et al. Zoonotic causes of febrile illness in malaria endemic countries: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. e27–e37, fev. 2020.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 16, n. 8, p. 601–606, 2014.

KARANDE, S. et al. Concurrent outbreak of leptospirosis and dengue in Mumbai, India, 2002. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 51, n. 3, p. 174–181, 2005.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009.

KUMAR, S. et al. Inferring pathogen-host interactions between *Leptospira* interrogans and *Homo sapiens* using network theory. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1434, 2019.

LAROCQUE, R. C. et al. Leptospirosis during Dengue Outbreak, Bangladesh. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 766–769, maio 2005.

LE TURNIER, P. et al. Usefulness of C-Reactive Protein in Differentiating Acute Leptospirosis and Dengue Fever in French Guiana. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1–6, 2019.

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L.; EDWARDS, C. N. Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 1, p. 112–114, 2000.

LIBRATY, D. H. et al. A comparative study of leptospirosis and dengue in Thai children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 3, p. 1–7, 2007.

LINDO, J. et al. Leptospirosis and malaria as causes of febrile illness during a dengue epidemic in Jamaica. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 6, p. 329–334, 2013.

- LOONG, S. K. et al. Leptospirosis among dengue-negative febrile patients in Selangor, Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 2, p. 397, 2022.
- LUNDBLOM, K. et al. High-speed shaking of frozen blood clots for extraction of human and malaria parasite DNA. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2011.
- MARDAN-NIK, M. et al. A method for improving the efficiency of DNA extraction from clotted blood samples. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 33, n. 6, p. e22892, 2019.
- MARTINS, M. H. da M.; SPINK, M. J. P. Human leptospirosis as a doubly neglected disease in Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 919–928, 2020.
- MAYTA, H. et al. Improved DNA extraction technique from clot for the diagnosis of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0007024, 2019.
- MÉRIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219–2224, set. 1992.
- MIOTTO, B. A. et al. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipI32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 584–590, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.004>>.
- MOREIRA, J. et al. When fever is not malaria in Latin America: A systematic review. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2020.
- MOREIRA, J. et al. Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 8, p. 827–835, 2018.
- MWACHUI, M. A. et al. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–15, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. A. et al. Recognition of leptospirosis in dengue-suspected cases during dengue outbreak in Cear State, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 17, p. 1789–1792, abr. 2014.
- OMS, O. M. da S. **Dengue - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- PAL, M.; GEBREZABIHER, W.; RAHMAN, M. T. The roles of veterinary, medical and environmental professionals to achieve ONE HEALTH. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 1, n. 4, p. 148–155, 2014.

- PELISSARI, D. M. et al. Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 565-574, 2011.
- PEREIRA, M. M. et al. A Road Map for Leptospirosis Research and Health Policies Based on Country Needs in Latin America. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, v. 41, p. e131, fev. 2018. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34352>>.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013.
- RODRIGUES, A. L. Perfil epidemiológico de pacientes acometidos por leptospirose em um estado brasileiro na Amazônia Ocidental. **Revista Sustinere**, v. 7, n. 1, p. 32–45, 2019.
- RODRIGUES, C. M. O círculo vicioso da negligência da leptospirose no Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, n. September, p. 1–11, 2017. Disponível em: <[www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/](http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/)>.
- SANDERS, E. J. et al. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 3, p. 399-404, 1999.
- SE FUM WONG, S. et al. A simple method for DNA isolation from clotted blood extricated rapidly from serum separator tubes. **Clinical chemistry**, v. 53, n. 3, p. 522-524, 2007.
- SETHI, S.; et al. Leptospirosis Coexistent with Dengue Fever: A Diagnostic Dilemma. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 121, jul. 2013.
- SILVA, A. D. da; EVANGELISTA, M. do S. N. Syndromic Surveillance: Etiologic Study of Acute Febrile Illness in Dengue Suspicious Cases with Negative Serology. Brazil, Federal District, 2008 TT - Vigilância Sindrômica: Estudo Etiológico de Doenças Febris Agudas a Partir Dos Casos Suspeitos de Deng. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 52, n. 5, p. 237–242, 2010.
- SLACK, A. et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 361–366, 2007.
- SOUZA, A. I. de; NOGUEIRA, J. M. da R.; PEREIRA, M. M. Anticorpos anti-*Leptospira* em pacientes de Mato Grosso do Sul com suspeita clínica de dengue ou hepatite viral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 431–435, 2007.
- SOUZA, V. M. M. D. et al. Anos potenciais de vida perdidos e custos hospitalares da leptospirose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1001–1008, 2011.

STANZICK, K. J. et al. DNA extraction from clotted blood in genotyping quality. **BioTechniques**, v. 74, n. 1, p. 23-29, 2023.

STODDARD, R. A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

SYKES, J. E. et al. A global one health perspective on leptospirosis in humans and animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 260, n. 13, p. 1589–1596, 2022.

TAS, S. Purification of DNA from clotted blood. **Clinical chemistry**, v. 36, n. 10, p. 1851-1851, 1990.

TASSINARI, W. de S. et al. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 1721-1729, 2004.

TOMASHEK, K. M. et al. Clinical and epidemiologic characteristics of dengue and other etiologic agents among patients with acute febrile illness, Puerto Rico, 2012–2015. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005859, 13 set. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005859>>.

TORRELLAS, A. et al. Surveillance for *Leishmania* asymptomatic infection in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: a combination of leishmanin skin test and PCR using blood clots improves detection and enables identification of species. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 6, p. 433-439, 2020.

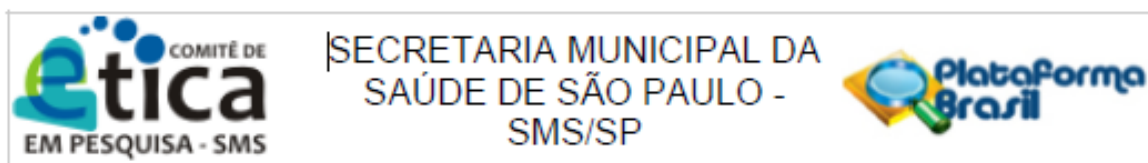
VILLUMSEN, S. et al. Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: Improved method for DNA extraction from blood cultures. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019

VINOD KUMAR, K. et al. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 6, p. fiv051, 2015.

YANAGIHARA, Y. et al. *Leptospira* Is an Environmental Bacterium That Grows in Waterlogged Soil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 2022.

## ANEXO A – Parecer consubstanciado da plataforma brasil



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Identificação de casos de leptospirose em pacientes com suspeita clínica de dengue no município de São Paulo, Brasil

**Pesquisador:** MARCOS BRYAN HEINEMANN

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 36678820.0.0000.0086

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.817.802

#### Apresentação do Projeto:

A presente proposta tem como objetivo realizar uma investigação retrospectiva de casos de leptospirose em pacientes com suspeita clínica de dengue no município de São Paulo.

Do total de 14.171 de soro sanguíneo coletadas de pacientes com suspeita clínica de dengue a investigação de infecção leptospírica, será realizada em 4.000 amostras IgM-Dengue e 361 amostras NS1 que foram negativas para a infecção viral.

O diagnóstico sorológico será realizado pelas técnicas de Soroaglutinação Microscópica- MAT e Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA IgM. As 361 amostras NS1 disponíveis serão processadas pela técnica de real-time PCR para detecção direta de leptospirosas patogênicas. Os casos confirmados de leptospirose serão submetidos à uma análise espacial, que incluirá o georeferenciamento dos casos e análise de cluster. Dados serão obtidos pelo Sistema Matrix cujo acesso é permitido aos profissionais do LABZOO. Este sistema também será utilizado para verificar os laudos dos pacientes e confirmar se estes atendem aos critérios de inclusão

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Investigar a ocorrência de casos de leptospirose em pacientes com suspeita clínica de dengue e que não tiveram confirmação da infecção viral, atendidos no município de São Paulo, Brasil.

**Objetivo Secundário:**

**Endereço:** Rua Gomes de Carvalho, 250 sala 15

**Bairro:** Vila Olímpia

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 04.547-001

**Telefone:** (11)3848-4815

**E-mail:** smscep@gmail.com



SECRETARIA MUNICIPAL DA  
SAÚDE DE SÃO PAULO -  
SMS/SP



Continuação do Parecer: 4.817.802

- Realizar o diagnóstico molecular e sorológico de leptospirose utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR) e o teste ELISA em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue cujo diagnóstico laboratorial foi negativo;
- Avaliar a ocorrência da leptospirose no município de São Paulo sua importância como diagnóstico diferencial de dengue;
- Identificar os sorogrupos predominantes por meio da técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT);
- Investigar se existem casos de leptospirose que não foram notificados e calcular a incidência da doença junto aos dados do SINAN;
- Investigar se existe associação entre o diagnóstico positivo de leptospirose e as variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes;
- Determinar a distribuição geográfica e a concentração espacial dos casos positivos para leptospirose.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Foram adequadamente analisados riscos e benefícios da pesquisa.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

-

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

-

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

-

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Para início da coleta dos dados, o pesquisador deverá se apresentar na mesma instância que autorizou a realização do estudo (Coordenadoria, Supervisão, SMS/Gab, etc).

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

Apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento.

Manter o arquivo da pesquisa sob sua guarda, contendo fichas individuais e todos os demais

Endereço: Rua Gomes de Carvalho, 250 sala 15

Bairro: Vila Olímpia

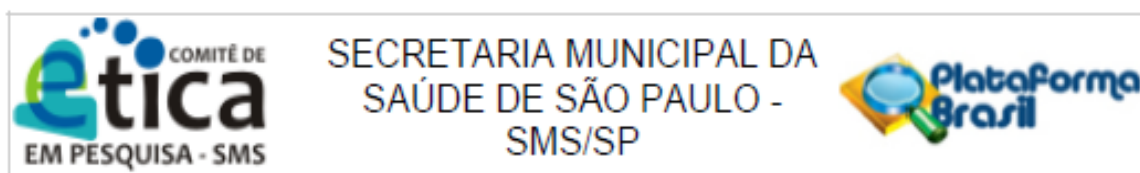
UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 04.547-001

Telefone: (11)3846-4815

E-mail: smscep@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.817.802

documentos recomendados pelo CEP, por 5 anos;

Justificar perante o CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

De acordo com a Res. CNS 466/12, o pesquisador deve apresentar os relatórios parciais e final através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído. Encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1782210 E1.pdf	29/06/2021 16:38:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PEDIDO_DISPENSA_TCLE.pdf	14/10/2020 23:19:55	MARCOS BRYAN HEINEMANN	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Respostas_pendencias_parecer_CEP.pdf	14/10/2020 23:17:48	MARCOS BRYAN HEINEMANN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Lepto_Dengue_FMVZ_LABZOC.pdf	14/10/2020 23:15:27	MARCOS BRYAN HEINEMANN	Aceito
Declaração de concordância	Autorizacao_prefeitura_sp_CCZ.pdf	14/10/2020 20:12:49	MARCOS BRYAN HEINEMANN	Aceito
Outros	termo_anuencia_trabalho_lepto.pdf	07/08/2020 10:00:31	MARCOS BRYAN HEINEMANN	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_Plataforma_Brasil_Marcos Bryan.pdf	07/08/2020 09:42:11	MARCOS BRYAN HEINEMANN	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 30 de Junho de 2021

Assinado por:  
SIMONE MONGELLI DE FANTINI  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gomes de Carvalho, 250 sala 15

Bairro: Vila Olímpia

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 04.547-001

Telefone: (11)3846-4815

E-mail: smscep@gmail.com

## ANEXO B - parecer pedido de autorização para realização de projeto de pesquisa



## PARECER PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA

A Comissão de Pesquisa da Universidade Santo Amaro, após análise, aprovou o projeto: **"E quando não é dengue? Estimativa do subdiagnóstico de leptospirose e redefinição de áreas de risco usando amostras de pacientes com suspeita de dengue atendidos na rede de saúde municipal de São Paulo"** do(a) pesquisador(a): Rejane Cristina Lucco.

Esta autorização da Comissão de Pesquisa não substitui e/ou dispensa a obrigatoriedade de análise ética, quando pertinente. Desse modo, os projetos envolvendo seres humanos devem ser analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UNISA antes de seu início, bem como os projetos que farão uso de modelo animal devem ser analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UNISA.

Vale ressaltar que o pesquisador se compromete a entregar relatório parcial e final das atividades de pesquisa, bem como o anexo do projeto finalizado.

Caso o relatório não seja entregue, o pesquisador será submetido às sanções previstas nas Normas para Atividades de Pesquisa e Regimento Geral da UNISA.

**Número de Protocolo da Aprovação do Registro da Pesquisa: 181/2023**

Atenciosamente,

São Paulo, 03 de agosto de 2023.

Prof. Dra. Ana Paula Ribeiro  
Coordenação de Pesquisa  
Universidade Santo Amaro – UNISA

Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula Ribeiro

Diretora de Pesquisa e Internacionalização da Universidade de Santo Amaro