

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS FEBRIS AGUDAS NO
TRIÂNGULO MINEIRO: LEPTOSPIROSE E FEBRE MACULOSA

MARIANI BORGES FRANCO

UBERLÂNDIA

2024

MARIANI BORGES FRANCO

**INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS FEBRIS AGUDAS NO
TRIÂNGULO MINEIRO: LEPTOSPIROSE E FEBRE MACULOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Dr. Stefan Vilges de Oliveira

UBERLÂNDIA

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F825
2024

Franco, Mariani Borges, 1984-
Inquérito soroepidemiológico de doenças febris agudas
no Triângulo Mineiro: leptospirose e febre maculosa
[recurso eletrônico] / Mariani Borges Franco. - 2024.

Orientador: Stefan Vilges de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.147>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Oliveira, Stefan Vilges de, 81
-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Acadêmico

Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 11 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8628 - www.ppcs.famed.ufu.br - ppcs@famed.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 06/PPGCSAUDE				
Data:	22.02.2024	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	16:00h
Matrícula do Discente:	12212CSD004				
Nome do Discente:	Mariani Borges Franco				
Título do Trabalho:	INQUERITO SOROEPIDEMIOLOGICO DE DOENÇAS FEBRIS AGUDAS NO TRIANGULO MINEIRO: LEPTOSPIROSE E FEBRE MACULOSA				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	1: Epidemiologia da Ocorrência de Doenças e Agravos à Saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ecoepidemiologia De Zoonoses				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Microsoft Teams, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Cláudio Manuel Rodrigues (Fundação Oswaldo Cruz), Glênio Alves de Freitas (UFU) e Stefan Vilges de Oliveira (UFU) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Stefan Vilges de Oliveira, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do

público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta

foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente

ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Stefan Vilges de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/02/2024, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Manuel Rodrigues, Usuário Externo**, em 22/02/2024, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glênio Alves Freitas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2024, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5206019** e o código CRC **E2A3ABA6**.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariani Borges Franco

**Inquérito soroepidemiológico de doenças febris agudas no Triângulo Mineiro:
leptospirose e febre maculosa**

Presidente da banca: Prof. Dr. Stefan Vilges de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de concentração: Ciências da Saúde

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Glênio Alves de Freitas

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Prof. Dr. Cláudio Manuel Rodrigues

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz

Suplente: Dra. Letícia Martins Okada

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Suplente: Dra. Cinthia Domingos Barbosa

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida e por me dar sustentação para vivê-la.

Aos meus familiares, pelo apoio direto ou indiretamente durante toda minha vida.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida de tantos anos de aprendizado.

Ao professor e orientador Dr. Stefan Vilges de Oliveira, pelo apoio nesta caminhada e pelos ensinamentos. Obrigada pela confiança e paciência que sempre demonstrou comigo.

Ao Dr. Glênio Alves de Freitas e Dr. Cláudio Manuel Rodrigues pela disponibilidade e contribuição crítica e construtiva neste trabalho que desempenharam um papel fundamental em seu aprimoramento.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, pela disponibilização de recursos, seus professores e funcionários, pelo apoio e compreensão durante todo este período.

À Coordenação Geral de Laboratórios do Ministério da Saúde, por ter disponibilizado o teste rápido imunocromatográfico para leptospirose.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia Dr. Mário Endsfeldz Camargo – LIPME da Universidade Federal de Uberlândia, pela disponibilização das amostras de soro sanguíneo humano.

Ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas – LADOC, vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, por viabilizar as análises de microaglutinação para leptospirose (MAT).

Ao Laboratório de Ixodologia - LABIX, vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, por viabilizar as RIFIs para *Rickettsias* sp.

RESUMO

Introdução: O correto diagnóstico de diversas doenças febris agudas representa um verdadeiro desafio para profissionais de saúde. Há uma tendência para a busca do diagnóstico de doenças endêmicas mais incidentes na região e outras de menor incidência deixam de ser pesquisadas, podendo assim, ocorrer subnotificações daquelas menos frequentes, como leptospirose e febre maculosa, ocasionando prejuízos ao sistema de vigilância em saúde. **Objetivos:** Realizar um inquérito soroepidemiológico para anticorpos anti-leptospira e anti-*Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* a partir de casos suspeitos de dengue com sorologia não reagente. **Material e métodos:** Para realização das análises sorológicas para leptospirose, foram selecionadas 449 amostras de soro de pacientes que apresentavam resultados negativos para dengue, no ano de 2019, com os sintomas clínicos: febre, cefaleia, mialgia e náuseas. Foi utilizado o teste rápido para triagem qualitativa de anticorpos IgM específicos para leptospira (*Dual Path Platform - DPP Leptospirose - Fiocruz*), e para os reativos foi realizada análise de aglutinação microscópica (*Microscopic agglutination test - MAT*). Para análises de *Rickettsia* sp., foram selecionadas 152 amostras de soro sanguíneo também não reativos para dengue e que se enquadravam nos seguintes critérios: tempo de coleta maior ou igual a 14 dias, pacientes domiciliados em zonas rurais e periurbanas e profissionais com atividades laborais com maior risco de exposição. As amostras foram analisadas por ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) avaliando títulos de IgG. **Resultados:** Das amostras analisadas com o DPP Leptospirose, 26 foram reativas (5,79%). No MAT, nove amostras (17,31%) foram reagentes, sendo que seis também apresentaram reatividade no DPP Leptospirose. Em relação às análises para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, 29 amostras (19,08%) apresentaram reatividade na diluição 1:64 para agentes rickettsiais. As amostras reativas na diluição 1:64, para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, representaram, respectivamente 13,16% e 5,92% do total das amostras analisadas. **Conclusão:** Os resultados encontrados neste estudo demonstraram reatividade para leptospirosas e agentes rickettsiais em pacientes que eram suspeitos de dengue, mas que apresentaram diagnóstico laboratorial negativo para essa arbovirose endêmica na região. Tais achados chamam a atenção para subnotificação de doenças febris agudas de menor incidência na referida área e alertam para a necessidade de um diagnóstico sindrômico que inclua essas patologias.

Palavras-chave: Doença Febril Aguda, Zoonose, Dengue, *Rickettsia*, *Leptospira*.

ABSTRACT

Introduction: The correct diagnosis of several acute febrile illnesses represents a real challenge for healthcare professionals. There is a tendency to focus on diagnosing endemic diseases in the region, while less prevalent ones may go uninvestigated, potentially leading to underreporting of the less prevalent diseases, such as leptospirosis and spotted fever, causing setbacks to the health surveillance system. **Objectives:** To conduct a seroepidemiological survey for anti-leptospira, anti-*Rickettsia rickettsii*, and *Rickettsia parkeri* antibodies based on suspected dengue cases with non-reactive serology. **Material and methods:** For the serological analyses of leptospirosis, 449 serum samples were selected from patients with negative results for dengue in 2019, presenting clinical symptoms such as fever, headache, myalgia, and nausea. A rapid test was used for qualitative screening of specific IgM antibodies for *Leptospira* (Dual Path Platform - DPP Leptospirosis - Fiocruz), and reactive samples underwent microscopic agglutination test (MAT) analysis. For *Rickettsia* sp. analyses, 152 serum samples were selected that were also non-reactive for dengue and met the following criteria: collection time equal to or greater than 14 days, patients residing in rural and peri-urban areas, and professionals with occupational activities at higher risk of exposure. The samples were analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA). **Results:** Among the samples analyzed with DPP Leptospirosis, 26 tested positive (5.79%). In MAT, nine samples (17.31%) were reactive, with six of them also showing reactivity in DPP Leptospirosis. Regarding the analyses for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, 29 samples (19.08%) showed reactivity at the 1:64 dilution for either of the analyzed strains. The samples reactive at the 1:64 dilution for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* represented 13.16% and 5.92%, respectively, of the total samples analyzed. **Conclusion:** The results found in this study showed reactivity for leptospires and rickettsial agents in patients who were suspected of dengue but who presented a negative laboratory diagnosis for this endemic arbovirus in the region. Such findings draw attention to the underreporting of acute febrile illnesses with a lower incidence in that area, and alert to the need for a syndromic diagnosis that includes these pathologies.

Keywords: Acute Febrile Illness, Zoonosis, Dengue, *Rickettsia*, *Leptospira*.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Table 1 – Sociodemographic characteristics of suspected dengue patients whose samples were reactive in serological tests for the diagnosis of leptospirosis, Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil, 2019..... 43
- Table 2 – Table 2. Results of serology tests for the diagnosis of leptospirosis in nine suspected dengue patients, Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil, 2019..... 44

Artigo 2

- Table 1 – Sociodemographic characteristics of patients subjected to *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* serological analyzes..... 64
- Table 2 – Sociodemographic characteristics of patients with clinical suspicion of dengue, whose samples were reactive in serological tests for the diagnosis of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil, 2019..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DENV	Vírus da dengue
DFA	Doença Febril Aguda
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa do Brasil
IFA	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LACENs	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LENA	<i>Leptospiral endostatin-like protein A</i>
LIGB B	<i>Leptospira immunoglobulin-like protein B</i>
LIPL32	Lipoproteína L32
LIPME	Laboratório de Imunoparasitologia Dr. Mário Endsfeldz Camargo
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i>
OMPL1	<i>Outer membrane protein L1</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
rOmp	<i>Rickettsia Outer Membrane Protein</i>
TR- DPP	Teste Rápido <i>Dual Path Platform</i>
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 VIGILÂNCIA SINDRÔMICA.....	13
2.2 DENGUE	15
2.2.1 Agente etiológico e vetores.....	15
2.2.2 Transmissão e patogênese.....	16
2.2.3 Diagnóstico laboratorial	17
2.2.4 Aspectos epidemiológicos.....	18
2.3 LEPTOSPIROSE	19
2.3.1 Agente etiológico e reservatórios	19
2.3.2 Transmissão e patogênese.....	21
2.3.3 Diagnóstico laboratorial	22
2.3.4 Aspectos epidemiológicos.....	24
2.4 FEBRE MACULOSA.....	25
2.4.1 Agente etiológico e vetores.....	25
2.4.2 Transmissão e patogênese.....	27
2.4.3 Diagnóstico laboratorial	28
2.4.4 Aspectos epidemiológicos.....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
Artigo 1. “Underreporting of human leptospirosis cases in cities of Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil”. Submetido à revista PLOS Neglected Tropical Diseases no dia 14/09/2023.	33
Artigo 2. “Seroepidemiological survey for the investigation of <i>Rickettsia rickettsii</i> and <i>Rickettsia parkeri</i> in cities of the Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil” . .	56
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A febre é um sintoma comum e característico de diversas doenças infecciosas e não infecciosas, fazendo com que o correto diagnóstico de sua etiologia represente um desafio para profissionais e programas de promoção à saúde, seja pela inespecificidade de sintomas ou por indisponibilidade de testes diagnósticos nas unidades de atendimento, podendo ocorrer notificações de doenças e agravos indevidos e/ou equivocados, além de subnotificações perante o sistema de vigilância em saúde (Moreira *et al.*, 2018).

A identificação precoce do agente patológico de uma determinada doença ou agravo é de suma importância para que o sistema de vigilância seja eficiente. Como estratégia, o sistema de vigilância utiliza a vigilância sindrômica, que consiste na detecção de um conjunto de manifestações clínicas comuns a um determinado número de doenças, como nas doenças febris agudas (DFA). É, portanto, útil para identificar oportunamente um maior número de casos e, assim, instituir rapidamente medidas de prevenção e controle ou mitigação dos danos à saúde. A dengue, leptospirose e febre maculosa são DFAs que estão no escopo da Vigilância Epidemiológica e são de notificação compulsória ao Ministério da Saúde (Henning, 2004), apresentando em comum sinais e sintomas clínicos como febre, cefaleia, mialgia, exantema e vômitos principalmente no início do curso clínico que podem dificultar o correto e oportuno diagnóstico e consequente tratamento.

O vírus da dengue (DENV) é transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti* e metade da população mundial vive em países endêmicos para esta virose (Furtado *et al.*, 2019). Os sinais e sintomas podem ser leves e inespecíficos, com duração de 3 a 7 dias, sendo a febre de início abrupto o principal, associada à cefaleia, adinamia, mialgia, artralgia e dor retro orbitária. O exantema está presente em 50% dos casos. Manifestações gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia podem estar presentes. A doença pode evoluir para a fase crítica e mais grave (Brasil, 2016). Em regiões endêmicas para a dengue, há uma tendência em se pensar nesta patologia como provável diagnóstico, subestimando-se a ocorrência de outras DFAs como leptospirose e febre maculosa (Del Valle-Mendoza *et al.*, 2021).

A leptospirose é uma doença infecciosa febril de início abrupto, causada pela bactéria *Leptospira* sp. As leptospiras são um grupo de bactérias espiraladas pertencentes à ordem Spirochaetales, que possuem uma grande diversidade genética, sendo classificadas com base em diferenças antigênicas presentes na sua superfície celular, os sorovares (Rajapakse, 2022).

A leptospirose apresenta quadro clínico variando desde sintomatologias leves e/ou inaparentes até formas mais graves. É transmitida por animais sinantrópicos, sendo os roedores

os principais transmissores. Estes animais podem albergar leptospiras nos rins e passam a liberá-las na urina para o meio ambiente, contaminando água, solo e alimentos (Brasil, 2022). O homem pode adquirir leptospirose por contato direto com um animal infectado ou por contato indireto com o meio ambiente, como solo e água contaminada com fluidos corporais (especialmente urina) de animais infectados, onde as leptospiras penetram em mucosas e na pele (Samrot *et al.*, 2021).

Após um período de incubação de 5 a 14 dias, em média, podem começar a aparecer sintomas como febre, cefaleia, mialgia, fadiga, náuseas e vômitos, denominada fase leptospirêmica. A doença pode evoluir para a fase tardia com manifestações graves, forma chamada de síndrome de Weil (Costa *et al.*, 2015). Devido à semelhança de sinais clínicos na fase inicial da doença (leptospirêmica), a leptospirose é difícil de ser diferenciada de outras DFAs como a febre maculosa (OMS, 2003; de Brito, 2018).

As doenças transmitidas por carrapatos também representam um desafio crescente para a saúde pública no Brasil, assim como em outros países. Entre os agentes causadores dessas enfermidades, destacam-se as bactérias intracelulares obrigatórias do gênero *Rickettsia*, pertencentes à família *Rickettsiaceae*, incluindo *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, duas espécies de *Rickettsias* associadas a quadros clínicos da febre maculosa (FM), DFA transmitida aos seres humanos (Martiniano *et al.*, 2021). *R. rickettsii* é o agente etiológico da febre maculosa brasileira, doença potencialmente grave que pode resultar em sintomas severos, incluindo febre alta, erupções cutâneas e disfunção de múltiplos órgãos, com rápida progressão e uma taxa de letalidade maior que 50% em algumas regiões quando não tratada precocemente. *R. parkeri*, por outro lado, está associada à febre maculosa mais branda, principalmente relacionada à cepa Mata Atlântica no Brasil. Ambas as riquetsioses são transmitidas por carrapatos e são endêmicas em várias regiões do Brasil, representando desafios contínuos para a saúde pública e a pesquisa epidemiológica (Labruna, 2009; Szabó; Pinter; Labruna, 2013).

Os carrapatos vetores das *Rickettsias* no Brasil desempenham um papel crucial na transmissão desses microrganismos para os hospedeiros vertebrados, incluindo seres humanos. No Brasil, os principais vetores associados à febre maculosa causada por *Rickettsia rickettsii* são as espécies do gênero *Amblyomma*, como o carrapato-estrela (carrapato do cavalo e da capivara), o *Amblyomma sculptum* (Costa *et al.*, 2017) e o carrapato *Amblyomma aureolatum* (que geralmente parasita cães), com ocorrências no bioma da Mata Atlântica, principalmente no estado de São Paulo (Binder *et al.*, 2021). Esses carrapatos são ectoparasitas que se alimentam de uma variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis. Eles têm uma

ecologia complexa, muitas vezes associada a ambientes rurais e silvestres, onde a interação entre carrapatos, hospedeiros e Rickettsias ocorre (Labruna, 2009).

O presente estudo tem como objetivo verificar a presença de anticorpos anti-*Leptospira* sp. e anti-*Rickettsia* em pacientes com DFA encaminhados para realização de diagnóstico de dengue e que apresentaram sorologia negativa. O trabalho pode elucidar possíveis casos ou indicar contatos prévios com os agentes causadores da leptospirose humana e febre maculosa na região. Tais casos podem estar sendo subnotificados na região em virtude da falta de suspeição e triagem laboratorial para essas patologias. A região do Triângulo Mineiro é uma área endêmica para a dengue e, normalmente, os pacientes podem ser encaminhados para triagem desse agente, deixando de ser testados para outros possíveis agentes menos incidentes, como as Leptospiras e Rickettsias patogênicas. Estudos que busquem avaliar amostras negativas de dengue podem apoiar o entendimento da prevalência, dinâmica da doença e frequência de outras DFAs subdiagnosticadas, auxiliando no planejamento e implementação de políticas públicas locais adequadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VIGILÂNCIA SINDRÔMICA

A vigilância em saúde, além de monitorar o estado de saúde da população, considera o desenvolvimento e implementação de políticas de saúde pública que visem a promoção de ambientes seguros e saudáveis. O sistema de vigilância é baseado em relatórios gerados pelas unidades de saúde, que geram dados sobre notificações relativas a determinadas doenças. Este processo pode levar vários dias, o que pode significar inefetividade diante da ocorrência de surtos ou epidemias. Além disso, requer do profissional responsável pela notificação o preenchimento de uma ficha de investigação com inúmeras questões, demandando bastante tempo e dedicação. Contudo, na maior parte das vezes, os casos notificados são os mais graves clinicamente, o que descaracteriza o processo de “vigilância” como uma ação preventiva. Deste modo, este modelo estimula à subnotificação dos agravos de interesse, preenchimento inadequado das fichas de notificação e descrição equivocada das reais condições de saúde pública (Mourão *et al.*, 2012).

A vigilância sindrômica é uma estratégia da vigilância epidemiológica. Representa um método de vigilância proposto pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) e visa a detecção precoce de agravos, a monitorização do padrão de doenças e baseia-se na identificação de um conjunto de sinais e sintomas comuns a muitas doenças, a partir de fontes como: prontuários médicos e dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e posterior aplicação em uma ampla abordagem diagnóstica, com o objetivo de captar um maior número de casos, de forma oportuna, contribuindo para a adoção precoce e precisa de medidas de controle (Brasil, 2009). Este modelo pode apresentar efetividade na identificação etiológica quando associado a um adequado suporte laboratorial (Fortaleza *et al.*, 2009). Sistemas de vigilância sindrômica buscam dados de saúde existentes a fim de viabilizar análises precoces, informando-as aos responsáveis pela investigação, além de possibilitar o acompanhamento de potenciais surtos (Henning, 2004).

O Ministério da Saúde vem incentivando a consolidação de atividades conjuntas da vigilância epidemiológica convencional e da vigilância sindrômica para promover a descentralização das ações de controle das doenças infecciosas, buscando a implantação do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, capacitado para o diagnóstico das principais endemias e monitoração das doenças emergentes e reemergentes (Mourão *et al.*, 2012).

Sugere-se, então, a abordagem sindrômica, com o objetivo de orientar um diagnóstico laboratorial, conduta clínica e terapêutica diante de doenças cujos sinais e sintomas são inicialmente indistinguíveis. A identificação precoce de uma síndrome clínica, e não da doença ou do agravo específico, pode facilitar o papel do profissional de saúde e agilizar o processo de informação (Sosin, 2003). Dessa forma, a vigilância sindrômica pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico e controle de DFAs, ajudando a identificar surtos, rastrear padrões de sintomas e melhorar a resposta das autoridades de saúde pública. Isso é importante para proteger a saúde da população e limitar a disseminação de doenças.

As DFAs são frequentes na prática clínica e responsáveis, em grande parte, pela procura de atendimentos médicos. São inespecíficas e pertinentes a diversos agravos, fazendo com que o correto diagnóstico de sua etiologia represente um desafio para profissionais e programas de promoção à saúde. Muitos casos acabam sem definição e notificação (Monteiro; Rozental; Lemos, 2014; Moreira *et al.*, 2018).

A identificação precoce do agente patológico de uma determinada doença ou agravo é de suma importância para que o sistema de vigilância consiga ser eficiente. Diversas DFAs são de origem zoonótica, transmitidas por mosquitos, carrapatos e roedores e associadas a exposições ambientais. A confirmação de casos se dá com o apoio laboratorial a partir de testes específicos que dão suporte para a investigação médica (Da Silva; Evangelista, 2010). Muitas destas doenças são emergentes e apresentam baixa incidência sobre a população, o que faz com que seus registros sejam subestimados pela ausência da suspeita clínica e notificação (Fortaleza *et al.*, 2009). No Brasil, uma das principais DFAs são as arboviroses (dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela), leptospirose, hantavirose, febre amarela, riquetsioses, leishmaniose e febre Q (Brasil, 2020).

2.2 DENGUE

2.2.1 Agente etiológico e vetores

A dengue é transmitida por um arbovírus. Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são vírus que compartilham a característica de serem transmitidos por artrópodes, em sua maioria mosquitos hematófagos, durante o repasto sanguíneo. Os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais transmissores dos vírus da dengue.

No Brasil, existe um grande número de arbovírus já identificados e alguns fatores proporcionam um ambiente favorável para o desenvolvimento e circulação de vetores, como os mosquitos do gênero *Aedes*: extensão territorial, presença de florestas tropicais e ecossistemas naturais. O mosquito *A. aegypti* se alimenta principalmente durante o dia e tem comportamento de repouso em ambientes fechados. Geralmente, é encontrado em áreas urbanas e se reproduz em recipientes artificiais de água, como caixas de armazenamento de plástico e pneus de borracha. Variáveis climáticas como temperatura, precipitação e umidade relativa têm um impacto significativo na presença e tamanho da população desses vetores artrópodes (Khan *et al.*, 2023).

O vírus da dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Existem quatro sorotipos diferentes (DENV1-4). É um vírus pequeno e esférico, envelopado, com simetria icosaédrica e possui diâmetro de aproximadamente 50 nm. Seu genoma é composto por uma única cadeia de RNA (*ribonucleic acid*) que codifica proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E), além de oito proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS2K, NS4B e NS5. A glicoproteína estrutural E é responsável pelo reconhecimento celular e pela promoção da entrada do vírus nas células hospedeiras, enquanto as proteínas não estruturais (NS) auxiliam na replicação do genoma viral (Salles *et al.*, 2018).

Devido a mutações do vírus, a gravidade da infecção varia ao longo do tempo, onde diferentes genótipos foram descritos. A infecção por cada sorotipo confere imunidade para o sorotipo causador, mas não para os outros sorotipos. Pelo contrário, a reinfeção com um sorotipo diferente causa doença grave. Em uma determinada região, surtos periódicos ocorrem devido a diferentes sorotipos ao longo de décadas, impossibilitando a imunidade coletiva completa para todos os quatro sorotipos na comunidade. Assim, a doença pode persistir sem eliminação natural (Kularatne; Dalugama, 2022).

2.2.2 Transmissão e patogênese

A transmissão do vírus da dengue ao ser humano ocorre pela picada de fêmeas infectadas da espécie *Aedes aegypti*. Após a picada, as primeiras células a serem infectadas pelo vírus são possivelmente as células da pele, ocorrendo a replicação inicial e, posteriormente, migração para os linfonodos. Os vírus aparecem na corrente sanguínea (viremia) durante a fase febril aguda, geralmente após três a cinco dias (Lopes *et al.*, 2014).

Durante a fase febril, os sinais e sintomas são leves e inespecíficos, não complicados, com duração de 3 a 7 dias, incluindo febre, geralmente acima de 38°C, de início abrupto, cefaleia, astenia, mialgia, artralgia e dor retro-orbitária. Podem aparecer ainda anorexia, náuseas, vômitos e diarreia. O exantema está presente em 50% dos casos, sendo predominantemente do tipo maculopapular, atingindo face, tronco e membros, regiões palmares e plantares, com ou sem prurido. Após a fase febril, grande parte dos pacientes recupera-se gradativamente (Brasil, 2022).

Da corrente sanguínea, os vírus são disseminados a órgãos como fígado, baço, nódulos linfáticos e medula óssea, podendo atingir o pulmão, coração e trato gastrointestinal, e evoluir para formas mais graves. Na fase crítica, que tem início entre o terceiro e o sétimo dia de doença, aparecem os sinais de alarme, marcando o início da piora clínica. Os sinais de alarme são: dor abdominal intensa (referida ou à palpação) e contínua, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural, derrame pericárdico), hipotensão postural e/ou lipotímia, letargia e/ou irritabilidade, hepatomegalia e sangramentos de mucosa. Esses sinais são resultantes do aumento da permeabilidade capilar. Sem o correto manejo nessa fase, alguns pacientes podem ir a óbito (Brasil, 2022; Lopes *et al.*, 2014).

A dengue é uma infecção autolimitada, assim como grande parte das infecções virais. No entanto, a maioria dos pacientes se recupera sem complicações, o que é chamado de febre da dengue (FD). Por outro lado, a febre hemorrágica da dengue (FHD) é a forma grave, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, levando ao vazamento plasmático e tendência hemorrágica. O aumento da permeabilidade vascular envolve o vazamento de plasma para os espaços peritoneais, cavidade pleural e planos teciduais. Isso provavelmente ocorre devido a uma resposta imunológica anormal (Kularatne; Dalugama, 2022).

A patogenia dos sintomas da dengue não é bem esclarecida, no entanto, sabe-se que a liberação de citocinas e interferon desempenha um papel importante devido à ativação de linfócitos e infecção de células dendríticas e macrófagos. A liberação de interferon pode estar intimamente relacionada à queda na contagem de plaquetas devido à supressão da atividade da

medula óssea, gerando as petéquias espalhadas pelo corpo. A resposta imunológica anormal resulta em aumento da permeabilidade microvascular sem inflamação ou vasculite, levando a uma regulação trombogênica alterada (Khan *et al.*, 2023).

Uma infecção por um único sorotipo pode resultar em imunidade permanente para esse sorotipo e fornecer proteção cruzada de curto prazo contra outros sorotipos. No entanto, foi relatado que a infecção heterotípica secundária pelo DENV tem uma alta probabilidade de causar a dengue grave, incluindo FHD. Além disso, doenças como hipertensão e diabetes foram correlacionadas com maior gravidade da dengue (Khan *et al.*, 2023).

A dengue pode se apresentar nas fases iniciais da doença como uma febre leve e indiferenciada, semelhante a uma “gripe” ou a outras DFAs. Alguns pacientes com baixa imunidade podem rapidamente progredir de uma doença leve para uma condição grave e até mesmo para a morte. Portanto, o diagnóstico laboratorial precoce para o vírus da dengue é benéfico e pode salvar vidas, principalmente para aqueles com baixa imunidade, além de ser importante para a caracterização epidemiológica e implementação de medidas de prevenção e controle pelos sistemas de vigilância em saúde.

2.2.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico da dengue pode ser difícil, dependendo da fase da infecção em que o paciente se encontra. Além disso, dependendo da região onde reside, pode haver vários patógenos causadores de doenças ou estados patológicos que podem imitar o espectro de doenças causado pela infecção por dengue. Para o diagnóstico laboratorial de dengue podem ser utilizados os métodos diretos, que buscam a presença do vírus no organismo e incluem o isolamento viral por inoculação em células e pesquisa de genoma do vírus por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), ou os métodos indiretos, que investigam os anticorpos e/ou antígenos produzidos em resposta à infecção pelo vírus, incluindo o ensaio imunoenzimático ELISA IgM e IgG, e pesquisa de antígeno NS1 (Brasil, 2022).

Durante a fase aguda da dengue o antígeno de NS1, é encontrado circulando no soro de pacientes em concentrações detectáveis por métodos imunológicos, ele é considerado um marcador de infecção antes do aparecimento de anticorpos das classes IgM e IgG, permitindo detecção precoce do vírus. A detecção específica do vírus da dengue ainda durante a fase inicial (até 5 dias após o início dos sintomas) pode ser realizada por análise molecular como a RT-PCR, que detecta o RNA viral e permite a diferenciação de outras infecções transmitidas pelo mesmo vetor (chikungunya e zika); é um método sensível, preciso e ágil. Os anticorpos IgM

podem ser detectados através do ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) que deve ser solicitado a partir do sexto dia do início dos sintomas. Os níveis de anticorpos da classe IgM alcançam seu pico dentro de duas semanas (Brasil, 2022). Na maioria dos casos, somente uma amostra de soro é necessária para a confirmação diagnóstica, que deve ser coletada a partir do sexto dia de início dos sintomas. No entanto, um resultado negativo não exclui o diagnóstico, pois os níveis de IgM podem não ser detectáveis pelo teste, sendo necessária a solicitação de uma segunda amostra para esclarecimento do diagnóstico (Khan et al., 2023; Salles et al., 2018).

A fase de convalescença da dengue é o período que se inicia mais de 7 dias após o início dos sintomas. Os anticorpos IgG devem ser identificados em níveis mais elevados, mesmo que os anticorpos IgM ainda estejam frequentemente presentes durante essa fase. Na fase de convalescença, o ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgG é utilizado para a detecção tardia do DENV (Khan *et al.*, 2023).

O diagnóstico diferencial da dengue é bastante amplo e varia de acordo com a fase da doença. Durante a fase febril, o quadro clínico é semelhante ao de infecções virais comuns, como COVID-19, influenza, adenovírus, sarampo, rubéola, infecções por enterovírus e infecções bacterianas como leptospirose, infecções por riquetsias e febre tifoide. Portanto, é necessário realizar uma anamnese detalhada, incluindo histórico de viagens a áreas endêmicas de dengue, histórico de contato e evolução dos sintomas, para um diagnóstico preciso (Kularatne; Dalugama, 2022).

É considerado caso confirmado de dengue por critério laboratorial aquele que apresentou algum dos seguintes testes laboratoriais: NS1 reagente, isolamento viral positivo, RT-PCR detectável (até o quinto dia de início dos sintomas da doença) e detecção de anticorpos IgM ELISA (a partir do sexto dia de início dos sintomas da doença) (Brasil, 2022).

2.2.4 Aspectos epidemiológicos

A dengue é considerada a mais importante das doenças causadas por arbovírus, pois metade da população mundial vive em países endêmicos para esta virose (Furtado *et al.*, 2019). É a arbovirose urbana mais prevalente nas Américas, incluindo o Brasil, sendo uma importante suspeita em pacientes que apresentam quadro febril agudo. Sua ocorrência é ampla, atingindo principalmente os países tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas e ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação dos vetores. Mais de 100 países são afetados

pelo vírus da dengue em todo o mundo a cada ano, havendo um alto risco de infecção, com aproximadamente 3,6 milhões de pessoas vivendo nesses países (Khan *et al.*, 2023).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue é o arbovírus com o maior número de casos na região das Américas, com epidemias ocorrendo a cada três a cinco anos. Em 2022, 2.811.433 casos de dengue foram notificados nessa região, sendo esse o terceiro ano com o maior número de casos na série histórica, ficando atrás apenas de 2016 e 2019, quando houve maior número de casos (Salles *et al.*, 2018).

A primeira referência à dengue no Brasil ocorreu durante o período colonial, descrito na cidade do Recife em 1685. Sete anos depois, em Salvador, uma epidemia de dengue resultou em 2000 mortes. O surto de dengue em 1846 também foi considerado uma epidemia, atingindo vários estados, como Rio de Janeiro e São Paulo. Entre 1846 e 1916, São Paulo foi atingida por diversas epidemias de dengue. No início do século 20, Oswaldo Cruz implementou um programa de controle de mosquitos que durou muitos anos. O mosquito transmissor, *Aedes aegypti*, foi erradicado no Brasil na década de 1950, mas retornou na década de 1980, persistindo até os dias atuais (Salles *et al.*, 2018).

De acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 2010 a 2019, foram notificados 9.559.582 casos de dengue no Brasil. No ano de 2019, especificamente, o Brasil registrou 1.544.987 casos, com 782 mortes, sendo que os estados com maior número de casos foram Minas Gerais, São Paulo e Goiás (Brasil, 2022). No período de 2015 a 2020, foram contabilizadas 809.601 notificações de casos de dengue no estado de Minas Gerais, caracterizando-o com perfil endêmico-epidêmico para dengue. A região estudada no Triângulo Mineiro confirmou 90.238 casos notificados entre os anos de 2019 a 2023 e 79 óbitos confirmados (Menezes *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2022; Moura *et al.*, 2022).

A dengue tem caráter sazonal, sendo influenciada por períodos de elevada temperatura, além de processos de urbanização não planejados. Esses fatores e, também, especificidades de sintomas iniciais são critérios comuns a outras DFAs, como a febre maculosa e a leptospirose.

2.3 LEPTOSPIROSE

2.3.1 Agente etiológico e reservatórios

A leptospirose é transmitida através da urina de animais sinantrópicos, contaminados pela bactéria do gênero *Leptospira*. Os principais agentes transmissores são os roedores das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato-

preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita). O *R. norvegicus* é o principal portador do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, um dos mais patogênicos para o homem. Outros reservatórios são caninos, suínos, bovinos, equinos, ovinos e caprinos. Além dos roedores, a presença de leptospiros em animais silvestres foi identificada em *Xenarthras* (tamanduá, tatu e preguiça), carnívoros e primatas, os quais podem atuar como fonte de infecção e potenciais disseminadores de *Leptospira* spp. O ser humano é apenas hospedeiro acidental e terminal dentro da cadeia de transmissão (Bharti *et al.*, 2003).

Leptospiros são espiroquetas aeróbias de vida livre de formato helicoidal, extremamente finas e alongadas, medindo de 6-20 µm de comprimento, com diâmetro aproximado de 0,1 µm. Apresentam extremidades em forma de gancho. Devido à presença de dois flagelos periplasmáticos, podem se movimentar. A membrana celular externa das leptospiros é composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) e uma parede celular externa de peptidoglicano (Evangelista; Coburn, 2010; Fraga; Barbosa; Isaac, 2011). As principais proteínas de membranas encontradas e que desencadeiam virulência à leptospira são: LipL32 (Lipoproteína L32), OmpL1 (*Outer membrane protein L1*), LigB (*Leptospira immunoglobulin-like protein B*) e LenA (*Leptospiral endostatin-like protein A*) (Adler; Moctezuma, 2010).

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae* da ordem Spirochaetales e possui várias espécies. Sorologicamente, as espécies desse gênero podem ser classificadas em sorovares. Nesta classificação, avalia-se a resposta imunológica através de uma reação de aglutinação contra diversos LPS que estão ancorados na membrana externa das bactérias de diferentes espécies, permitindo agrupar as leptospiros patogênicas em 24 sorogrupos e mais de 300 sorovares pela reação de aglutinação microscópica (MAT, *Microscopic Agglutination Test*). Esta variedade antigênica deve-se à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS. A classificação em sorovar é muito útil nos estudos epidemiológicos (Adler; Moctezuma, 2010).

Os principais sorovares associados a bovinos são o Hardjo, Pomona, Grippotyphosa, Canicola e *Icterohaemorrhagiae*. Cães albergam, predominantemente, os sorovares Pomona, Grippotyphosa, Canicola e *Icterohaemorrhagiae*. Os suínos estão associados aos sorovares Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Canicola, Tarassovi e *Icterohaemorrhagiae*. Os ratos são hospedeiros dos sorovares *Icterohaemorrhagiae* e Balum. Hardjo, Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Canicola, Tarassovi e *Icterohaemorrhagiae* estão principalmente em ovelhas e cabras (Pinto *et al.*, 2022).

Esses animais domésticos e também os animais sinantrópicos e selvagens infectados podem atuar como reservatórios de leptospiros e eliminá-las através da urina durante meses,

anos ou por toda a vida, dependendo da espécie animal e do sorovar envolvido, transmitindo assim a leptospirose para o homem.

2.3.2 Transmissão e patogênese

A infecção humana resulta, principalmente, da exposição direta ou indireta à urina de animais infectados. A penetração do microrganismo ocorre através da pele e mucosas com presença de lesões e/ou pele íntegra imersa por longos períodos em água contaminada com urina. Embora menos comum, a transmissão também pode ocorrer por contato com sangue, tecidos e órgãos de animais infectados, transmissão acidental em laboratórios e ingestão de água ou alimentos contaminados (Brasil, 2022; Godoi *et al.*, 2005). Após atingirem o sistema linfático e sanguíneo, as bactérias colonizam determinados órgãos como rins e fígado. Após a fase de penetração e disseminação, que dura em torno de 7 dias, os sintomas começam a surgir.

Os sintomas podem variar desde formas assintomáticas e subclínicas até quadros clínicos graves. O quadro clínico pode ser dividido em duas fases: fase precoce ou fase leptospirêmica e fase tardia ou fase imune. A primeira caracteriza-se por: febre, cefaleia, mialgia, anorexia, náuseas e vômitos. Diarreia, artralgia, hiperemia conjuntival e tosse também são sintomas que podem ser descritos pelos pacientes com leptospirose. Ainda, 10% a 20% dos pacientes apresentam eritema macular, papular, urticariforme ou purpúrico no tronco ou região pré-tibial. Hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia podem estar presentes em alguns pacientes durante a fase leptospirêmica. Esta fase tende a ser autolimitada e regredir entre três e sete dias. Devido à sobreposição de sintomas com diversas doenças febris agudas, a leptospirose nessa fase pode não ser diferenciada dessas DFAs. É importante notar a existência de alguns sinais e sintomas que podem ajudar a diferenciar a fase precoce da leptospirose de outras causas de doenças febris agudas, como a presença de sufusão conjuntival, que é um achado bastante característico da leptospirose, e intensa mialgia, principalmente na região lombar e nas panturrilhas. A evolução para a fase tardia ocorre em aproximadamente 15% dos pacientes, com manifestação clássica da síndrome de Weil, caracterizada pela tríade de icterícia, insuficiência renal e hemorragia, mais comumente pulmonar. Quando ocorre comprometimento pulmonar, a taxa de letalidade é maior que 50%. A insuficiência renal aguda, miocardite, pancreatite, anemia e distúrbios neurológicos como confusão, delírio, alucinações e sinais de irritação meníngea são complicações que podem ocorrer na fase tardia da leptospirose (Brasil, 2022).

Acredita-se que a patogenia da leptospirose esteja relacionada à capacidade de adesão das leptospiras às proteínas da matriz extracelular, como colágenos I e IV, laminina e fibronectina (Atzingen *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2016), e também por serem capazes de escapar dos mecanismos de imunidade do hospedeiro, como o sistema fagocitário e sistema complemento (Samrot *et al.*, 2021).

Anteriormente relacionada aos garimpos, atividades de mineração e similares, hoje é sabe-se que vários animais selvagens e domésticos podem albergar o agente causador da leptospirose, estendendo o risco ocupacional, podendo infectar também profissionais de serviços de água e esgoto, agricultores, tratadores de animais, trabalhadores de matadouros, comerciantes de animais de estimação, veterinários, caçadores, coletores de lixo, criadores de gado e praticantes de atividades recreativas em águas, como os esportes aquáticos (Hartskeerl; Collares-Pereira; Ellis, 2011). Fatores socioeconômicos e ambientais, tais como condições precárias de moradia, falta de água potável, enchentes e contato próximo com roedores e animais domésticos, aumentam o risco de contaminação (Levett, 2014). No entanto, a suscetibilidade é geral e a imunidade adquirida após uma infecção é sorovar-específica, podendo um mesmo indivíduo apresentar a doença mais de uma vez se o agente etiológico de cada episódio pertencer a um sorovar diferente (Brasil, 2022).

Devido à alta letalidade da leptospirose, o diagnóstico desempenha um papel fundamental na prevenção e tratamento eficaz desta doença que é potencialmente grave. Identificar a leptospirose de forma ágil permite a administração oportuna de tratamento antibiótico. Além disso, é crucial para implementar medidas de controle da doença, como a identificação da fonte de infecção e a prevenção de surtos em comunidades expostas, contribuindo para a saúde pública e o bem-estar geral das populações afetadas.

2.3.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas, baseadas na detecção direta ou indireta da *Leptospira*. O método a ser utilizado depende da fase evolutiva em que se encontra o paciente. Na fase precoce da doença, as leptospiras podem ser visualizadas no sangue por meio de exames diretos. Por sua vez, na fase tardia, os métodos indiretos são prioritariamente escolhidos.

As análises sorológicas são métodos indiretos, baseados na detecção de anticorpos específicos produzidos contra vários antígenos de leptospiras e são mais comumente empregados, uma vez que o crescimento e isolamento das bactérias são métodos bastante

complexos e lentos. Os mais utilizados são o ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e a microaglutinação (MAT). Esses exames devem ser realizados pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) (Brasil, 2021).

O MAT detecta a imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) produzidas contra LPS das leptospiros patogênicas de diferentes sorovares. A técnica envolve o uso de culturas bacterianas vivas; é realizada incubando o soro do paciente com diversos sorovares de leptospira. Este ensaio é considerado o padrão ouro para todos os métodos de diagnóstico, devido à sua alta sensibilidade e capacidade de detectar anticorpos específicos do grupo. São considerados positivos os casos que apresentarem um aumento de quatro vezes ou mais nos títulos da MAT, entre duas amostras sanguíneas coletadas com intervalo de aproximadamente 14 dias após o início dos sintomas e máximo de 60 dias entre elas. Ainda são considerados positivos os casos em que não há disponibilidade de duas ou mais amostras e que apresentem um título maior ou igual a 1: 800 (Brasil, 2021; Samrot *et al.*, 2021).

Em estágios iniciais da doença, quando os anticorpos contra as leptospiros geralmente ainda não estão presentes ou estão em níveis extremamente baixos, pode-se optar pelo uso de outras técnicas de diagnóstico, como o ELISA anti-IgM. A IgM pode ser detectada entre 4 e 5 dias a partir do início dos sintomas e sua detecção persiste por pelo menos 5 meses. A reação ELISA-IgM não reagente em amostra sanguínea coletada a partir do sétimo dia de início de sintomas pode ser usada, segundo o Ministério da Saúde, para descartar um caso suspeito. Já para a confirmação, seu resultado reativo deve estar associado também à soroconversão na MAT com duas amostras, como primeira amostra (fase aguda) não reagente e segunda amostra (14 dias após a data de início dos sintomas com máximo de até 60 dias) com título maior ou igual a 1: 200 (Brasil, 2021; Budihal; Perwez, 2014; Rosa *et al.*, 2017).

Os ensaios imunocromatográficos (testes rápidos) possuem boa sensibilidade e especificidade. Podem ser realizados à beira do leito, não exigem equipamentos sofisticados ou mão de obra altamente treinada e os resultados são obtidos em minutos. A MAT e o ELISA-IgM foram comparados quanto à sua especificidade e sensibilidade, no entanto, sua sensibilidade geral não ultrapassou 80%. Portanto, o resultado não pode ser aceito sem confirmação por um teste de referência, como o MAT. Os testes rápidos imunocromatográficos podem desempenhar um papel importante na previsão de alertas de surto, uma vez que são aplicáveis para coletar certos dados epidemiológicos relativos a uma região específica, o que é necessário para prever, prevenir e intervir precocemente em surtos (Pinto *et al.*, 2022).

Os testes diretos se baseiam na presença de leptospira em fluidos corporais, como sangue, soro, urina e líquido cefalorraquidiano. O teste mais comumente utilizado é a Reação

em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), pela qual ocorre a amplificação e identificação do conteúdo de DNA da leptospira em amostras biológicas durante as fases iniciais da doença. Durante a leptospirose aguda, o título de anticorpos pode não ser suficientemente alto para um diagnóstico sorológico preciso. Melhorias e avanço nas técnicas de PCR podem incrementar e facilitar os testes de rotina para leptospirose, como a *real-time* PCR (RT-PCR), que permite análise em larga escala devido a sistemas de detecção de sequência em alta velocidade (Pinto *et al.*, 2022).

É importante ainda realizar o diagnóstico diferencial para algumas patologias, incluindo a dengue, influenza (síndrome gripal), malária, riquetsioses, doença de Chagas aguda, toxoplasmose, febre tifoide, entre outras. Durante a fase tardia, para as hepatites virais agudas, hantavirose, febre amarela, malária grave, dengue grave, endocardite, riquetsioses, doença de Chagas aguda, pneumonias, pielonefrite aguda, apendicite aguda, sepse, meningites, colangite, colecistite aguda, esteatose aguda da gravidez, síndrome hepatorenal, síndrome hemolítico-urêmica, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras (Brasil, 2021). A leptospirose é uma doença endêmica, com alta taxa de letalidade que acomete milhares de pessoas no Brasil e no mundo.

2.3.4 Aspectos epidemiológicos

Os fatores envolvidos com a distribuição e propagação da leptospirose são complexos e envolvem diversos determinantes de sua prevalência, incidência e distribuição geográfica. No entanto, é uma doença global que afeta regiões em todo o mundo. Foi descrita pela primeira vez pelo médico Adolf Weil em 1886 na Alemanha, após observar casos na cidade de Heidelberg. Os pacientes apresentavam febre, icterícia, aumento do baço, insuficiência renal e conjuntivite. Weil relatou que essa doença estaria associada a ocupações ao ar livre, onde as pessoas afetadas haviam entrado em contato com água. Assim, a forma grave da leptospirose foi denominada “doença de Weil” (Rajapakse, 2022). No Brasil, a leptospirose foi descrita pela primeira vez em 1917 por Henrique de Beaurepaire Rohan Aragão, médico e pesquisador brasileiro. Aragão demonstrou a presença da bactéria em ratos, chamando atenção para a existência dessa enfermidade no país (Levett, 2001).

A leptospirose apresenta maior incidência em áreas tropicais e subtropicais. Taxas mais elevadas estão ligadas a países em desenvolvimento, com condições socioeconômicas mais precárias e sistemas de saneamento ainda inadequados. As regiões com maior prevalência de leptospirose no mundo são: África Subsaariana, partes do sudeste asiático, Caribe, partes da América Latina e Oceania (Bharti *et al.*, 2003).

É uma doença de grande impacto na saúde pública, com aproximadamente um milhão de casos confirmados e 59.000 mortes por ano em todo o mundo (Costa *et al.*, 2015). No Brasil, a leptospirose humana é endêmica, sendo considerada epidêmica nos períodos chuvosos. Dados coletados entre o ano de 2010 até março de 2023 pelo Ministério da Saúde relatam 44.937 casos de leptospirose confirmados e 3.992 óbitos em todo o Brasil, sendo que as regiões mais afetadas foram as regiões Sul e Sudeste. A região Centro-Oeste, por sua vez, apresenta baixos índices de casos reportados. Estudo descritivo realizado entre 2010 e 2019 evidenciou que, em relação à incidência média da leptospirose no Brasil, oito estados se destacaram: Rondônia, Acre, Amapá, Pernambuco, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em relação ao sexo, o predomínio foi de homens brancos e pardos com baixo nível de escolaridade. A ocorrência dos casos foi principalmente em região urbana e o contágio domiciliar. Em relação ao acesso aos serviços de saúde, diagnóstico e tratamento, prevaleceu o diagnóstico clínico laboratorial, com a maioria dos casos evoluindo para a cura (Magalhães; Mendes; Melo, 2021). No Sudeste do Brasil, particularmente no estado de Minas Gerais, 1937 casos foram confirmados; destes, 183 pessoas vieram a óbito. A região estudada no Triângulo Mineiro recebeu no período de 2019 a 2023, 170 notificações (Brasil, 2023).

Vale ressaltar que os principais sintomas relatados pelos pacientes com casos confirmados de leptospirose são os mesmos apresentados por pacientes com outras doenças febris agudas. Portanto, os serviços de atendimento médico devem estar sempre atentos e suspeitar de leptospirose também diante desses sintomas (Fornazari *et al.*, 2020).

2.4 FEBRE MACULOSA

2.4.1 Agente etiológico e vetores

A febre maculosa (FM) é uma doença causada por bactérias do gênero *Rickettsia*. As rickettsias pertencem à classe Alfabroteobactérias, um grupo de organismos grande e metabolicamente diverso de bactérias gram-negativas em que, a ordem *Rickettsiales* compreende três famílias: *Holosporaceae*, *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae*, sendo que a *Rickettsia* spp., agente causador da FM, está agrupada neste último. São bactérias intracelulares obrigatórias de plantas, amebas, artrópodes, anelídeos, vertebrados e outros organismos. As Rickettsias têm, geralmente, 0,8 a 2 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de diâmetro, possuem parede celular composta por peptidoglicano e lipopolissacarídeos (LPS), podem aparecer isoladas, em pares, em forma de cadeia curta, filamentosas ou em cocos, e contêm tanto DNA

quanto RNA. A parede celular é constituída por peptidoglicano que contém ácido murâmico e ácido diaminopimélico. A maioria dos vertebrados que abrigam a *Rickettsia* são hospedeiros secundários que adquiriram essas bactérias através de artrópodes hematófagos (Gillespie *et al.*, 2008).

A febre maculosa brasileira (FMB) é transmitida especificamente por carrapatos infectados com as bactérias *Rickettsia rickettsii*. Carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios pertencentes à ordem Acari e classe Arachnida, estão presentes em variados ecossistemas e em todos os continentes do globo, exceto no continente Antártico. Parasitam diversos hospedeiros vertebrados, particularmente mamíferos e aves, mas também podem ser encontrados em anfíbios e répteis. São o segundo principal grupo de agentes vetores de importância médica e veterinária, permanecendo atrás apenas dos culicídeos (mosquitos, pernilongos e muriçocas) (Massard; Fonseca, 2004). Em geral, as fêmeas dos carrapatos realizam hematofagia em algum momento do seu ciclo de vida e, para esse fim, se fixam a hospedeiros vertebrados por períodos variados de alguns minutos a diversos dias. A hematofagia é o processo pelo qual os carrapatos transmitem patógenos para o hospedeiro, e a saliva secretada é o veículo pela qual os patógenos são inoculados nos hospedeiros (Hovius, 2009).

A *Rickettsia rickettsii* é transmitida aos seres humanos principalmente por carrapatos do gênero *Amblyomma*, tais como *A. sculptum* (*A. cajennense*) e *A. aureolatum* (Labruna 2009; Labruna; Mattar, 2011). Outras espécies com envolvimento provável ou potencial são: *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma triste* e *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Fornazari *et al.*, 2020; Martiniano *et al.*, 2021). Entretanto, qualquer espécie de carrapato pode ser um potencial reservatório de riquetsias. Ressalta-se que os carrapatos permanecem infectados durante toda a vida, em geral de 18 a 36 meses (Pinter *et al.*, 2013).

Até o início dos anos 2000, *R. rickettsii* era a única espécie riquetsial em carrapatos conhecida no Brasil (Labruna, 2009). Durante as últimas décadas, oito espécies foram relatadas no país, mas apenas a bactéria *R. parkeri* foi caracterizada como patogênica para humanos (Nieri-Bastos *et al.*, 2018). Esta foi identificada pela primeira vez em 1937, mas somente em 2002 foi reconhecida como patogênica para seres humanos. No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 2006, isolada do carrapato *Amblyomma triste* colhido em área rural do estado de São Paulo, confirmado por isolamento em cultivo celular e biologia molecular (Martins; Martins, 2014).

Os principais hospedeiros dos carrapatos transmissores de riquetsias patogênicas são os equinos, bovinos, antas e capivaras, mas podem ser detectados infestando animais domésticos

como cães, gatos, coelhos e cabras. Os equídeos, roedores, como a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), e marsupiais, como o gambá (*Didelphis* sp.), têm importante participação no ciclo de transmissão da febre maculosa. Estudos recentes apontam o envolvimento desses animais como amplificadores de riquetsias, assim como transportadores de carrapatos potencialmente infectados (Pinter *et al.*, 2013).

2.4.2 Transmissão e patogênese

Nos humanos, a FM é adquirida pela picada do carrapato infectado com riquetsias, e a transmissão geralmente ocorre quando o artrópode permanece aderido ao hospedeiro. Outros carrapatos se alimentam do sangue desses animais, adquirindo a bactéria durante o processo de alimentação. Posteriormente, esses carrapatos infectados podem transmitir a bactéria a outros animais ou seres humanos (Brasil, 2022). Em humanos, o momento do repasto sanguíneo requer um período mínimo de parasitismo de 10 minutos, embora possa se estender por mais de 10 horas (Saraiva *et al.*, 2014). A ingestão de tecidos ou fluidos de carrapatos infectados, transfusão sanguínea ou, mais raramente, inalação de aerossol contaminado são outras formas de transmissão da bactéria (Brasil, 2022).

A disseminação no organismo no hospedeiro ocorre por via linfática e hematogênica para tecidos de diferentes órgãos, incluindo pele, músculos esqueléticos, cérebro, pulmões, coração, rins, baço, fígado e segmentos do trato gastrointestinal. As bactérias ligam-se aos receptores das células endoteliais desses órgãos e tecidos por meio da proteína rOmp (*rickettsial outer-membrane protein*) e induzem a endocitose. Quando endocitadas em fagolisossomos, as bactérias migram para o citoplasma celular e multiplicam-se até a destruição das células hospedeiras. A FM causa vasculite de vasos de pequeno e médio calibres do organismo, pois as bactérias têm tropismo pelas células endoteliais dos vasos dos mamíferos hospedeiros. Portanto, as lesões cutâneas resultam da proliferação de riquetsias no endotélio dos pequenos vasos, levando à formação de trombos, hemorragia, infiltração perivascular e necroses (Greca *et al.*, 2008).

Após um período de incubação que varia entre 2 e 14 dias, com média de 7 dias após a picada do carrapato, os indivíduos apresentam como manifestação clínica inicial febre elevada e de início súbito, associada a cefaleia intensa holocraniana, mialgia, artralgia, prostração, náusea, vômitos e exantema. O exantema pode surgir após o terceiro dia de evolução, normalmente observado a partir do quinto dia após o início dos sintomas. Acomete inicialmente as extremidades do corpo como: punhos e tornozelos, palmas das mãos e planta dos pés, e

depois dissemina-se para outras partes do corpo. Está presente em 50% a 80% dos pacientes. Embora seja o sinal clínico mais importante, o exantema pode estar ausente, o que pode dificultar e/ou retardar o diagnóstico e o tratamento, determinando uma maior letalidade (Brasil, 2022). Febre, cefaleia e exantema são reconhecidos como a “tríade clínica clássica” da FM. Contudo, sua ocorrência é variável e o surgimento de cada um pode ocorrer em diferentes momentos, ou mesmo não estar presente em alguns casos. Em quadros clínicos mais graves, o exantema vai se transformando em petequial e, depois, em hemorrágico, podendo evoluir para necrose, principalmente em extremidades. Apresentam ainda insuficiência renal oligúrica, insuficiência respiratória, manifestações neurológicas, hemorragias (epistaxe, gengivorragia, hematúria, enterorragia, hemoptise e em sistema nervoso central), icterícia, arritmias cardíacas e alterações hemodinâmicas (hipotensão e choque). Todavia, por ser uma doença sistêmica, a febre maculosa pode apresentar um curso clínico variável, desde quadros clássicos a formas atípicas sem exantema (Angerami *et al.*, 2021).

A doença causada por *R. parkeri* apresenta características diferentes dos casos onde a espécie *R. rickettsii* é o agente causal, apresentando normalmente uma sintomatologia mais branda, sem relatos de óbitos. Normalmente, o quadro clínico é caracterizado por dor de cabeça, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, linfadenopatia regional, escara de inoculação, febre com temperatura geralmente inferior a 40°C, mal-estar, diarreia, náuseas e vômitos (Paddock *et al.*, 2004; Sangioni *et al.*, 2011).

Em virtude da sintomatologia extremamente inespecífica, o diagnóstico precoce torna-se difícil, podendo ser confundido com diversas outras doenças febris agudas e também exantemáticas, muitas vezes mais prevalentes como leptospirose, dengue, hepatite viral, salmonelose, encefalite, malária e também pneumonia. Devido ao risco de gravidades e complicações envolvidas na patogenia da FM, muitas vezes o tratamento precisa ser iniciado antes do diagnóstico laboratorial confirmatório. Para isso, deve-se considerar os sintomas, mesmo que inespecíficos e, principalmente, as características epidemiológicas que possibilitem a exposição do paciente à picada de carrapatos de áreas endêmicas (Angerami *et al.*, 2009).

2.4.3 Diagnóstico laboratorial

Segundo o Ministério da Saúde, os testes laboratoriais mais indicados para diagnóstico específico da FM são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a qual detecta anticorpos contra a bactéria, exame de imunohistoquímica para a detecção da bactéria em amostras de tecido obtidas a partir de biópsia de lesões de pele e técnicas de biologia molecular (reação em

cadeia da polimerase - PCR), realizada a partir de amostras de sangue e tecido de biópsia (Brasil, 2022, Brasil 2023).

A RIFI é um método sorológico utilizado para identificar e quantificar anticorpos produzidos pelo paciente quando infectados por *Rickettsia* sp. É considerado “padrão ouro” para o diagnóstico das riquetsioses. A técnica é realizada através de lâminas contendo orifícios impregnados com antígenos (frações antigênicas purificadas ou organismos inteiros) do próprio agente etiológico que se busca o diagnóstico. Os anticorpos, quando presentes no soro do paciente, reagem com os antígenos de superfície do microrganismo. A detecção da reação é realizada através de anticorpos humanos marcados com fluoresceína (conjugado fluorescente). Existem conjugados comerciais que detectam classes específicas de anticorpos IgG e IgM. Vale ressaltar que anticorpos IgM podem apresentar reação cruzada com outras doenças, portanto, devem ser analisados com critério. Por sua vez, os anticorpos do tipo IgG são mais específicos (Biggs *et al.*, 2016; CDC, 2006).

Apesar da RIFI ser uma metodologia sensível, deve-se considerar que existe uma janela imunológica em que os títulos de anticorpos não são detectáveis. Esse período pode variar entre o dia da picada do carrapato infectado até aproximadamente 7 a 10 dias após o surgimento dos primeiros sintomas. Por isso, é recomendada a coleta pareada das amostras de soro com intervalo de 15 a 21 dias. A confirmação do diagnóstico sorológico para FM ocorre quando são detectados anticorpos específicos no soro dos pacientes que, com a evolução da doença, aumentam em título. Para tanto, é necessário que a primeira amostra de soro seja coletada nos primeiros dias da doença (fase aguda) e a segunda amostra após 15 dias da coleta da primeira amostra e ocorra visualização de soroconversão (elevação da diluição da primeira para a segunda amostra). A primeira amostra não é processada isoladamente, pois, na maioria dos casos, os resultados são negativos ou títulos baixos. Nessa fase precoce, a sorologia possui baixo valor preditivo, os resultados negativos não excluem a doença, pois os anticorpos específicos são ainda indetectáveis (Gava; Braga; Langoni, 2022).

O diagnóstico também pode ser realizado por meio de pesquisa direta das *Rickettsias*, através da técnica de imunohistoquímica, baseada na interação entre anticorpos específicos e proteínas de interesse em amostras de tecido, permitindo a visualização e identificação dessas proteínas dentro de um contexto histológico. A imunohistoquímica para diagnóstico de FM é realizada em amostras de tecido obtidas em biópsia de lesões de pele de pacientes infectados, em especial os graves, ou em material de necropsia, como fragmentos de pulmão, fígado, baço, coração, músculos e cérebro. A imunohistoquímica em lesões vasculares de pele é considerada como o método mais sensível para a confirmação de FM na fase inicial da doença (Brasil, 2019).

A reação em cadeia de polimerase (PCR), técnica de biologia molecular, também pode ser utilizada para o diagnóstico da FM, sendo realizada em amostras de sangue, tecido de biópsia ou de necropsia. Apesar de ser um método rápido, não possui um padrão específico, e a sensibilidade e a especificidade diagnóstica podem variar entre os testes. As técnicas de biologia molecular possibilitam melhor e mais adequada caracterização dos dois grupos de riquetsias. O resultado do isolamento é conclusivo quando positivo, entretanto, quando negativo, tem baixo valor diagnóstico, pois uma série de fatores pode interferir no processo, apresentando um resultado falso-negativo como: uso de antibiótico antes da coleta, condições de esterilidade na coleta e armazenamento da amostra sob -60°C a -80°C (Gava; Braga; Langoni, 2022).

Contudo, na prática clínica, os testes laboratoriais atualmente disponíveis ainda não proporcionam resultados específicos de modo ágil e capazes de subsidiar as decisões iniciais acerca da indicação do tratamento específico para FM em pacientes com quadros febris agudos. Tendo em vista o potencial de rápida progressão para formas graves e o risco de óbito em caso de tratamento tardio, ressalta-se que o início do tratamento antimicrobiano apropriado para FM deve ser fundamentado na avaliação conjunta do quadro clínico e dos antecedentes epidemiológicos de risco para parasitismo.

2.4.4 Aspectos epidemiológicos

A febre maculosa ocorre em países ocidentais como nos Estados Unidos, Canadá, México, América Central e em partes da América do Sul como Brasil, Bolívia, Argentina, Uruguai e Colômbia. Os primeiros relatos da FM foram registrados no início do século XX, nos Estados Unidos, recebendo o nome de “Febre Maculosa das Montanhas Rochosas”, devido à sua grande incidência nos estados americanos cortados pela cadeia das Montanhas Rochosas. Howard Taylor Ricketts foi o primeiro a isolar *R. rickettsii*, elucidando importantes aspectos da enfermidade, como a participação de carrapatos em sua transmissão e dependência de hospedeiros silvestres para o ciclo de transmissão. No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1900, pelo Dr. Adolfo Lutz, sendo posteriormente descritos casos da infecção em humanos em São Paulo, e, logo depois, descrita em Minas Gerais e no Rio de Janeiro e denominada de “tifo exantemático”. A partir da década de 1980, a doença se tornou importante problema de saúde no Brasil (Gava; Braga; Langoni, 2002).

Sua ocorrência encontra-se diretamente relacionada à presença e distribuição geográfica dos carrapatos vetores, das variáveis ecológicas e da abundância de hospedeiros

animais envolvidos no ciclo das riquetsias na natureza. Merece atenção o fato de que a FM se notabiliza por uma crescente urbanização, o que torna necessário o reconhecimento dos comportamentos humanos de risco em áreas de perigo para nortear atitudes preventivas (Nasser *et al.*, 2015).

Após a FM ser incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde, pela Portaria GM/MS nº 1.943, de 18 de outubro de 2001, casos de febre maculosa brasileira passaram a ser notificados em vários estados do país, incluindo Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Santa Catarina. A *R. rickettsii*, considerada a bactéria mais patogênica das espécies, é registrada no Sudeste do país, onde ocorreu a grande maioria dos casos fatais (Oliveira *et al.*, 2016).

No geral, a FM ocorre principalmente no sudeste e norte da região Sul, bem como em áreas antropizadas dos biomas Cerrado e Mata Atlântica. A FM causada pela *R. parkeri* foi registrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, no Bioma Mata Atlântica. O cenário epidemiológico envolve a presença do principal vetor, *Amblyomma ovale*, comprovado ser o agente causal de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (Martiniano, 2021).

O Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde, de 2007 a maio de 2023, confirma 2652 casos de febre maculosa no Brasil e 854 óbitos. No Brasil, as taxas de mortalidade são altas em função das dificuldades do diagnóstico e em estabelecer a terapia apropriada, relacionadas ao pouco conhecimento sobre a doença e à sintomatologia pouco específica. Em Minas Gerais, nesse período, foram registrados 435 casos confirmados e mais de 130 óbitos. A região do Triângulo Mineiro até então é considerada uma área sem ocorrência de casos humanos (Nunes *et al.*, 2022). A febre maculosa causada por *R. parkeri* ocorre predominantemente em áreas de Mata Atlântica nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, onde a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica é o agente etiológico, associado, principalmente, ao carrapato *Amblyomma ovale* como vetor competente (SINAN, 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um inquérito soropidemiológico para anticorpos anti-leptospira e anti-*Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* a partir de casos suspeitos de dengue com sorologia não reagente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Identificar pacientes com anticorpos anti-leptospira e descrever o perfil clínico e epidemiológico destes pacientes;
- ii) Analisar a frequência de pacientes com sorologia negativa para dengue que tiveram contato com a bactéria *Leptospira*;
- iii) Reconhecer a necessidade de um diagnóstico clínico e epidemiológico sindrômico para detecção de leptospirose;
- iv) Avaliar o preenchimento da ficha de notificação em relação a completude, para os casos suspeitos de dengue por parte dos profissionais de saúde;
- v) Identificar pacientes com anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* e descrever o perfil clínico e epidemiológico destes pacientes;
- vi) Analisar a frequência de pacientes com sorologia negativa para dengue que tiveram contato com agentes rickettsiais;
- vii) Reconhecer a necessidade de um diagnóstico clínico e epidemiológico sindrômico para detecção de FM;

Artigo 1. “Underreporting of human leptospirosis cases in cities of Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil”. Submetido à revista PLOS Neglected Tropical Diseases no dia 14/09/2023.

1 **Underreporting of human leptospirosis cases in cities of Triângulo**

2 **Mineiro, Minas Gerais, Brazil**

3
4 Mariani Borges Franco¹, Lara Reis Gomes², Cristina Rostkowska³, Ana Cláudia
5 Arantes Marquez Pajuaba³, José Roberto Mineo³, Anna Monteiro Correia Lima²,
6 Stefan Vilges de Oliveira^{1,4*}

7
8 ¹Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Uberlândia,
9 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

10 ²Laboratory of Contagious Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine,
11 Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

12 ³Laboratory of Immunoparasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal
13 University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

14 ⁴Department of Collective Health, Faculty of Medicine, Federal University of
15 Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

16
17 Current Address: Department of Collective Health, Faculty of Medicine, Federal
18 University of Uberlândia. Avenida Pará, 1720, Campus Umuarama, Block 2U,
19 Room 8, Umuarama, CEP 38405320. Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

20
21 *Corresponding author

22 E-mail: stefan@ufu.br

23

24

25 **Abstract**

26 **Background:** Leptospirosis is an infectious disease caused by the pathogenic
27 spirochetes of the genus *Leptospira* through direct or indirect contact with
28 infected animals. It presents a clinical picture ranging from mild or inapparent
29 symptoms to more severe forms. Due to the similarity of clinical signs in the early
30 stages, leptospirosis is often difficult to distinguish from other common acute
31 febrile illnesses, such as dengue. Thus, this study aimed to investigate the
32 prevalence of leptospirosis in suspected dengue patients whose serological
33 diagnosis was negative. **Methods:** For the serological testing for leptospirosis,
34 we selected 449 serum samples from patients who had a negative IgM-ELISA for
35 dengue, in 2019, with the following clinical symptoms: fever, headache, myalgia,
36 and nausea. The Dual-Path Platform (DPP) rapid test was used for qualitative
37 screening of specific IgM antibodies anti *Leptospira* in blood serum, and the
38 microscopic agglutination test (MAT) was performed for the positive samples in
39 DPP. **Results:** The data obtained from the samples analyzed with the DPP assay
40 showed 26 positive results (5.79%), of which 38.46% were male and 61.54%
41 female, with a mean age of 41 years. We tested 52 samples using the MAT,
42 including 26 reactive for IgM and 26 non-reactive in the DPP assay. Nine samples
43 (17.31%) were reactive, and among them, six also showed reactivity in the DPP
44 assay. Of the six samples reactive in both tests, 66.67% were female, living in
45 urban areas in the city of Uberlândia, with a mean age of 50 years, being 50%
46 White, 33.33% Brown, and 16.67% Black. **Conclusion:** The findings revealed
47 that leptospirosis cases are underreported in the studied region and deserve
48 attention from healthcare services, especially in countries with a high incidence
49 of dengue.

50 **Author Summary**

51 Leptospirosis is an infectious disease caused by *Leptospira* spp. and primarily
52 transmitted through the urine of infected rats. The bacteria can penetrate through
53 intact skin and mucous membranes, causing human health implications. Due to
54 the similarity of clinical signs in the early stages of the infection, it is often difficult
55 to differentiate leptospirosis from other acute febrile illnesses, such as dengue.
56 This study aimed to investigate the incidence of leptospirosis in suspected
57 dengue patients whose serological diagnosis was negative. We analyzed 449
58 blood serum samples using specific assays for leptospirosis detection. Our
59 findings showed that 5.79% of the individuals had clinical signs of leptospirosis
60 and showed positive results for *Leptospira* spp. in at least one of the tests
61 performed, thus suggesting underreporting of the disease. Healthcare
62 professionals should raise awareness on leptospirosis and accurately identify the
63 causative etiological agent of acute febrile illness, as the disease can manifest
64 with mild and/or asymptomatic symptoms to more severe forms, which can be
65 fatal, thereby justifying the importance of early diagnosis to initiate treatment.

66

67 **Introduction**

68 Leptospire are a group of spiral-shaped bacteria within the order
69 Spirochaetales, which cause leptospirosis, an acute febrile illness of sudden
70 onset. Leptospire have a great genetic diversity and can be classified based on
71 antigenic differences on their cell surface (serovars). Of the genus *Leptospira*, 10
72 (ten) pathogenic species are known with more than 300 serovars [4]. Different
73 serovars are associated with different hosts and environments. Some groups,

74 such as Icterohaemorrhagiae serogroup, are associated with rodents and can
75 cause leptospirosis in humans [1].

76 Leptospirosis has a clinical spectrum ranging from mild or asymptomatic
77 symptoms to more severe forms. The infection is an important global cause of
78 acute fever and a leading cause of morbidity among zoonotic diseases,
79 transmitted by domestic and wild synanthropic animals, with rodents being the
80 principal disseminators. Other reservoir hosts include dogs, pigs, cattle, horses,
81 sheep, and goats. These animals can harbor leptospire in their kidneys and
82 excrete them via urine into the environment, contaminating water, soil, and food
83 [2].

84 Leptospirosis are primarily transmitted to humans through direct contact
85 with an infected animal or indirect contact with the environment, such as soil and
86 water contaminated with body fluids (especially urine) of infected animals, where
87 leptospire can penetrate intact skin and mucous membranes. Less commonly,
88 contamination can occur through contact with infected animals' blood, tissues,
89 and organs, or by ingesting leptospiral-contaminated water or food [3].

90 After an incubation period of 5 to 14 days, symptoms such as fever,
91 headache, myalgia, fatigue, nausea, and vomiting may appear, known as the
92 leptospiremic phase. The disease can progress to the late stage with severe and,
93 sometimes, fatal manifestations in approximately 15% of patients. The severe
94 form, recognized as Weil's syndrome, is characterized by jaundice, renal failure,
95 and hemorrhage. This highlights the importance of early diagnosis to initiate
96 treatment since the progression to severe form has a high fatality rate. In Brazil,
97 an annual average of over 3,600 cases and 375 deaths has been confirmed [4].
98 Due to the similarity of clinical signs in the early stage of leptospiral infection,

99 leptospirosis is difficult to distinguish from other acute febrile illnesses, including
100 yellow fever, viral hepatitis, and dengue [5,6,7].

101 Dengue is the most prevalent arthropod-borne viral disease in Brazil. The
102 dengue virus (DENV) is transmitted through the bite of the *Aedes aegypti*
103 mosquito. The period of highest transmission occurs during the rainiest months
104 in each region. According to the Brazilian Ministry of Health, 1,544,987 cases
105 were notified in 2019, with 782 deaths. Minas Gerais, São Paulo, and Goiás were
106 the states with the highest number of cases [8].

107 The differential diagnosis of leptospirosis and dengue remains a major
108 challenge for medical care and surveillance programs. As both diseases have
109 similar clinical profiles and seasonal onset, dengue (the disease with higher
110 incidence) is often considered the most probable diagnosis in patients with acute
111 febrile illness in endemic areas, which may underestimate leptospirosis burden
112 [9].

113 Thus, this study aimed to investigate the presence of anti-*Leptospira* spp.
114 antibodies in patients with acute febrile illness referred for dengue diagnosis who
115 tested negative serologically.

116

117 **Materials and Methods**

118 We analyzed epidemiological data from 4,124 patients referred to the
119 Laboratory of Immunoparasitology Dr. Mário Endsfieldz Camargo (LIPME) at the
120 Federal University of Uberlândia for dengue diagnostic testing in the year 2019.
121 Through convenience sampling, 1,856 aliquots of blood serum were selected,
122 with negative results for dengue, based on the results of the Dengue IgM Capture
123 ELISA (PanBio™, Abbott, St. Ingbert, Germany). Among these, 449 samples

124 were subjected to serological analysis for leptospirosis due to specific
125 symptomatology.

126 No patient recruitment was conducted, relying solely on previously
127 recorded secondary data in the institution's database. All collected information
128 was identified using an internal control number. We organized the
129 epidemiological data available at LIPME for analysis and sample selection. The
130 data were collected through an epidemiological record completed by healthcare
131 professionals: municipality, area of residence, age, sex, race, skin color,
132 occupation, education level, the onset date of symptoms, collection date. Clinical
133 data comprised signs and symptoms of fever, myalgia, headache, rash, vomiting,
134 nausea, back pain, conjunctivitis, arthritis, arthralgia, petechiae, leukopenia,
135 retro-orbital pain, pre-existing conditions, and information on case progression:
136 recovery, occurrence of hospitalization, hospital admission date, and date of
137 death. The completion of the notification form was assessed for completeness,
138 for suspected dengue cases by healthcare professionals."

139 LIPME collaborates with the Regional Health Coordination of Uberlândia
140 for dengue diagnosis in the Triângulo Mineiro, which is one of the ten planning
141 regions in the Minas Gerais state, southeastern Brazil. The samples included in
142 the study were derived from suspected dengue cases of the following
143 municipalities: Uberlândia, Araguari, Monte Carmelo, Monte Alegre de Minas,
144 Patrocínio, Grupiara, Coromandel, Nova Ponte, Abadia dos Dourados, Cascalho
145 Rico, Iraí de Minas, Romaria, Douradoquara, Araporã, Estrela do Sul, and Prata.
146

147 **Serological tests for leptospirosis**

148 **Dual-Path Platform (DPP) Immunochromatographic Rapid Test**
149 **for Leptospirosis**

150 We selected 449 serum samples from patients who had a negative IgM-
151 ELISA for dengue in 2019 and with the following clinical symptoms in the
152 epidemiological records: fever, headache, myalgia, and nausea. The sampling
153 prioritized these symptoms reported by the patient to the healthcare professional,
154 as they are also characteristic symptoms of leptospirosis according to the Ministry
155 of Health and the Merck Manual [10,11]. Samples lacking epidemiological data
156 or whose serum was not in good storage conditions for serological processing
157 (samples with hemolysis, lipemia, insufficient quantity, and in poor condition)
158 were not selected.

159 We performed the rapid immunochromatographic test for qualitative
160 screening of specific IgM antibodies for *Leptospira* in human serum, plasma, or
161 whole blood, developed by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) at the
162 Immunobiological Technology Institute (Bio-Manguinhos).

163 The DPP rapid test (DPP Leptospirosis - Fiocruz) was designed based on
164 recombinant proteins. These native proteins are present on the *L. interrogans*
165 serovar Copenhageni surface and the assay uses a combination of two colloidal
166 gold particles conjugated with a human protein and anti-IgM, respectively. For
167 sample processing, we followed the kit manufacturer's recommendations. The
168 detection of two pink/purple lines, one in the control area and the other in the test
169 area, indicates a positive result. The intensity of the test lines may vary depending
170 on the concentration of specific antibodies. The manufacturer's guidelines state
171 that even a very clear line should be considered a reactive result. All samples
172 that showed positive results were repeated to confirm the outcomes.

173 The presence of only one purple/pink line indicates a non-reactive test,
174 thus suggesting the absence of anti-*Leptospira* antibodies. However, it does not
175 exclude the possibility that the individual who has had recent contact with the
176 specific antigen has the *Leptospira* infection due to the immunological window.

177

178 **Microagglutination test (MAT)**

179 We performed the microagglutination test or the dark-field microscopic
180 agglutination test (MAT) for positive samples in the leptospirosis screening test.
181 Were tested 52 samples using the MAT, including 26 reactive for IgM and 26 non-
182 reactive in the DPP assay, to verify a possible previous exposure to leptospires.
183 The MAT remains the reference test and is used to detect antibodies and
184 determine their titre. Is the serological technique recommended by the World
185 Health Organization (WHO) as the standard test for diagnosing leptospirosis [12].
186 The test determines agglutinating antibodies (IgM and IgG) against the bacteria
187 *Leptospira* spp. in the patient's blood serum by mixing different serovars of the
188 bacterium in serial dilutions with the test serum. Antileptospira antibodies present
189 in the serum cause agglutination of leptospires. The end-point is defined as that
190 dilution of serum which shows 50% agglutination, leaving 50% free cells when
191 compared with a control culture diluted 1:2 in phosphate-buffered saline
192 (International Committee on Systematic Bacteriology, 1984). Agglutinating
193 antibodies can be visualized under dark-field microscopy.

194 To perform the MAT, the following serogroups and serovars were tested:
195 AUSTRALIS (*L. interrogans* serovar Bratislava), BALLUM (*L. borgpetersenii*
196 serovar Castellonis), CANICOLA (*L. interrogans* serovar Canicola), DJASIMAN
197 (*L. interrogans* serovar Djasiman), GRIPPOTYPHOSA (*L. kirschneri* serovar

198 Grippotyphosa), HEBDOMADIS (*L. interrogans* serovar Hebdomadis),
199 ICTEROHAEMORRAGIAE (*L. interrogans* serovar Copenhageni; *L. interrogans*
200 serovar Icterohaemorrhagiae), POMONA (*L. interrogans* serovar Pomona),
201 SEJROE (*L. interrogans* serovar Hardjoprajitino; *L. interrogans* serovar Wolffi),
202 and TARASSOVI (*L. borgpetersenii* serovar Tarassovi). Every serum which gives
203 an agglutination of at least 50% of the leptospire at a 1:100 dilution was
204 considered positive. Before the test, we evaluated the viability of leptospire
205 under a dark-field microscopy. The serovars were maintained by the Laboratory
206 of Infectious Contagious Diseases (LADOC) at the Faculty of Veterinary Medicine
207 of the Federal University of Uberlândia.

208 Serum samples from each patient were diluted 1:50 in saline solution, and
209 50 µL of this dilution was pipetted into the plate wells. Then, 50 µL of each serovar
210 was added. After incubation for 1 hour at room temperature, the reading was
211 determined under dark-field microscopy. Seroreactive samples at screening were
212 titrated (1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200).

213

214 **Ethical aspects**

215 This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal
216 University of Uberlândia (UFU) under protocol number 5,392,382 and followed
217 the guidelines of the National Research Ethics Commission (CONEP) for
218 research involving humans (Resolutions No. 466 of December 12, 2012, and No.
219 510 of April 7, 2016 of the National Health Council).

220

221 **Results**

222 A total of 449 patients were included within the selection criteria of this
223 study, 148 male and 301 female, with a mean age of 43 years, and 39.42% were
224 aged between 41-60 years. Among the participants, 98.22% were from the urban
225 area. They were referred to the dengue diagnosis service predominantly in
226 February and March 2019. The main clinical complaints besides those used for
227 the inclusion criteria (fever, myalgia, headache, and nausea) were backache
228 (54.12%), retro-orbital pain (52.34%), and vomiting (51.22%).

229 Of the samples analyzed using the DPP assay, 26 were positive (5.79%),
230 of which 38.46% were male (10 samples) and 61.54% (16 samples) female, with
231 one of the patients in the first trimester of pregnancy. Positive individuals had a
232 mean age of 41 years and were residents of Uberlândia (69.23%), Araguari
233 (7.69%), and Monte Carmelo (23.08%), predominantly in urban areas (92.31%),
234 who reported brown race/skin color (46.15%). After the signs and symptoms used
235 as selection criteria, backache and retro-orbital pain were the clinical complaints
236 most reported by patients (57.69%), followed by vomiting (38.46%) and severe
237 arthralgia (34.62%). Only 3.85% of the patients had pre-existing diseases
238 (diabetes and arterial hypertension). Hospitalization occurred in 23% of the
239 reactive cases in the DPP assay (6 patients) (Table 1). The hospitalized patients
240 had postural hypotension, mucosal bleeding/other hemorrhages, abrupt drop in
241 platelets, hepatomegaly, and abdominal pain. One of the patients showed a small
242 unilateral effusion on thoracic tomography.

243

244

245 **Table 1. Sociodemographic characteristics of suspected dengue patients whose samples**
 246 **were reactive in serological tests for the diagnosis of leptospirosis, Triângulo Mineiro,**
 247 **Minas Gerais, Brazil, 2019.**

	DPP Leptospirosis	MAT
Number of reactive/Number of samples analyzed	26/449	09/52
Sex		
Female	16	07
Male	10	02
Age (years)		
0-20	05	01
21-40	08	03
41-60	07	03
60 or older	06	02
Mean age (years)	41.92	46.22
Average collection period (days)	7.65	8.80
Municipality of origin		
Uberlândia	18	07
Araguari	06	02
Monte Carmelo	02	00
Race/skin color		
White	09	04
Brown	12	02
Black	03	01
Ignored	02	01
Area		
Periurban/Rural	02	00
Urban	24	09
Admissions		
Yes	20	00
No	06	09
Education		
Illiterate	02	01
Elementary School	02	01
High school	07	00
Higher education	01	00
Not informed	14	07

248

249 We tested 52 samples using the MAT: 26 reactive sera and 26 non-
 250 reactive sera in the DPP assay. The findings showed that 17.31% (9 samples)
 251 were positive in the MAT, and six also showed reactivity in the DPP assay. Of the
 252 six positive samples in both tests, 66.67% were female, living in urban areas of
 253 Araguari (33.33%) and Uberlândia (66.67%) with a mean age of 50 years, who
 254 classified themselves as white (50%), brown (33.33%), and black (16.67%).

255 Microagglutination was detected with the following serovars:
 256 Grippotyphosa, Canicola, Tarassovi, Djasiman, Hardjoprajitino, Hebdomadis,
 257 Icterohaemorrhagiae, Pomona, Bratislava, and Copenhageni, according to the
 258 agglutinating titers depicted in Table 2. The positive patients in both serological
 259 techniques were not hospitalized or showed more severe symptoms. One of them
 260 had hypertension and diabetes and, in addition to fever, myalgia, nausea, and
 261 headache, had rash, arthralgia, petechiae, and retro-orbital pain. Notably, one
 262 patient who was reactive in the MAT and non-reactive in the DPP assay was
 263 hospitalized and had pre-existing lesions.

264

265 **Table 2. Results of serology tests for the diagnosis of leptospirosis in nine suspected**
 266 **dengue patients, Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil, 2019.**

Sample	DPP Leptospirosis	MAT	MAT titer/Serovar
1	Reactive	Reactive	1:800 Canicola 1:200 Tarassovi
2	Reactive	Reactive	1:100 Grippotyphosa
3	Reactive	Reactive	1:200 Bratislava 1:800 Canicola
4	Reactive	Reactive	1:200 Canicola 1:200 Djasiman 1:200 Grippotyphosa 1:200 Hardjoprajitino 1:200 Hebdomadis 1:200 Icterohaemorrhagiae 1:200 Pomona
5	Reactive	Reactive	1:100 Copenhageni 1:200 Grippotyphosa 1:200 Hardjoprajitino 1:200 Hebdomadis
6	Reactive	Reactive	1:400 Canicola
7	Non-reactive	Reactive	1:100 Grippotyphosa 1:200 Hardjoprajitino
8	Non-reactive	Reactive	1:200 Grippotyphosa 1:200 Hardjoprajitino
9	Non-reactive	Reactive	1:200 Grippotyphosa

267

268 Discussion

269 An important frequency of reactive serological samples for leptospirosis
270 (5.79%) was found in patients with acute febrile illness referred for dengue
271 diagnosis through the DPP assay, inferring a possible underestimation of
272 leptospirosis. A previous study carried out in the São Paulo state revealed a
273 prevalence of 1.04% of leptospirosis cases using the microagglutination test in
274 patients also referred for dengue diagnosis. It is noteworthy that São Paulo has
275 a good economic status; therefore, it has better diagnostic conditions compared
276 to the other states in the Brazilian territory [13].

277 A study conducted in the city of Uberlândia reported that human
278 leptospirosis cases may be underestimated, as the authors identified 28.4% of
279 domestic dogs reactive for leptospirosis, mainly to Autumnalis (34.2%) and
280 Tarassovi (23.7%) serovars. As the samples were collected from asymptomatic
281 dogs (probably harboring the bacteria asymptotically) and randomly during an
282 anti-rabies vaccination campaign, the authors believe that the dogs would serve
283 as reservoirs of the disease, being able to infect humans and maintain the
284 epidemiological chain of the agent (the same serovar was found in human
285 leptospirosis cases). In fact, dogs play a major role in the transmission of the
286 disease to humans, harboring leptospire for a long period in the kidneys, being
287 able to eliminate them in the urine without showing clinical signs or after obtaining
288 clinical improvement. Furthermore, the official number of human leptospirosis
289 cases was lower than those found in the records of the Laboratory of Infectious
290 Contagious Diseases of the Federal University of Uberlândia and private
291 laboratories of the city [14].

292 In our study, we also performed the MAT for the DPP positive samples. Of
293 the 26 reactive samples tested, six showed positive agglutination for Canicola,
294 Tarassovi, Grippotyphosa, Bratislava, Djasiman, Hardjoprajitino, Hebdomadis,
295 Icterohaemorrhagiae, Pomona, and Copenhageni serovars, all with titers greater
296 than or equal to 1:200 (Table 2). Although the MAT is considered the gold
297 standard for serodiagnosis in diagnosing leptospirosis, the test has limitations. Its
298 performance depends on the strains used and the quality of the antigen
299 suspensions, where 36% of confirmations may need a paired sera for comparison
300 of titers; its sensitivity depends on the days of disease progression, being lower
301 in the acute stage (first week) [15,16]. Most of leptospirosis cases are moderated,
302 but from 5 to 15% can be severe and fatal, primarily due diagnosis error,
303 inappropriate treatment, or pathogenicity of some serogroups. Few studies have
304 investigated hospital and intensive care unit admissions and the clinical
305 progression of patients [17]. Therefore, the number of reactive samples in our
306 study could be greater since the tested samples had been collected, on average,
307 7.6 days after the onset of symptoms. Lastly, there was no possibility of obtaining
308 a second sample to perform a paired test and comparison of titers, because the
309 titers initially identified in the MAT may be from previous contact with *Leptospira*.
310 This fact justifies the finding of three samples showing agglutination in the non-
311 reactive DPP assay.

312 The DPP showed a sensitivity of 81.5% in samples collected between 7
313 and 14 days, demonstrating the usefulness of the screening test. A recent study
314 that examined its diagnostic accuracy and clinical utility using finger stick blood,
315 venous whole blood, and serum revealed that the DPP assay is accurate,
316 portable, and reliable for early diagnosis of human leptospirosis, which is

317 essential to initiate treatment, as the progression of leptospirosis in more severe
318 cases is rapid and with high lethality [18].

319 In Brazil, according to the Notifiable Diseases Information System
320 (SINAN), 3,709 cases and 325 deaths from leptospirosis were confirmed in 2019,
321 with 189 cases and 19 deaths in Minas Gerais. According to the Brazilian Ministry
322 of Health data released by the Information Technology Department of the Unified
323 Health System (DATASUS), from 2010 to 2019, 42 leptospirosis cases were
324 confirmed in the municipalities served by LIPME. There are records of the
325 disease in all federation units, with a greater number of patients in the South and
326 Southeast regions. Importantly, leptospirosis has an average lethality of 9%. In
327 turn, 2019 was considered an epidemic year for dengue, according to the
328 Epidemiological Bulletin of the Health Surveillance Secretariat of the Ministry of
329 Health, with more than 20,000 severe cases and a lethality of 0.05% [19].

330 Comparing both diseases, dengue receives more government attention,
331 and diagnostic confirmation is sought more frequently in relation to leptospirosis.
332 Despite the international recognition of leptospirosis as a Neglected Tropical
333 Disease (NTD), Martins and Spink (2020) explain some reasons why the infection
334 still does not receive due attention from public policies in Brazil. Investments in
335 research and interventions are defined using epidemiological, demographic, and
336 clinical data and social impacts. Moreover, epidemiological and demographic
337 data may be non-existent, non-specific, or inaccurate. Thus, this information
338 becomes invisible [20]. In our study, the incompleteness of the epidemiological
339 data in the analyzed notification forms was verified, mainly regarding occupation
340 (55.46%), race/skin color (8.91%), education (40.98%), and autochthony
341 (70.16%), compared to the total samples. The low completeness of reporting

342 forms can harm the understanding of the epidemiological profile of the disease.
343 Therefore, training of health professionals should be performed to address this
344 issue and value the importance of correctly recording cases.

345 The clinical data of leptospirosis present mimicry of signs and symptoms,
346 hence, leptospirosis patients are not recognized or misdiagnosed, especially in
347 the acute phase. The differential diagnosis of leptospirosis and dengue poses a
348 major challenge for surveillance programs, mainly in resource-limited settings. As
349 both have similar clinical profiles and seasonal onset, dengue is thought to be the
350 first probable diagnosis in patients with acute febrile illness in endemic areas.
351 Furthermore, the lack of symptom specificity, lack of appropriate diagnostic
352 methods, and passive characteristics of the surveillance programs may
353 underestimate leptospirosis burden [9].

354 Still regarding the clinical signs of leptospirosis, it should be noted that the
355 analysis of records from outpatient visits, medical prescriptions, and laboratory
356 data are, in practice, the main data sources of the syndromic surveillance
357 systems [20] and are crucial to reduce case-fatality rates. Syndromic surveillance
358 is a strategy used by public health to detect diseases whose spectrum of clinical
359 manifestations is common to various pathologies [22]. Thus, it can be used to
360 investigate infectious diseases with non-specific clinical manifestations of fever.
361 The vast majority of these are of zoonotic origin, being transmitted by mosquitoes,
362 ticks, and rodents and associated with exposures that may have common
363 characteristics, reinforcing the difficulty of clinical differentiation in diagnostic
364 elucidation [23]. In Brazil, the principal diseases within the scope of
365 Epidemiological Surveillance that, at some point, manifest themselves in febrile
366 conditions are dengue, Zika, chikungunya, other arboviruses, hepatitis, malaria,

367 leptospirosis, yellow fever, spotted fever, and hantavirus [24]. Several of them
368 are emerging and have a low incidence in the population, underestimating the
369 burden of these diseases due to the absence of clinical suspicion.

370 The implementation of syndromic surveillance aims to provide a rapid
371 response to Epidemiological Surveillance services, favoring the detection of less
372 prevalent diseases and timely implementing control measures, and preventing
373 new cases and deaths [25]. Other researchers have stated that there are other
374 etiological agents besides to the dengue virus that need more attention from
375 health authorities [26].

376 Human leptospirosis has still been related to individuals who live in rural
377 areas [27,28]. However, in this study, patients with suspected dengue positive in
378 serological tests for leptospirosis mostly lived in urban areas. This result
379 emphasizes the reasons for the lack of initial suspicion and, consequently,
380 negligence in the correct diagnosis of leptospirosis.

381 Remarkably, our findings showed that the diagnosis of leptospirosis is
382 being underreported. This is alarming, as the treatment may have been
383 insufficient since, for leptospirosis patients, specific antimicrobials are required,
384 which are not used in cases of viral infection. We believe that a greater number
385 of leptospirosis cases could have been found if there had been adequate clinical
386 suspicion and the possibility of performing a greater number of tests in patients
387 with acute febrile illness.

388 Further studies with a larger sample size and with the possibility of
389 obtaining paired blood samples from the participants should be encouraged to
390 corroborate our research, which had as limitations the inability to obtain paired
391 samples and perform a greater number of diagnostic tests for leptospirosis.

392 **Conclusions**

393 Our findings revealed that 5.79% of patients with suspected dengue and
394 negative serology for the virus had evidence of infection by *Leptospira* spp. This
395 fact may imply underreporting and control of leptospirosis in the study area.
396 Health-care providers should increase their awareness of leptospirosis and
397 perform syndromic surveillance to correctly identify the etiologic agent causing
398 the acute febrile illness. Further in-depth investigations aimed at diagnosing
399 leptospirosis are needed to prevent this disease from going unreported. These
400 results show to be essential to include investigation of *Leptospira* infections in all
401 febrile illnesses to support adequate patient screening and antibiotic treatment,
402 reducing clinical manifestations and mortality.

403

404 **Acknowledgments**

405 We gratefully acknowledge the General Coordination of Laboratories of
406 the Ministry of Health for providing the Dual-Path Platform (DPP)
407 Immunochromatographic test to carry out this research.

408

409 **References**

- 410 1. Rajapakse S. Leptospirosis: clinical aspects. Clin Med. 2022;22: 14–17. doi:
411 10.7861/clinmed.2021-0784. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>
- 412 2. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Leptospirosis.
413 Brasília: Ministério da Saúde. 2022.
- 414 3. Samrot AV, Sean TC, Bhavya KS, Sahithya CS, Chan-draseskaran S,
415 Palanisamy R, et al. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis - A

- 416 review. *Pathogens*. 2021;10: 145. doi: 10.3390/pathogens10020145.
417 <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
- 418 4. Marteli AN, Genro LV, Diament D, Guasselli LA. Análise espacial da
419 leptospirose no Brasil. *Saúde Debate*. 2020;44: 805–817. doi:
420 10.1590/0103-1104202012616. [https://doi.org/10.1590/0103-](https://doi.org/10.1590/0103-1104202012616)
421 [1104202012616](https://doi.org/10.1590/0103-1104202012616)
- 422 5. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis,
423 surveillance and control [Internet]. Washington, DC, USA: WHO; 2003 [cited
424 2023 Jun 11]. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42667>.
- 425 6. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira
426 MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic
427 review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0003898.
428 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- 429 7. De Brito T, Silva AMG da, Abreu PAE. Pathology and pathogenesis of
430 human leptospirosis: a commented review. *Rev Inst Med trop S Paulo*.
431 2018;60: e23. doi: 10.1590/S1678-9946201860023.
432 <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860023>
- 433 8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim
434 Epidemiológico 53. Brasília: Ministério da Saúde. 2022.
- 435 9. Del Valle-Mendoza J, Palomares-Reyes C, Carrillo-Ng H, Tarazona-Castro
436 Y, Kym S, Aguilar-Luis MA, et al. Leptospirosis in febrile patients with
437 suspected diagnosis of dengue fever. *BMC Res Notes*. 2021;14: 209–215.
- 438 10. Brasil. Ministério da Saúde. Leptospirose – Sintomas. Brasília: Ministério da
439 Saúde. 2022. Available from: [https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/sintomas)
440 [br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/sintomas](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/sintomas)

- 441 11. Bush LM. Manual MSD. Leptospirose. 2022 Dez 12. Available from:
442 <https://www.msmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3>
443 [https://www.msmanuals.com](https://www.msmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-espiroquetas/leptospirose#v38916202_pt)
444 [https://www.msmanuals.com](https://www.msmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-espiroquetas/leptospirose#v38916202_pt)
- 445 12. World Health Organization (WHO). Human leptospirosis: guidance for
446 diagnosis, surveillance and control. Washington, DC, USA: WHO; 2003.
447 Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42667>.
- 448 13. International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the
449 Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting, 6 to 10 August, 1982,
450 Boston, Massachusetts, USA (1984) International Journal of Systematic
451 Bacteriology, 34:258-259. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-258>
- 452 14. Fornazari F, Richini-Pereira VB, Joaquim SF, Nachtigall PG, Langoni H.
453 Leptospirosis diagnosis among patients suspected of dengue fever in Brazil.
454 J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2021;27: e20200118.
455 <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0118>
- 456 15. Castro JR de, Salaberry SRS, Souza MA de, Lima-Ribeiro AMC.
457 Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines
458 and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. Rev
459 Soc Bras Med Trop. 2011;44: 217–222. [https://doi.org/10.1590/S0037-](https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000012)
460 [86822011005000012](https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000012).
- 461 16. Scialfa E, Rivero M, Moreno S, Ortiz M, Bongiorno F. Microscopic
462 agglutination test: Variables that affect the time of serological confirmation of
463 human leptospirosis cases. Rev Argent Microbiol. 2020;52: 278–282. doi:
464 [10.1016/j.ram.2019.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.11.005). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.11.005>

- 465 17. Pinto GV, Senthilkumar K, Rai P, Kabekkodu SP, Karunasagar I, Kumar BK.
466 Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. J
467 Microbiol Methods. 2022;195: 106438.
468 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106438>.
- 469 18. Parra Barrera EL, Bello Piruccini S, Rodríguez K, Duarte C, Torres M,
470 Undurraga EA (2023) Demographic and clinical risk factors associated with
471 severity of lab-confirmed human leptospirosis in Colombia, 2015–2020.
472 PLoS Negl Trop Dis 17(7): e0011454. doi: 10.1371/journal.pntd.0011454.
473 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011454>
- 474 19. Nabity SA, Hagan JE, Araújo G, Damião AO, Cruz JS, Nery N, et al.
475 Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the Dual Path
476 Platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in
477 hospitalized patients. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:
478 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006285>
- 479 20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente-
480 Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Leptospirose, mai., 2023.
481 Available from: [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z//leptospirose/situacao-epidemiologica)
482 [z//leptospirose/situacao-epidemiologica](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z//leptospirose/situacao-epidemiologica)
- 483 21. Martins MH da M, Spink MJP. Human leptospirosis as a doubly neglected
484 disease in Brazil. Cien Saúde Colet. 2020;25: 919–928.
485 <https://doi.org/10.1590/1413-81232020253.16442018>
- 486 22. Sosin DM. Draft framework for evaluating syndromic surveillance systems. J
487 Urban Health. 2003;80: 8–13. doi: 10.1007/pl00022309.
488 <https://doi.org/10.1007/PL00022309>

- 489 23. Henning KJ. What is syndromic surveillance? *Morb Mortal Wkly Rep.*
490 2014;63: 7–11.
- 491 24. Silva AD da, Evangelista M do SN. Syndromic surveillance: etiologic study
492 of acute febrile illness in dengue suspicious cases with negative serology.
493 Brazil, Federal District, 2008. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010;52: 237–
494 242. doi: 10.1590/S0036-46652010000500003.
495 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000500003>
- 496 25. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria n°
497 264, de 17 de fevereiro de 2020. Lista Nacional de Notificação Compulsória
498 de doenças, agravos e eventos de saúde pública. Brasília: Ministério da
499 Saúde. 2020. Available from: [http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-
500 264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656](http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656)
- 501 26. Fortaleza CMCB, Rocha R, Aragão VDN, Almeida RAMB. “Syndromic
502 surveillance” and the reemergence of yellow fever in São Paulo State,
503 Brazil, 2009. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2009;15: 186–189. doi:
504 <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000200002>
- 505 27. Mattar S, Tique V, Miranda J, Montes E, Garzon D. Undifferentiated tropical
506 febrile illness in Cordoba, Colombia: Not everything is dengue. *J Infect
507 Public Health.* 2017;10(5):507–12. Doi:
508 <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.09.014>.
- 509 28. Mai LTP, Dung LP, Mai TNP, Hanh NTM, Than PD, Tran VD, et al.
510 Characteristics of human leptospirosis in three different geographical and
511 climatic zones of Vietnam: a hospital-based study. *Int J Infect Dis.* 2022;120:
512 113–120. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.011.
513 <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.011>

- 514 29. Silva JA, Scialfa EA, Tringler M, Rodríguez MG, Tisnés A, Linares S, et al.
515 Seroprevalence of human leptospirosis in a rural community from Tandil,
516 Argentina. Assessment of risk factors and spatial analysis. Rev Argent
517 Microbiol. 2023;55: 49–59. doi: 10.1016/j.ram.2022.02.007.
518 <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.02.007>

**Artigo 2. “Seroepidemiological survey for the investigation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in cities of the Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil”.
Artigo padronizado de acordo com as normas do periódico “Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo”**

Seroepidemiological survey for the investigation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in cities of the Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil

Mariani Borges Franco, Gustavo Cardoso Fonseca, Ana Carolina Prado Sousa, Cristina Rostkowska, Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba, José Roberto Mineo, Matias Pablo Juan Szabó e Stefan Vilges de Oliveira

RESUMO

A febre maculosa (FM) é uma rickettsiose transmitida pela picada do carrapato infectado com *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*. Apresenta como manifestação clínica inicial febre elevada e de início súbito, cefaleia intensa, mialgia, artralgia, prostração, náusea, vômitos e exantema. Febre, cefaleia e exantema são considerados a “tríade clínica clássica” da FM, mas sua ocorrência é variável. Nos quadros clínicos mais graves, são comuns insuficiência renal oligúrica, insuficiência respiratória, manifestações neurológicas, hemorragias, icterícia, arritmias cardíacas e alterações hemodinâmicas. A FM apresenta sinais e sintomas inespecíficos, sugerindo que casos oligossintomáticos muitas vezes sejam etiologicamente ligados ou confundidos com doenças mais prevalentes, como a dengue. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo verificar a presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsia* e *Rickettsia parkeri* em pacientes com doença febril aguda encaminhados para realização de diagnóstico de dengue e que apresentaram sorologia negativa. Por amostragem de conveniência, foram selecionadas 1856 alíquotas de soro sanguíneo, com resultados negativos para dengue, dos quais 152 foram submetidos à análise sorológica para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, com base nos seguintes critérios: tempo de coleta maior ou igual a 14 dias, pacientes domiciliados em zonas rurais e periurbanas e profissionais com atividades laborais com maior risco de exposição. As amostras de soro sanguíneo humano foram testadas por reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os resultados revelaram que 29 amostras (19,08%) apresentaram reatividade na diluição 1:64 para alguma das cepas analisadas, *Rickettsia rickettsii* ou *Rickettsia parkeri*. Destas, 20,69% eram do sexo masculino e 58,62% do sexo feminino, com média de idade de 42,6 anos. A média do tempo de coleta das amostras foi de 14,6 dias. 41,38% dos pacientes eram brancos, 27,59% pardos e 24,14% pretos. Os pacientes foram oriundos principalmente de Uberlândia (31,03%) e Araguari (20,69%). 96,55 % eram residentes na zona urbana e apenas 3,45% na zona rural ou periurbana. Ocorreu internação de 01 paciente. As amostras reativas também na diluição 1:64, especificamente para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, representaram 13,16% e 5,92% do total das amostras analisadas, respectivamente. Os achados deste estudo indicaram reatividade para agentes rickettsiais em pacientes suspeitos de dengue, arbovirose endêmica na região. Tais resultados chamam atenção para a necessidade de investigações epidemiológicas mais aprofundadas, buscando a identificação oportuna e correta de casos de febre maculosa na região.

PALAVRAS-CHAVE: Febre Maculosa. *Rickettsia*. Carrapato. Zoonose.

ABSTRACT

Spotted fever (SF) is a rickettsiosis transmitted through the bite of a tick infected with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*. It initially presents with high fever of sudden onset, intense headache, myalgia, arthralgia, fatigue, nausea, vomiting, and rash. Fever, headache, and rash are considered the “classic clinical triad” of SF. In severe cases, renal and respiratory failure, neurological manifestations, hemorrhages, jaundice, cardiac arrhythmias, and hemodynamic changes are common. SF exhibits nonspecific signs and symptoms, leading to the possibility that oligosymptomatic cases are often etiologically related to more prevalent diseases, such as dengue. Thus, this study aims to determine the presence of anti-*Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* antibodies in patients with acute febrile illness referred for dengue diagnosis but tested negative for dengue serology. A convenience sample of 1,856 serum samples, with negative results for dengue, was selected. Among these, 152 samples were subjected to serological analysis for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* based on the following criteria: a collection time of at least 14 days, patients residing in rural and peri-urban areas, and individuals with high-risk occupational exposure. Human serum samples were analyzed by immunofluorescence assay (IFA). The results revealed that 29 samples (19.08%) showed reactivity at a dilution of 1:64 for either *Rickettsia rickettsii* or *Rickettsia parkeri*. Of these, 20.69% were male, and 58.62% were female, with an average age of 42.6 years. The average collection time for the samples was 14.6 days. 41.38% of the patients were white, 27.59% were brown, and 24.14% were black. The patients mainly came from Uberlândia (31.03%) and Araguari (20.69%). 96,55 % were urban residents, while only 3.45% were rural or peri-urban residents. The reactive samples at a dilution of 1:64 for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, respectively, accounted for 13.16% and 5.92% of the total samples analyzed. The findings showed reactivity to rickettsial agents in patients suspected of dengue, an endemic arbovirus in the region. Such results draw attention to the need for more in-depth epidemiological investigations seeking the timely and correct identification of spotted fever cases in the region.

KEYWORDS: Spotted Fever. *Rickettsia*. Tick. Zoonosis.

INTRODUCTION

Diseases transmitted by ticks represent a growing challenge for public health in Brazil and worldwide. Among the causative agents, the bacteria of the genus *Rickettsia*, including *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, stand out, responsible for spotted fevers, with cases identified in Brazil. Acute infection diseases caused by these bacteria can lead to serious complications and, in some cases, death if not treated promptly^{1,2}.

Various diseases are caused by different species of *Rickettsia*, collectively known as rickettsioses. Each type of rickettsiosis is associated with a specific species of *Rickettsia* and, when pathogenic, is classified through molecular and antigenic characteristics.

The *Rickettsias* causing diseases in Brazil are obligate intracellular microorganisms of the family *Rickettsiaceae*. Two notable species, *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, have drawn increasing concern regarding tick-borne diseases in the country, as they are associated with clinical cases of spotted fever, an acute febrile disease transmitted to humans³. *R. rickettsii* is the etiological agent of Brazilian spotted fever, a potentially severe, rapidly progressing disease that can result in severe symptoms, including high fever, skin rashes, and multiple organ dysfunction, with a considerable lethality rate when not treated early. In turn, *R. parkeri* is associated with a milder spotted fever, mainly related to the strain Atlantic Rainforest in Brazil, a less common but clinically significant illness. Both rickettsioses are transmitted by ticks and are endemic in several regions of Brazil, posing a great challenge to public health and epidemiological research^{1,2}.

In Brazil, the main vectors associated with spotted fever caused by *Rickettsia rickettsii* are species of the genus *Amblyomma*, such as the lone star tick (tick of horses and capybaras), *Amblyomma sculptum*, common in Cerrado biome⁴, and *Amblyomma aureolatum* (which usually parasitizes dogs) occurring in the Atlantic rainforest mountain domain, mainly in the state of São Paulo⁵. These ticks are ectoparasites that feed on a variety of hosts, including mammals, birds, and reptiles. They have a complex ecology, often associated with rural and wild environments, where the interaction between ticks, hosts, and *Rickettsias* occurs¹.

Amblyomma ticks have a life cycle of three stages: larva, nymph, male, and female adult. During each stage, they feed on the blood of hosts. Larvae and nymphs are the most relevant stages in the transmission of *Rickettsias* since it is usually during feeding in these stages that infection can be transmitted to humans⁶ due to their higher abundance in the environment⁶.

The tick *Amblyomma ovale*, which parasitizes wild carnivores and birds but can also parasitize domestic dogs, can act as a natural reservoir of the *Rickettsia parkeri* strain Atlantic Rainforest and may eventually parasitize humans and transmit this pathogen².

After the tick attaches to a human, the bacteria are inoculated into the host's body through the ectoparasite's saliva and diffuse through the host's epithelial tissue, potentially causing the disease. The incubation period, i.e., the period from infection to the manifestation of the first symptoms, is 2 to 14 days after the tick bite but can vary from person to person⁷.

After this period, individuals typically present fever as the initial clinical manifestation, associated with headache, myalgia, arthralgia, prostration, nausea, vomiting, and rash. In more severe clinical cases, in advanced stages, renal failure, respiratory failure, neurological manifestations, hemorrhages, jaundice, cardiac arrhythmias, and hemodynamic alterations (hypotension and shock) are common⁸.

There is a growing tendency to consider that cases presenting mild forms of SF, with a benign course and without specific treatment, may potentially result from infection by other species of *Rickettsias* than *R. rickettsii*, less pathogenic, including the *Rickettsia parkeri* strain Atlantic Rainforest. Furthermore, in the case of asymptomatic infections, it cannot be ruled out that the eventual detection of antibodies may result from infection by less virulent *Rickettsia* species^{9,10}.

According to the Brazilian Ministry of Health, the most indicated laboratory tests for the specific diagnosis of SF are indirect immunofluorescence assay (IFA), considered the gold standard for serodiagnosis, immunohistochemistry examination on tissue samples obtained from skin lesion biopsies, and molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR). However, currently available laboratory tests do not provide specific results in an agile and effective manner. IFA, for example, must be performed with two samples, one collected at the onset of symptoms and another after 14 days (to observe IgG titer seroconversion). Given the potential for rapid progression to severe forms and the risk of death when treatment is delayed, it should be emphasized that the initiation of appropriate antimicrobial treatment for SF should be based on the joint evaluation of the clinical picture and epidemiological risk factors for parasitism^{7,11}.

The Epidemiological Bulletin released by the Brazilian Ministry of Health from 2007 to 2021 reported 36,497 cases of spotted fever in Brazil, of which 7% were confirmed, averaging 170 cases per year in this period¹².

The state of Minas Gerais has the third-highest number of confirmed cases of SF in Brazil and the second-highest in the number of deaths. An epidemiological study conducted from 2007 to 2019 showed 298 cases of SF confirmed in the state, with 98 fatal cases. The lethality rate for the disease in this period was 32.8%, with the highest number of cases in the city of Belo Horizonte. The findings revealed that 69.4% of the cases occurred among men aged 30 to 59 years, mainly from urban areas. Patients reported contact with ticks, capybaras, and domestic animals such as dogs and cats. During this period, no cases of SF were reported in the Triângulo Mineiro region. The analyzed data were from SF cases that occurred in 82 municipalities in the state¹³.

SF presents variable clinical symptomatology during the progression of infection and disease progression with initially mild and nonspecific signs and symptoms. It is possible to assume that oligosymptomatic cases are often caused by more prevalent diseases in the region, such as dengue, when, in fact, they may be etiologically related to *Rickettsia* spp.¹⁴.

Thus, this study was carried out to assist in filling a significant gap in the epidemiological research of these rickettsioses in Brazil and the state of Minas Gerais. The lack of robust epidemiological data makes it challenging to understand the geographical distribution and prevalence of these infections in the country. This seroepidemiological survey aims to investigate the seroprevalence of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, focusing on the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais (an area considered free of SF), considering seroepidemiological data from patients with acute febrile illness referred for dengue diagnosis who presented negative serology.

MATERIAL AND METHODS

Epidemiological data from 4,124 patients referred to the Laboratory of Immunoparasitology Dr. Mário Endsfieldz Camargo (LIPME) at the Federal University of Uberlândia for dengue diagnostic screening in the year 2019. Through convenience sampling, 1,856 aliquots of blood serum were selected, with negative results for dengue, of which 152 were subjected to serological analysis for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*.

No patient recruitment was conducted, relying solely on previously recorded secondary data in the institution's database. All collected information was identified using an internal control number. We organized the epidemiological data available at LIPME for analysis and sample selection. The data were collected through an epidemiological record completed by healthcare professionals: municipality, area of residence, age, sex, race, skin color, occupation, education level, the onset date of symptoms, collection date. Clinical data comprised signs and symptoms of fever, myalgia, headache, rash, vomiting, nausea, back pain, conjunctivitis, arthritis, arthralgia, petechiae, leukopenia, retro-orbital pain, pre-existing conditions, and information on case progression: recovery, occurrence of hospitalization, hospital admission date, and date of death.

LIPME collaborates with the Regional Health Department of Uberlândia for dengue diagnosis in the Triângulo Mineiro region, which is one of the ten planning regions in Minas Gerais, southeastern Brazil. The samples included in this research were derived from suspected dengue cases of the following municipalities: Uberlândia, Araguari, Monte Carmelo, Monte Alegre de Minas, Patrocínio, Grupiara, Coromandel, Nova Ponte, Abadia dos Dourados, Cascalho Rico, Iraí de Minas, Romaria, Douradoquara, Araporã, Estrela do Sul, and Prata.

Serological tests for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*

Indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of IgG antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*

From the 1,856 samples of patients who tested negative for dengue after being referred for screening in 2019 to LIPME, 152 blood serum samples were selected. The selection of the 152 samples subjected to IFA was based on criteria that considered samples with a higher chance of exposure to the investigated agent, and samples in which the collection time after the onset of symptoms could enable the appearance of IgG antibodies. In this regard, blood serum from patients with a collection time ≥ 14 days were selected, with higher chances of detecting IgG antibodies. Additionally, regardless of the collection time, samples from patients from rural and peri-urban areas were selected, as these areas pose a higher risk of exposure and contamination. A final selection of samples was performed considering the occupation of each patient. Professionals doing outdoor work were also subjected to serological analysis to detect anti-*Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* antibodies, as they are also at a higher risk of contamination and exposure. In general, professions included rural worker, gravedigger, street sweeper, endemic agent, rural producer, recycler, milker, veterinary assistant, tractor driver, bricklayer, gardener, environmental engineer, farmer, community health agent, agricultural machine operators, and construction professionals. All samples tested negative for dengue using the enzyme-linked immunosorbent assay (IgM capture ELISA - PanBio™, Abbott, St. Ingbert, Germany). Samples lacking epidemiological data and those with serum in poor storage conditions for serological processing (samples with hemolysis, lipemia, low quantity, and in poor condition) were not selected

The selected human blood serum samples were individually tested by an in-house indirect immunofluorescence assay (IFA). Brazilian isolates of *R. rickettsii* and *R. parkeri* were used as antigens, kindly provided by Prof. Marcelo Labruna from the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of the University of São Paulo. The analyses were carried out at the Ixodology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine at the Federal University of Uberlândia (LABIX-UFU).

The sera were screened at a dilution of 1:64 against each antigen using fluorescein isothiocyanate-labeled anti-human IgG at a dilution of 1:600 (IgG, Sigma Diagnostics). Each slide was tested with a previously non-reactive serum (negative control) and a known reactive serum (positive control). After processing the samples, the slides were visualized and analyzed under epifluorescence microscopy at 40x magnification. In the case of reactivity at the 1:64 dilution, serial dilutions in twofold increments were evaluated for serum titration.

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Federal University of Uberlândia (UFU) under opinion 5,392,382 and followed the guidelines of the National Research Ethics Commission (CONEP) for research involving humans (Resolutions No. 466, of December 12, 2012, and No. 510, of April 7, 2016, of the National Health Council).

RESULTS

The sociodemographic characteristics of the 152 selected samples subjected to analysis are depicted in Table 1. The majority were female, 55.92%, with the age group of 18 to 40 years encompassing a significant portion of individuals, with an average age of 41.1 years. According to the findings, 38.82% were white, 4.61% were brown, and 1.32% were black. Hospitalizations occurred in 9.21% of these patients referred for dengue screening; of these, only 10.53% were from rural or peri-urban areas, mainly from the municipalities of Uberlândia and Araguari, accounting for 44.74% and 28.95% of the patients' origins, respectively. Most patients reported having completed elementary school II and high school during the completion of epidemiological forms; however, there was a lack of information on this data in 38.12% of cases. The average collection time for these patients was 14 days after the onset of the first symptoms.

Table 1 - Sociodemographic characteristics of patients subjected to *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* serological analysis

	Frequency (n)	Percentage (%)
Sex		
Female	85	55.92
Male	67	44.08
Age (years)		
0-17	22	14.47
18-40	54	35.53
41-60	49	32.24
60 and over	27	17.76
Municipality of origin		
Uberlândia	68	44.74
Araguari	44	28.95
Abadia dos Dourados	03	1.97
Coromandel	01	0.66
Douradoquara	03	1.97
Grupiara	03	1.97
Monte Alegre de Minas	04	2.63
Monte Carmelo	11	7.24
Patrocínio	05	3.29
Nova Ponte	06	3.95
Araporã	04	2.63
Race/skin color		
White	69	45.39
Brown	59	38.82
Black	7	4.61
Asian	01	1.32
Ignored/Not informed	15	9.87
Area		
Peri-urban/Rural	16	10.53
Urban	136	89.47
Hospitalizations		
	14	9.21
Education		
Illiterate	01	0.66
Elementary School I	14	9.21
Elementary School II	33	21.71
High school	34	22.37
Higher education	12	7.89
Ignored/Not informed	58	38.12

After the analyses, 29 samples (19.08%) showed reactivity at a dilution of 1:64 for either *Rickettsia rickettsii* or *Rickettsia parkeri* strains. Among these, 20.69% were male and 58.62% were female, with an average age of 42.6 years. The average collection time for samples was 14.6 days. A total of 41.38% of patients were white, 27.59% were brown, and 24.14% were black. Individuals were mainly from Uberlândia (31.03%) and Araguari (20.69%). Among the participants, 96,55 % resided in urban areas, with only 3.45% in rural or peri-urban areas. One patient was hospitalized, presenting syncope, persistent vomiting, abdominal pain, fluid accumulation, and a progressive increase in hematocrit as warning signs and the reason for hospitalization, according to the

epidemiological form. Blood collection for this patient was performed 18 days after symptom onset and showed reactivity for *Rickettsia rickettsii*. The patient is a 38-year-old female, residing in the urban area of Uberlândia, a nursing technician, referred for serological analysis for dengue in May. This patient recovered and reported the following symptoms and clinical signs during the assessment: fever, myalgia, rash, and vomiting. These are also the main symptoms reported by other patients who showed reactivity to any of the tested *Rickettsia* strains: 62.07% reported fever and myalgia, 31.03% vomiting, and 13.7% rash. Four reactive samples are from patients working in rural areas or agricultural activities (endemic agent, milker, tractor driver, fieldworker).

Samples reactive at a dilution of 1:64, specifically for *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, represented 13.16% and 5.92% of the total samples analyzed. Twenty samples were reactive to *R. rickettsii*, and nine were reactive to *R. parkeri*. Reactivity to *R. rickettsii* was higher in females with 14 samples, and six samples in males. Among the patients, 40% were aged 18 to 40 years, and 35% were between 41 and 60 years old. A total of 95% lived in urban areas, with 45% declaring themselves white, 40% brown, and 5% black, residents of the cities of Uberlândia, Araguari, Monte Carmelo, Monte Alegre, Patrocínio, and Nova Ponte.

Results for samples reactive to *R. parkeri* showed similar frequencies to *R. rickettsii*, as they had a higher percentage in females and individuals with an average age of 45.8 years. All patients resided in urban areas, mainly from the cities of Uberlândia and Araguari, of white and brown race. The epidemiological profiles are displayed in Table 2. The samples did not show reactivity for the other titrations tested: 1:128, 1:256, 1:512, and 1:1024.

Table 2 - Sociodemographic characteristics of patients with clinical suspicion of dengue, whose samples were reactive in serological tests for the diagnosis of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil, 2019.

	Reactive for <i>Rickettsia</i> sp. (1:64)	Reactive for <i>R.</i> <i>parkeri</i> (1:64)	Reactive for <i>R.</i> <i>rickettsia</i> (1:64)
Number of reactive samples/Number of samples analyzed	29/152 (19.8%)	09/152 (5.92%)	20/152 (13.16%)
Sex			
Female	17	07	14
Male	06	02	16
Age (years)			
0-17	02	01	02
18-40	09	02	08
41-60	08	05	07
60 and over	04	01	03
Average age (years)	42.6	45.8	42.1
Average collection time (days)	14.6	15	14
Municipality of origin			
Uberlândia	09	03	08
Araguari	06	02	06
Monte Carmelo	02	02	01
Grupiara	01	01	00
Monte Alegre	02	00	02
Patrocínio	01	00	01
Nova Ponte	01	00	01
Araporã	01	01	00
Race/skin color			
White	12	06	09
Brown	08	03	08
Black	07	00	01
Ignored/Not informed	02	00	02
Area			
Peri-urban/Rural	01	00	01
Urban	22	09	19
Hospitalizations	01	00	01
Education			
Illiterate	00	00	00
Elementary School I	08	01	03
Elementary School II	04	05	07
High School	05	03	04
Higher Education	01	00	01
Ignored/Not informed	05	00	05

DISCUSSION

The spotted fever is an endemic disease in various regions of Brazil. Its geographical distribution has expanded, encompassing both rural and urban areas, thereby

increasing the potential exposure of the population to the risk of infection. Notably, understanding how the epidemiology of the disease is evolving over time and identifying areas of higher incidence is crucial¹⁵. Early diagnosis of SF is essential for ensuring effective treatment. However, diagnosis is often challenging due to the similarity of symptoms with other febrile diseases and the lack of rapid and accessible diagnostic tests. Furthermore, specific antibiotic treatment must be initiated as early as possible to prevent complications¹⁶.

Our study revealed that 29 samples (19.08%) exhibited reactivity at a 1:64 dilution for one of the analyzed strains, namely *Rickettsia rickettsii* or *Rickettsia parkeri*. Specifically, the reactivity for *Rickettsia rickettsii* was 13.16% (20 samples), and for *Rickettsia parkeri*, 5.92% (09 samples) of the total analyzed. Reactivity was confirmed using the indirect immunofluorescence assay (IFA). Slides were sensitized with antigens from *Rickettsia parkeri* and *Rickettsia rickettsii*. IFA is the laboratory method considered the “gold standard” for serological diagnosis of rickettsioses. The detection of IgG antibodies in paired samples, with the first collected early, upon suspicion, and the second sample collected during the convalescent phase, at least 14 days after the first sample, is recommended. Confirmed cases are those with a fourfold or greater rise in IgG antibody titers in paired samples^{8,9,17,18}. In this study, it was not possible to evaluate a second sample due to a convenience sampling approach, thus preventing the confirmation of SF diagnosis.

Reactivity solely at the 1:64 dilution in our analyses may indicate cross-reactivity to other types of rickettsiae different from those initially investigated. In Brazil, *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* have been described as the main species involved in tick-borne diseases in humans. However, other species, such as *Rickettsia rhipicephallii* and *Rickettsia amblyommatis*, have also been reported in the country^{1,19}. *Rickettsia bellii*, phylogenetically related to a primitive group of rickettsiae, infects the widest range of ticks in the Americas, and its pathogenic potential is still under discussion¹⁹.

In a serological survey of the population in the municipality of Novo Cruzeiro, Minas Gerais, a 10.1% serological prevalence of reactivity to agents of SF was found. Of the sera, 18% had titers, in the indirect immunofluorescence assay (IFA), $\geq 1/64$ for *Rickettsia rickettsii*; however, none of the patients showed symptoms of SF in the three years preceding the survey. As the main hypothesis, the authors indicate the existence of other *Rickettsias* that induce cross-reactivity with *R. rickettsia*²⁰.

Another serological survey for *Rickettsia rickettsii*, *R. typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* was conducted in the city of Piau, Minas Gerais. The authors observed frequent multiple/cross-reactivity among the investigated rickettsial antigens, and inferred that cross-reactivity would be a result of antigenic determinant similarities between the various rickettsial and non-rickettsial agents, suspected by detection of lower antibody titers. They emphasize the need to simultaneously test not only one but as many possible rickettsial antigenic strains, checking any seropositivity rate for epidemiological purposes. The same study found no significant association between a higher seroprevalence rate for any tested agent and individuals with occupations directly related rural professions²¹. In our study, 4 out of the 29 reactive samples (13.79%) were from individuals with outdoor occupations and higher exposure risk.

Regarding the reactivity samples, 96,55 % were residents in urban areas, with only 3.45% in rural or peri-urban zones. It should also be considered the possibility of SF in patients with symptoms residing in urban and non-endemic areas, as previous reports demonstrate *Rickettsia* sp. infection in dogs from non-endemic areas for SF in the southeastern region of Brazil, confirmed through canine serological surveys and molecular biology tests²²⁻²⁴. The fact that dogs habitually roam open environments and their close relationship with humans make them sentinels for the transmission of SF⁴. A positive dog in a non-endemic area reinforces the importance of considering diagnostic investigation for this pathology, even in patients from urbanized and non-endemic regions, as was the case for the majority of patients evaluated in our study.

However, it is worth noting that the basis of the connection between *Rickettsia* sp. and humans is the tick. In Brazil, the species *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma sculptum*, and *A. aureolatum* are considered the primary vectors, while *Rhipicephalus sanguineus* is a suspected vector that may play a role in transmission under specific circumstances. The existing knowledge about these vectors and their hosts, such as the capybara (*H. hydrochaeris*), is still limited and not sufficient to provide a complete final picture. Therefore, the accurate determination of tick species and their distribution in each geographical region is a prerequisite for unraveling the epidemiology of rickettsiosis. Additionally, there is a continuous discovery of other *Rickettsia* species in the country, and new human rickettsioses with specific epidemiology may be revealed, illustrating the complexity of their enzootic and epidemic cycles, as well as the diversity of potential vectors. A complicating factor is the rapid human-induced environmental changes,

altering the relationships between hosts and ticks, creating new scenarios for tick-borne diseases^{17,25}.

The human impact on ecosystems, including habitat fragmentation, global warming, and natural resource exploitation, has led to significant changes, facilitating interactions between humans and pathogens. In this context, a holistic approach towards public health is highlighted, applying the concept of One Health and recognizing that human well-being is associated with animals and the environment. This approach seeks a combined effort among physicians, ecologists, and veterinarians to control threats to public health. To aid in the epidemiological surveillance of spotted fever, studies have sought sentinel animals, such as horses and dogs, with positive serological reactions in endemic areas²⁴. In addition to diagnostic suspicion in endemic areas and high serological prevalence in sentinel animals, attention should be given to any case where the patient presents symptoms such as fever, myalgia, headache, and rash.

According to the Brazilian Ministry of Health and the Merck Manual of Medical Information, the main symptoms of SF are fever, severe headache, nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, constant muscle pain, swelling, gangrene in fingers and ears, and paralysis of the limbs starting in the legs. Moreover, as SF progresses, red spots may appear on the wrists and ankles, which do not itch but may spread toward the palms of the hands, arms, or soles of the feet^{11,26}. These symptoms are similar to those described for dengue: high fever, body and joint pain, headache, rash, malaise, and loss of appetite. Warning signs include abdominal pain, vomiting, fluid accumulation, postural hypotension and/or syncope, hepatomegaly, mucosal bleeding, and progressive increase in hematocrit. In our study, one hospitalized patient showed some of these warning signs (syncope, persistent vomiting, abdominal pain, fluid accumulation, progressive increase in hematocrit). The patient was referred for dengue diagnosis, with a non-reactive result. In our analysis, she was reactive (1:64) for *R. parkeri*. The patient reported the following symptoms during the assessment: fever, myalgia, rash, and vomiting.

Fever (62.07%), myalgia (62%), and headache (58.62%) were the most reported symptoms in our study among serologically reactive cases of SF, with rash present in 13.79%. Thus, there is an overlap of signs and symptoms of both diseases, making the diagnostic suspicion more complex for the healthcare team.

A study evaluating epidemiological aspects of SF in Minas Gerais indicated a high mortality rate in the state. The authors report that this fact may reflect the difficulty of healthcare professionals in suspecting SF, as more common diseases such as dengue and

other febrile exanthematous diseases present similar clinical characteristics, leading to confusion in differential diagnosis. For the vast majority of these diseases, the recommended treatment does not require antibiotics, or when necessary, antibiotics are not effective against SF. Thus, it is challenging for physicians to initiate timely and effective treatment based solely on clinical data²⁷.

Our findings exhibited reactivity to rickettsial agents in patients suspected of dengue, an endemic arbovirus in the region. Diseases such as dengue, especially in endemic areas, can delay the diagnosis of human rickettsiosis. Therefore, the medical team should assess, along with clinical symptoms, patient data regarding possible contact with environments and/or animals related to ticks, providing the opportunity for timely diagnosis and effective treatment due to the high lethality of this disease.

This study emphasizes the need for caution regarding patients with acute febrile illness, not ruling out clinical suspicion of SF, as reactivity was found even at low titers. The impossibility of obtaining paired samples and more detailed information about places frequented by patients is a study limitation and impedes a more critical and thorough analysis. Hence, further epidemiological studies should be encouraged and conducted in the studied region to better elucidate factors related to this zoonosis.

CONCLUSION

The findings showed reactivity to rickettsial agents in patients with suspected dengue, emphasizing the need for considering the possibility of SF diagnosis even in non-endemic regions. Interdisciplinary participation in epidemiological research can serve as a mechanism to integrate information and enhance control strategies for this disease. Importantly, educational and preventive measures, such as training healthcare professionals to detect and suspect cases, public awareness campaigns about the disease, and actions to control tick proliferation and contact, should be promoted.

REFERENCES

1. Labruna MB. Ecology of Rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1166:156-66. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>

2. Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>
3. Martiniano NO, Sato TP, Vizzoni VF, Oliveira SV, Amorim M, Gazêta GS. A new focus of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2021;64:e22. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202264022>
4. Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BioMed Central.* 2009;9:e0003898. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>
5. Binder L, Ramírez-Hernández A, Serpa MC, Moraes-Filho J, Pinter A, Scinachi CA, et al. Domestic dogs as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* for *Amblyomma aureolatum* ticks. *Ticks And Tick-Borne Diseases.* 2021;12:101824. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101824>
6. Gerardi M, Ramírez-Hernández A, Binder L, Krawczak FS, Gregori F, Labruna MB. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii*. *Front Physiol.* 2019;10:1-10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00653>
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. Febre maculosa: aspectos epidemiológicos, clínicos e ambientais / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022.160 p.: il.
8. Angerami RN, Silva AMR, Nascimento EMM, Colombo S, Wada MY, Santos FC, et al. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? a comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:207-208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02160.x>
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Boletim epidemiológico - manejo de capivaras em áreas com casos de febre maculosa brasileira. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. p. 21-3.
10. Rodrigues CM, Geise L, Gazeta GS, Oliveira SV. Aspectos ecológicos da febre maculosa no Brasil. *Saúde Meio Ambiente: Rev Interdisciplinar.* 2020;9:143-163. <https://doi.org/10.24302/sma.v9i0.2663>

11. Brasil. Ministério da Saúde. Febre Maculosa - Sintomas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa>. Acesso em: 12 abr. 2023.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
13. Nunes EC, Moura-Martiniano MO, Duré AI, Iani FC, Oliveira SF, Mello FL, et al. Spotted fever in the morphoclimatic domains of Minas Gerais State, Brazil. *Front Trop Dis*. 2022;2:1-10. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.718047>
14. Rodrigues CM, Geise L, Gazeta GS, Oliveira SV de. Estudo descritivo de casos notificados de febre maculosa em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais entre 2007 e 2016. *Cad Saúde Colet*. 2023;31(2):e31020104. <https://doi.org/10.1590/1414-462x202331020104>
15. Silveira I, Pacheco RC. A review of the tick-borne spotted fever group rickettsioses and the potential to apply the One Health concept in Brazil. *Braz J Vet Med*. 2016;38:19-42.
16. Galvão MA, Lamounier JA, Bonomo E, Barraviera B. Current understanding of the epidemiology of Rocky Mountain spotted fever in Brazil. *Curr Top Trop Emerg Dis*. 2010;139-143.
17. Pinter A, Costa CS, Holcman MM, Camara M, Leite RM. A febre maculosa brasileira na região metropolitana de São Paulo. *Boletim Epidemiol. Paulista*. 2016;13:3-47.
18. Pinter AS, França AC, Perez CA, Costa CS, Santos FCP, Moreira JRA, et al. Febre maculosa: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores. Piracicaba: ESALQ; 2013.
19. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:657-702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
20. Galvão MA, Lamounier JA, Bonomo E, Tropaia MS, Rezende EG, Calic SB, et al. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2002;18:1593-97. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000600013>
21. Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:853-59. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800006>

22. Gonçalves ES, Cordeiro MD, Santos LM, Araújo IM, Fonseca AH, Labruna MB, et al. Research of *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. in dogs in Southeast Brazil. *Vet Parasitol: Reg Stud Rep.* 2022;30:100706. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100706>
23. Savani ES, Costa FB, Silva EA, Couto AC, Gutjahr M, Alves JN, et al. Fatal Brazilian spotted fever associated with dogs and *Amblyomma aureolatum* ticks, Brazil, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2019;25:2322-23. <https://doi.org/10.3201/eid2512.191146>
24. Campos SD, Cunha NC, Almosny NR. Brazilian Spotted Fever with an approach in veterinary medicine and One Health perspective. *Vet Med Int.* 2016;2016:1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/2430945>
25. Montenegro DC, Bitencourth K, Oliveira SV, Borsoi AP, Cardoso KM, Sousa MS, et al. Spotted Fever: epidemiology and vector-rickettsia-host relationship in Rio de Janeiro state. *Front Microbiol.* 2017;8:1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00505>
26. MSD. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF). Merck Manual of Medical Information, 2022.
27. Amâncio FF, Amorim VD, Chamone TL, Brito MG, Calic SB, Leite AC, et al. Epidemiological characteristics of Brazilian spotted fever in Minas Gerais State, Brazil, 2000-2008. *Cad Saúde Pública.* 2011;27:1969-76. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2011001000010>

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de la P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v. 140, n. 3-4, p. 287–296, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

ANGERAMI, R.N.; SILVA, A. M. R.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; WADA, M. Y.; SANTOS, F. C. P. dos; MANCINI, D. M.; OLIVEIRA, R. C.; KATZ, G.; MARTINS, E. C.; SILVA, L. J da. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? a comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 15, p. 207–208, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02160.x>.

ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; BRITO, T. de; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M. de; LIMA, D. M. C.; ABREU, P.; NASCIMENTO, A. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1–20, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-70>.

BHARTI, A. R.; *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2).

BIGGS, H. M.; *et al.* Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: rocky mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, ehrlichioses, and anaplasmosis - United States. **MMWR. Recommendations and Reports**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 1–44, 2016. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>.

BINDER, L. C.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; SERPA, M. C. de A.; MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; SCINACHI, C. A.; LABRUNA, M. B. Domestic dogs as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* for *Amblyomma aureolatum* ticks. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 101824, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101824>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 53, n. 20. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - manejo de capivaras em áreas com casos de febre maculosa brasileira**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. p. 21–23.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue - diagnóstico e manejo clínico**: adulto e criança. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre maculosa**: aspectos epidemiológicos, clínicos e ambientais. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunizações e Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre Maculosa - Sintomas**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa>. Acesso em: 12 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leptospirose - Sintomas**. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/sintomas>. Acesso em: 12 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020**. Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. p. 21–23. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

BUDIHAL, S. V.; PERWEZ, K. Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014. DOI: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950>.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: rocky mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis - United States; a practical guide for physicians and other health-care and

public health professionals. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 55, n. 2, p. 1–44, 2006.

COSTA F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGENSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.

COSTA, F. B.; COSTA, A. P. da; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; DIAS, R. A.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 0179163, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179163>.

DA SILVA, A. D.; EVANGELISTA, M. D. S. N. Vigilância sindrômica: estudo etiológico de doenças febris agudas a partir dos casos suspeitos de dengue com sorologia não reagente. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 5, p. 237–242, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000500003>.

DE BRITO, T.; SILVA, A. M. G.; ABREU, P.A. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860023>.

DEL VALLE MENDOZA, J.; *et al.* Leptospirosis in febrile patients with suspected diagnosis of dengue fever. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 209, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05627-3>.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 9, p. 1413–1425, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.10.102>.

FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. *Leptospira* spp.: novel insights into host-pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 176, p. 50–57, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.004>.

FORNAZARI, F.; FREIRIAS, C. D.; LIMA, H. P.; RODRIGUES, M. M.; LANGONI, H.; TEIXEIRA, C. R. A new focus of Brazilian spotted fever in the central-west region of São Paulo state, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 54, 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0391-2020>.

FORTALEZA, C. M. C. B.; ROCHA, R.; ARAGÃO, V. D. N.; ALMEIDA, R. A. M. B. “Syndromic surveillance” and the reemergence of yellow fever in São Paulo State, Brazil, 2009. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 186–189, 2009.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s.l.], v. 73, n. 5, p. 408–419, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x>.

FURTADO, A. N. R.; LIMA, A. S. F.; OLIVEIRA, A. S.; TEIXEIRA, A. B.; FERREIRA, D. S.; OLIVEIRA, E. C.; CAVALCANTI, G. B.; SOUSA, W. A.; LIMA, W. M. Dengue e seus avanços. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s.l.], v. 51, n. 3, p. 196–201, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201900723>.

GAVA, M. Z.; BRAGA, F. R.; LANGONI, H. Aspectos etioepidemiológicos da febre maculosa brasileira: revisão sistemática. **Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 29, p. 1–20, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.35172/rvz.2022.v29.652>

GILLESPIE, J. J.; *et al.* Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. **Plos One**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 2018–2022, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002018>.

GODOI, J. T. A. M. et al. Leptospirose. *In*: HINRICHSEN, S. L. **DIP: doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 254–263.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 1, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992008000100002>.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 494–501, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>.

HENNING, K. Overview of syndromic surveillance - what is syndromic surveillance? **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53 p. 7–11, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1037/e307182005-001>.

HOVIUS, J. W. R. Spitting Image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin’s innate immune response. **Journal of Investigative**

Dermatology, [s.l.], v. 129, n. 10, p. 2337–2339, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2009.202>.

KHAN, M. B.; YANG, Z.-S.; LIN, C.-Y.; HSU, M.-C.; URBINA, A. N.; ASSAVALAPSAKUL, W.; WANG, W.-H.; CHEN, Y.-H.; WANG, S.-F. Dengue overview: an updated systemic review. **Journal of Infection and Public Health**, [s.l.], v. 16, n. 10, p. 1625–1642, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2023.08.001>.

KULARATNE, S. A.; DALUGAMA, C. Dengue infection: global importance, immunopathology and management. **Clinical Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 9–13, 2022. Royal College of Physicians. DOI: <http://dx.doi.org/10.7861/clinmed.2021-0791>.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S. V. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.282>.

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s.l.], v. 1166, n. 1, p. 156–166, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.14.2.296-326.2001>.

LEVETT, P. N. Systematics of Leptospiraceae. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [s.l.], p. 11–20, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 1–10, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000300007>

MAGALHÃES, F. A. da C.; MENDES, R. de M.; MELO, A. L. T. Análise descritiva dos casos confirmados de leptospirose em humanos no Brasil, período de 2010-2019. **Journal Health NPEPS**, [s.l.], v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: <https://periodicos.unemat.br/index.php/jhnpeps/article/view/4697>. Acesso em: 28 out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.30681/252610104697>

MARTINIANO, N. O. de M.; SATO, T. P.; VIZZONI, V. F.; VENTURA, S. F.; OLIVEIRA, S. V. de; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. A new focus of spotted fever

caused by *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 64, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946202264022>

MARTINS, M. M.; MARTINS, K. Riquetsioses (*Rickettsia* spp.) transmitidas por carrapatos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2736–2746, 2014. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/11>. Acesso em: 20 out. 2023.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, [s.l.], v. 135, n. 1, p. 15–23, 2004.

MENEZES, A. M. F.; ALMEIDA, K. T.; AMORIM, A. dos S. de; LOPES, C. M. R. Perfil epidemiológico da dengue no Brasil entre os anos de 2010 à 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 13047-13058, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n3-259>.

MONTEIRO, K. J. L.; ROZENTAL, T.; LEMOS, E. R. S. de. Diagnóstico diferencial entre a febre maculosa brasileira e o dengue no contexto das doenças febris agudas. **Revista de Patologia Tropical**, [s.l.], v. 43, n. 3, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v43i3.32220>.

MOREIRA, J.; BRESSAN, C. S.; BRASIL, P.; SIQUEIRA, A. M. Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 24, n. 8, p. 827–835, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.001>.

MOURA, D. N. A.; SILVA, A. T.; RODY, L. A.; REIS, N. E. O.; ALVES, W. A.; SIMÕES, M. de O. Epidemiologia da dengue em Minas Gerais de 2009 a 2019: uma análise descritiva. **Hu Revista**, [s.l.], v. 48, p. 1-9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34019/1982-8047.2022.v48.36236>.

MOREIRA, L. S. de B.; OLIVEIRA, H. M.; CORRÊA, B. A. S.; GUIMARÃES, L. A.; DAMASCENO, M. H. S.; BRAGA, T. de A.; BRAGA, V. E. G.; NASCIMENTO JUNIOR, V. P.; ARAUJO, L. M. B. Perfil clínico e epidemiológico da dengue no estado de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Health Review**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 373–387, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n1-032>.

MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. de S.; FIGUEIREDO, R. P.; GIMAQUE, J. B. L.; GALUSSO, E. dos S.; KRAMER, V. M.; OLIVEIRA, C. M. C.; NAVECA, F. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0669>.

NASSER, J. T.; LANA, R. C.; SILVA, C. M. dos S.; LOURENÇO, R. W.; SILVA, D. C. da C.; DONALÍSIO, M. R. Urbanization of Brazilian spotted fever in a municipality of the southeastern region: epidemiology and spatial distribution. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 299-312, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500020002>.

NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; SOUSA, R. de; PADDOCK, C. D.; LABRUNA, M. B. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the new world. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 84, n. 8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02872-17>.

NUNES, E. C.; MARTINIANO, N. O. M.; DURÉ, A. I de L.; IANI, F. C. de M.; OLIVEIRA, S. V. de; MELLO, F. L.; GAZÊTA, G. S. Spotted fever in the morphoclimatic domains of Minas Gerais state, Brazil. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 2, p. 718047, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.718047>.

OLIVEIRA, S. V.; FACCINI-MARTÍNEZ, A. A. *Rickettsia parkeri* spotted fever and toxicosis by *Ornithodoros*: other tick bite-related entities to be known by dermatologists. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 94, n. 1, p. 122-123, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198389>.

OLIVEIRA, S. V. de; *et al.* Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 3, p. 65–72, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232016000300008>.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Human leptospirosis**: guidance for diagnosis, surveillance and control. Washington, DC, EUA: OMS, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42667>. Acesso em: 05 maio 2023.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 38, n. 6, p. 805–811, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1086/381894>.

PINTER A. dos S.; *et al.* **Febre maculosa**: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores. Piracicaba: ESALQ, 2013.

PINTO, G. V.; SENTHILKUMAR, K.; RAI, P.; KABEKKODU, S. P.; KARUNASAGAR, I.; KUMAR, B. K. Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. **Journal of Microbiological Methods**, v. 195, p. 106438, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106438>.

RAJAPAKSE, S. Leptospirosis: clinical aspects. **Clinical Medicine Journal**, v. 22 n. 1, p. 14–17, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>.

ROSA, M. I.; REIS, M. F. dos; SIMON, C.; DONDOSSOLA, E.; ALEXANDRE, M. C.; COLONETTI, T.; MELLER, F. O. IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 22, n. 12, p. 4001–4012, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-812320172212.14112016>.

SALLES, T. S.; *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 11, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2830-8>.

SAMROT, A. V.; SEAN, T. C.; BHAVYA, K. S.; SAHITHYA, C. S.; CHANDRASEKARAN, S.; PALANISAMY, R.; ROBINSON, E. R.; SUBBIAH, S. K.; MOK, P. L. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis: a review. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 145, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>.

SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. F. S.; CADORE, G. C.; HILGER, R. B.; TONIM, R.; PACHECO, R. C.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n. 2, p. 511–514, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000200035>.

SARAIVA, D. G.; SOARES, H. S.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsia* to vertebrate hosts. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n. 9, p. 1504–1510, set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2009.140189>.

SOSIN, D. M. Syndromic surveillance: the case for skillful investment: biosecurity and bioterrorism: **Biodefense Strategy, Practice, and Science**, [s.l.], v. 1, n. 4, p. 247–253, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1089/153871303771861441>.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s.l.], v. 3, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.