



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO SAZONAL DA INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA
POR *LEPTOSPIRA* SPP. E DAS FORMAS GRAVES DA LEPTOSPIROSE**

GIELSON ALMEIDA DO SACRAMENTO

Salvador - Bahia
2016

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO SAZONAL DA INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA
POR *LEPTOSPIRA* SPP. E DAS FORMAS GRAVES DA LEPTOSPIROSE**

GIELSON ALMEIDA DO SACRAMENTO

Orientador: Dr. Albert Ko

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

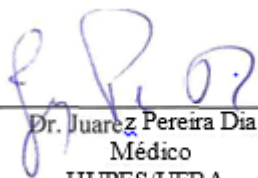
Salvador - Bahia
2016

AVALIAÇÃO DO PADRÃO SAZONAL DA INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR
LEPTOSPIRA SPP. E DAS FORMAS GRAVES DA LEPTOSPIROSE

GIELSON ALMEIDA DO SACRAMENTO

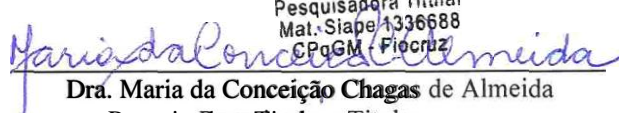
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Juarez Pereira Dias
Médico
HUPES/UFBA

Maria da Conceição C. Almeida
Pesquisadora Titular
Mat. SIAPE 1336688
CPqGM - Fiocruz



Dra. Maria da Conceição Chagas de Almeida
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ/CPqGM



Dra. Deborah Bitencourt Mothé Fraga
Pesquisadora
FIOCRUZ/CPqGM

Dedico este trabalho a um dos maiores incentivadores dos meus estudos, Gilberto Vaz do Sacramento, meu pai. Deus resolveu te levar para ver do alto todas as minhas conquistas, te amo.

AGRADECIMENTO

A Deus, por me conceder força e resiliência nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus orientadores Dr. Albert Icsang Ko e Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, por toda paciência e incentivo.

A toda minha família, esposa Jaqueline Cabral, meu filho João Gilberto e amigos por entender minha ausência e respeitar meus momentos de dificuldade.

A minha segunda família, IGM/FIOCRUZ/NEB onde sou e serei sempre grato por toda ajuda e companheirismo, e a biblioteca do IGM por toda ajuda quando necessário.

Aos meus recrutadores Dr. Federico Costa e Dr. José Hagan, os quais, no momento da entrevista para participação no projeto, conseguiram visualizar em mim uma oportunidade de desenvolvimento profissional, a vocês meu **MUITO OBRIGADO**.

SACRAMENTO, Gielson Almeida do. Avaliação do padrão sazonal da infecção assintomática por *Leptospira* spp. e das formas graves da leptospirose. 61 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO E OBJETIVO: A leptospirose é uma zoonose, causada pela bactéria *Leptospira*, de ampla distribuição e elevado impacto à saúde humana. As epidemias de leptospirose no Brasil acontecem a cada ano em áreas urbanas durante o período de chuvas sazonais. Porém não existem estudos que avaliem se as formas assintomáticas e/ou subclínicas seguem este padrão estacional relacionado a precipitação. O objetivo deste trabalho é determinar a incidência de infecção assintomática e de leptospirose grave durante diferentes períodos de precipitação em Salvador. **METODOLOGIA:** Realizamos cinco inquéritos sorológicos estacionais em uma coorte com 3176 habitantes na comunidade de Pau da Lima, Salvador – Bahia, para identificar infecções assintomáticas por *Leptospira* spp (2013-2015). Identificamos as novas infecções por soroconversão ou aumento de quatro vezes no título pelo teste de micro aglutinação (MAT), entre um período estacional chuvoso e outro. A incidência de casos hospitalizados de leptospirose na cidade de Salvador foi identificada através de vigilância ativa no Hospital Couto Maia no mesmo período da coorte. Comparamos as incidências de infecções assintomáticas e casos hospitalizados durante quatro períodos de seguimento: Fevereiro a Setembro 2013, Setembro a Março de 2014, em seguida no período de Março a Agosto de 2014 e Agosto de 2014 a Março de 2015. **RESULTADOS:** Durante o período do estudo identificamos 249 casos de infecções assintomáticas e 196 casos de leptospirose grave. A incidência de infecções assintomáticas foi maior no período de precipitação chuvosa menor, usando regressão linear simples, 6.84 (IC95%, 5.61 - 8.24); 4.09 (IC 95%, 3.18 - 5.18), quando comparada com o período de alta precipitação de chuvosa, 4.92 (IC95%, 3.85-6.19); 2.93 (IC 95%, 2.16- 3.88). Entretanto, o período considerado chuvoso esteve significativamente associado a aumento na incidência de leptospirose grave; 3.44 (IC95%, 2.77– 4.22) no primeiro período chuvoso e 1.50 (IC95%, 1.07–.04) no seguinte período. **CONCLUSÕES:** O padrão estacional pluviométrico apresentado no estudo para infecções assintomáticas e casos hospitalizados sugerem uma perspectiva inédita no ponto de vista da infecção assintomática, trazendo com isso, uma nova lacuna na compreensão atual sobre a transmissão da leptospirose a ser preenchida e na progressão da gravidade da doença.

Palavras-chave: *Leptospira*, Sazonalidade, Leptospirose, Pluviometria, Comunidade carente urbana.

SACRAMENTO, Gielson Almeida do. Seasonal pattern assessment in asymptomatic *Leptospira* spp. and in severe forms of leptospirosis. 61 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION AND AIM: Introduction and aim: Leptospirosis is a zoonosis caused by *Leptospira* bacteria, and has a wide distribution with a high impact to human health. Outbreaks of leptospirosis in Brazil occur each year in urban areas during the rainy season. However, there are no studies to assess whether the asymptomatic and/or subclinical follow this seasonal pattern related to precipitation. The aim of this study is to determine the incidence of asymptomatic infection and severe leptospirosis during different periods of rainfall in Salvador. **METHODOLOGY:** We conducted five seasonal serosurveys in a cohort of 3176 inhabitants in the community of Pau da Lima, Salvador-Bahia to identify asymptomatic infections by *Leptospira* (2013-2015). We identified infections by seroconversion or by fourfold increase in the titer observed with the microscopic agglutination test (MAT), between the rainy season and another seasonal period. The incidence of hospitalized cases of leptospirosis in the city of Salvador was identified through active surveillance in the Hospital Couto Maia during the same period as the cohort. We compared asymptomatic infection and incidence of hospitalized cases during four periods; February to September 2013, September to March 2014, then the period of March to August 2014 and August 2014 to March 2015. **RESULTS:** During the period of the study we identified 249 cases of asymptomatic infections and 196 cases of severe leptospirosis. Using linear regression, the incidence of asymptomatic infections was identified as higher during the period of lower rainfall, using linear regression, 6.84 (IC 95%, 5.61 - 8.24); 4.92 (IC 95%, 3.85-6.19) compared with the period of higher rainfall 4.09 (IC 95%, 3.18 - 5.18); 2.93 (IC 95%, 2.16-3.88). However, the rainy period considered was significantly associated with the number of severe cases of leptospirosis, 3.44 (IC 95%, 2.77– 4.22) in the first rainy period and 1.50 (IC 95%, 1.07–2.04) in the following. **CONCLUSIONS:** The seasonal pluviometric pattern presented for asymptomatic infections and hospitalized cases in the study suggests a novel perspective, exposing a gap in the current knowledge of leptospirosis on subclinical transmission of leptospirosis and progression of disease severity.

Key word: *Leptospira*, Seasonality, Leptospirosis, Pluviometry, Urban slums.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	ASPECTO HISTÓRICO	11
1.2	CARACTERÍSTICAS DO PATÓGENO.....	12
1.3	CICLO DE INFECCÃO	13
1.4	EPIDEMIOLOGIA.....	14
1.5	DETERMINANTES DA GRAVIDADE DA DOENÇA.....	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	GERAL	17
2.2	ESPECÍFICO	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	AValiação de infecção assintomática por leptospira.....	18
3.2	VIGILÂNCIA DE CASOS GRAVES DE LEPTOSPIROSE	19
3.3	DADOS PLUVIOMÉTRICOS	20
3.4	PLANO DE ANÁLISE	21
3.5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	22
4	MANUSCRITO	23
5	DISCUSSAO GERAL	47
6	CONCLUSÃO GERAL	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTO HISTÓRICO

A leptospirose, doença causada pela bactéria do gênero *Leptospira*, foi inicialmente conhecida como “infecção ictérica” e, na China antiga era também conhecida como icterícia da colheita do arroz. Historicamente, a doença acometia principalmente agricultores de arroz, militares, trabalhadores em redes de esgoto, mineiros e outras profissões em contato com água (FAINE et al., 1999).

A síndrome clínica foi descrita pela primeira vez no começo de 1800. Entretanto Adolf Weil (1886) na Alemanha foi o primeiro a caracterizar o quadro renal típico da doença. Após esta primeira caracterização, quadros clínicos similares foram descritos em vários países da Europa e outras regiões evidenciando uma ampla distribuição da doença (LEVETT, P N, 2001; BHARTI et al., 2003).

A bactéria do gênero *Leptospira* foi isolada de pacientes em 1915 por Ido, Inada e colaboradores no Japão (IDO, 1917; NOGUCHI, 1918). Simultaneamente, Hübener e Frome na Alemanha reportaram o isolamento do agente etiológico em cobaias infectadas com tecidos de pacientes com leptospirose. Ehrenberh, em 1938, criou o termo *Spirochaeta*, devido à forma alongada e espiralada da bactéria e de grande comprimento (IDO, 1917). Noguchi em 1918 observando diferenças morfológicas em microrganismos estudados, propõe o nome *Leptospira*. Os pesquisadores japoneses denominaram este organismo como *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, já Hüberner e Reiter denominaram, por sua forma nodal de *Spirochaeta nodosa* (NOGUCHI, 1918). Johnson e Harris, em 1967, descreveram a diferenciação entre *Leptospira* saprofíticas e patogênicas (JOHNSON; HARRIS, 1967).

As leptospiras patogênicas possuem ciclos de vida que incluem animais e acidentalmente humanos, nos quais produz doença (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003; KO et al., 2009). A principal via de transmissão está associada ao contato com água e esgotos contaminados por reservatórios animais (IDO, 1917; NOGUCHI, 1918; CHANG et al., 1943). Os roedores foram identificados como os principais reservatórios (IDO, 1917). Estes animais apresentam colonização nos rins, e excretam a bactéria no ambiente através da urina (MONAHAN et al., 2008). Além disso, estes animais estão

associados à transmissão aos humanos, observada em estudos ecológicos e epidemiológicos (FARIA, DE et al., 2008; COSTA et al., 2014; HAGAN et al., 2016).

1.2 CARACTERÍSTICAS DO PATÓGENO

Noguchi descreveu as características das *Leptospiras*, particularmente sua morfologia helicoidal típica, e propôs um novo gênero, *Leptospira* (NOGUCHI, 1918). Este gênero se divide em dois grupos principais, *L. interrogans* que compreende as leptospiras patogênicas e *L. biflexa* que inclui organismos de vida livre e saprófitas isolados no meio ambiente (FAINE et al., 1999).

A morfologia do gênero *Leptospira* é composta por organismos com extensão longitudinal de 6 a 20 micrômetros e transversal de 0,1 micrômetros; são flexíveis, helicoidais e possuem extremidades em forma de gancho, com flagelos subterminais para motilidade. Estes organismos são visíveis em microscopia de campo escuro e não são corados com corantes convencionais (FAINE et al., 1999).

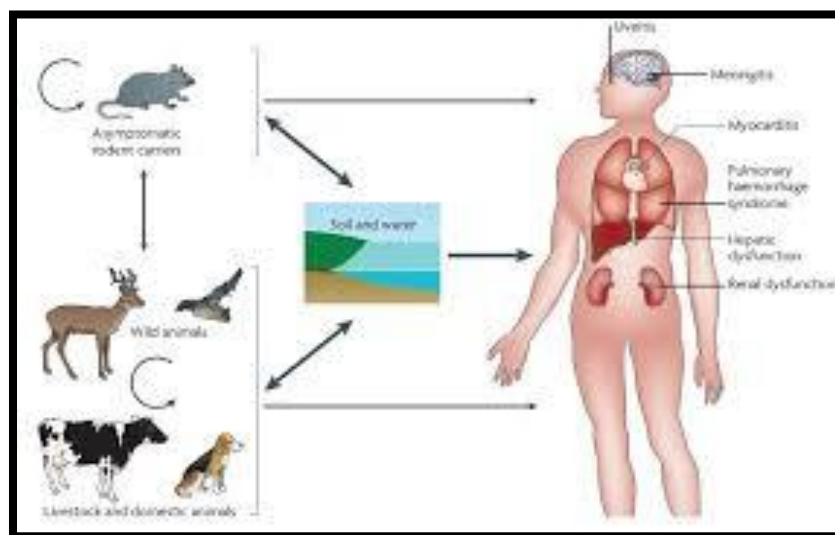
As leptospiras são obrigatoriamente aeróbias, crescem numa temperatura de 28° a 30°C e pH 7,2 a 7,6 e utilizam sais de amônia como fonte de nitrogênio e, ácidos graxos não saturados como fonte de carbono (FAINE et al., 1999). O crescimento em meio líquido apropriado pode ser confirmado sob microscopia, após um intervalo mínimo de 6 a 14 dias após a semeadura, porém este prazo pode variar. Estas características permitem as leptospiras patogênicas sobreviverem dentro e fora de hospedeiros, o que é essencial para a manutenção no ciclo de infecção (TRUEBA et al., 2004).

A taxonomia da *Leptospira* é complexa e tem como base, reações sorológicas ou por métodos moleculares (GANOZA et al., 2006; BACKSTEDT et al., 2015). Os métodos sorológicos permitem classificar o organismo em mais de 300 sorovares que por sua vez são classificados em aproximadamente 30 sorogrupos, Os métodos moleculares classificam leptospiras patogênicas em aproximadamente 20 genomoespécies, algumas são exclusivamente patogênicas, outras saprófitas e outras mistas (PASTUER, 2006)

1.3 CICLO DE INFECÇÃO

As leptospiros colonizam o rim de animais reservatórios de onde são liberadas no ambiente através da urina (KO et al., 2009). A lista de animais potencialmente reservatórios é extraordinariamente diversa e inclui centenas de animais silvestres, domésticos e sinantrópicos (VIJAYACHARI P, SUGUNAN AP, 2008; OLIVEIRA D., 2009). Caninos, suínos, bovinos, eqüinos, ovinos e caprinos são importantes reservatórios, porém os roedores são considerados os principais responsáveis por sua transmissão (**Figura 1**) (KO et al., 1999). O roedor sinantrópico *R. norvegicus* (ratazana de esgoto) é considerado o principal responsável pela transmissão do patógeno em área urbana (COSTA et al., 2014).

Figura 1. Ciclo de infecção da *Leptospira* (KO et al., 2009).



A dinâmica de transmissão nos reservatórios até o presente momento é limitado. Entretanto, alguns autores indicam vias de transmissão nos roedores sinantrópicos como a transplacentária, o aleitamento materno, as vias sexual e ambiental (CASTRO et al., 2009; COSTA et al., 2014; OLIVEIRA, DE et al., 2016). Esta última seria a mais importante para o homem, e estudos prévios sugerem que a transmissão ambiental em humanos está associada a populações com maior colonização renal e maior excreção de leptospiros dentre as populações de reservatórios (FAINE et al., 1999; ATHANAZIO et al., 2008). O ser humano é um hospedeiro acidental e a infecção acontece ao entrar em

contato direto ou indireto com ambiente (água e solo) contaminados pelas excretas de reservatórios sinantrópicos (COSTA et al., 2014).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose possui distribuição global e é considerada a zoonose mais difundida mundialmente, sendo descritos mais de um milhão de casos e 50.000 mortos por ano (KO et al., 1999; LEVETT, PAUL N, 2001; COSTA et al., 2015). A doença está associada a países de clima tropical, onde ocorrem aumento na incidência e frequência de surtos, que tem sido relacionados a índices pluviométricos elevados, chuvas estacionais e desastres climáticos como furacões e enchentes (PAPPACHAN et al., 2004; GAYNOR et al., 2007; WEINBERGER et al., 2014).

Tradicionalmente, a leptospirose é considerada uma doença rural, comumente associada a agricultores de subsistência, no passado, também afetou grupos de risco específicos como soldados, limpadores de esgotos, catadores, e trabalhadores de abatedouros (FAINE et al., 1999). Porém, devido as mudanças demográficas desde a década de 1950, este padrão tem se modificado, atingindo comunidades urbanas carentes (KO et al., 1999; FELZEMBURGH et al., 2014; HAGAN et al., 2016), o reflexo deste crescimento desordenado, sem saneamento básico e infraestrutura sanitária precária tem em uma perspectiva populacional que passa de 2.5 bilhões em 2010 para 5.3 bilhões até 2050 (UN-HABITAT, 2010) em condições favoráveis para transmissão, e com alta infestação de roedores reservatórios (FELZEMBURGH et al., 2014; COSTA et al., 2014). propiciando um significativo aumento do número de casos de hospitalização por leptospirose no mundo e no Brasil consequentemente (VERNE et al., 2012), em períodos de alta pluviosidade (PAPPACHAN et al., 2004; COSTA et al., 2015).

Na Bahia, esta situação se confirma, pois o número de casos cresce desde a década de 90, estudos temporais contribuíram para a identificação da soro prevalência em Salvador (DIAS et al., 2007) e de casos hospitalizados e óbito (RIBEIRO, 2008; GOUVEIA et al., 2008; PAPLOSKI, 2013), inclusive com quadros graves da doença, no hospital de referência do estado para doenças infectocontagiosas, Hospital Couto Maia (GOUVEIA et al., 2008).

1.5 DETERMINANTES DA GRAVIDADE DA DOENÇA

A infecção por *Leptospira* patogênica produz inúmeros sinais e sintomas clínicos que, em humanos, podem variar desde uma infecção subclínica ou auto referida até formas graves que são potencialmente fatais (GOUVEIA et al., 2008). A forma grave denominada síndrome de Weil representa entre 5 a 10% do total de casos, com uma taxa de letalidade variando de 5 a 20%. Ainda, as formas mais graves podem evoluir para disfunção de múltiplos órgãos e sepse, incluindo a hemorragia pulmonar, cuja letalidade pode chegar a 50% (GOUVEIA et al., 2008).

Existem poucos estudos que avaliem a taxa de infecção-doença. Um estudo no Brasil identificou que 3% da população em áreas de risco é infectada assintomaticamente a cada ano. Aproximadamente um em 30 dos infectados desenvolve formas leves (febre e dores musculares) da doença e 1/191 dos infectados desenvolve formas graves (FELZEMBURGH et al., 2014). Entre os graves uma fração, cerca de 10%, desenvolve quadros mais graves e morre (GOUVEIA et al., 2008). Entretanto não são conhecidos os fatores que determinam o adoecimento de algumas pessoas e de outras não, ou que algumas adoçam de forma mais grave.

De modo geral a gravidade da doença em indivíduos infectados pode depender de diferentes fatores: o agente (cepas de diferente virulência), o tamanho do inóculo (por exemplo a concentração do patógeno à que uma pessoa foi exposta) ou as características do hospedeiro (imunidade, etc) (FAINE et al., 1999; SANTOS, 2015; Lindow,J,. in published). Estes podem atuar de forma isolada ou em conjunto. Cepas isoladas de pacientes de Salvador com formas leve e grave de leptospirose mostraram características genéticas idênticas sugerindo que as diferenças nas formas clínicas não estão relacionadas a variações no patógeno (SANTOS, 2015). Os fatores do hospedeiro podem estar relacionados às diversas formas clínicas, entretanto ainda não existem estudos mostrando estarem associados com a ocorrência de leptospirose (Lindow,J,. in published). Em paralelo, indicadores do efeito dose-inóculo, como a distância da residência a esgotos abertos, tem sido identificados como fatores de risco para infecção assintomática e para formas graves da leptospirose (SARKAR et al., 2002; REIS et al., 2008; FELZEMBURGH et al., 2014). Porém, existem poucos estudos que avaliem o papel do inóculo na determinação da gravidade desta doença.

A leptospirose tem sido associada historicamente com a chuva. O aumento na incidência de casos graves durante as estações chuvosas representa um padrão conhecido mundialmente (KUPEK et al., 2000; PAPPACHAN et al., 2004; DESVARIS et al., 2011; WEINBERGER et al., 2014). Adicionalmente, surtos associados a elevadas precipitações ou eventos climáticos extremos suportam esta associação (MEITES et al., 2004; PAPPACHAN et al., 2004; SZONYI, 2012; ROTH et al., 2014). Porém não existem estudos que avaliem se as formas assintomáticas e/ou subclínicas seguem este padrão estacional relacionado a precipitação. A caracterização estacional das formas assintomáticas e graves em conjunto, é importante para determinar se fatores como a intensidade pluviométrica estão associados ao aumento na frequência de transmissão, no aumento das formas graves ou em ambos os eventos. Especificamente, é desconhecido se fatores climáticos, como precipitações sazonais, estão relacionados a transmissão da *Leptospira*, ou se, adicionalmente, através de uma relação dose-inóculo, podem determinar a gravidade do desfecho clínico.

A relevância da definição do papel da transmissão da doença na história natural da leptospirose urbana serve para guiar estratégias de prevenção da transmissão assintomática e das formas graves da leptospirose, e permitirá melhorar o entendimento dos fatores que determinam a progressão da infecção para formas graves da doença. Neste trabalho pretendemos descrever a influência da chuva no risco de infecção assintomática e de desenvolvimento de formas graves da leptospirose ao comparar as incidências de infecções assintomáticas e casos de hospitalização para leptospirose, de acordo com a sazonalidade média de pluviosidade.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a existência de um padrão sazonal na infecção assintomática por *Leptospira* spp. e sua relação com o padrão das formas graves da doença.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a incidência de infecção assintomática por *Leptospira* spp em dois períodos de alta e dois períodos de baixa pluviometria, através de um estudo de coorte com cinco inquéritos estacionais em uma comunidade carente de Pau da Lima – Salvador-Bahia.
- Determinar a incidência em dois períodos de alta e dois períodos de baixa pluviometria, de casos hospitalizados de leptospirose identificados em uma vigilância hospitalar na cidade de Salvador.
- Avaliar se infecção assintomática e os casos hospitalizados seguem padrões sazonais similares ou diferentes e sua relação com a precipitação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A equipe de estudos da leptospirose do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LBPM) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM) vem desenvolvendo estudos prospectivos de coorte intitulados “Historia Natural da Leptospirose Urbana” e “Eco epidemiologia da Leptospirose Urbana” que incluem avaliações sorológicas prospectivas para avaliar infecções por *Leptospira* em moradores do bairro de Pau da Lima incluídos no estudo de coorte. Em paralelo, outros projetos do grupo identificam os casos graves da doença através de vigilância hospitalar localizada no Hospital Couto Maia, este, referência em doenças infectocontagiosas no estado da Bahia.

3.1 AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA POR LEPTOSPIRA

3.1.1 Área de estudo: A área de estudo está situada no bairro de Pau da Lima. Amplamente descrita em estudos prévios (RIBEIRO, 2008; REIS et al., 2008; FELZEMBURGH et al., 2014), a área delimitada para o estudo possui elevada densidade populacional, evidenciado no último censo realizado pela equipe do laboratório, onde foram identificadas 3176 pessoas em 0.14km². Inclui três vales de características ambientais e geográficas similares e distância ao fundo do vale de até 35 metros. Possui baixos indicadores socioeconômicos, por exemplo, baixa renda per capita média, 11% da população recebe menos de um salário mínimo (FELZEMBURGH et al., 2014). Adicionalmente esta região sofre de deficiências ambientais como falta de saneamento básico e elevada infestação de roedores. A Fiocruz desenvolve estudos longitudinais nesta comunidade desde o ano de 2003 (RIBEIRO, 2008; REIS et al., 2008; FELZEMBURGH et al., 2014; COSTA et al., 2014) que permitiram caracterizar a incidência de infecção anual por *Leptospira* (37,8/1.000 habitantes) e a incidência de casos graves (19.8/ 100.000 habitantes) na área do estudo (FELZEMBURGH et al., 2014).

3.1.2 Desenho de estudo: Foi realizado um censo inicial entre Setembro e Novembro de 2012 para cadastro de todos os residentes da área de estudo. Para avaliar infecções assintomáticas estacionais, foi desenvolvido um estudo de coorte com avaliações sorológicas de todos os indivíduos que consentiram participação, no período considerado de alta precipitação (Agosto a Outubro) e baixa precipitação (Janeiro a

Março) de 2013 a 2015. Durante estes períodos foram realizados cinco soroinquéritos com média de duração de três meses, que permitiram a realização de quatro avaliações de seguimento (follow-up) com a determinação da incidências em cada um deles. A equipe de campo composta por 12-16 flebotomistas e técnicos da área de saúde, aplicaram questionário padronizado e coletaram amostras sorológicas dos indivíduos que consentiram em participar do estudo.

Foram considerados participantes da coorte aqueles moradores com idade maior ou igual a 5 anos, que dormiram mais de 3 noites na residência por semana e que tiveram termo de consentimento livre e esclarecido, assinado. Durante cada visita realizada para o soroinquérito, foram coletados dados epidemiológicos, sócio econômicos e uma amostra de sangue de 10 ml, dos indivíduos em tubo seco para diagnóstico de infecção, respeitando a condição de saúde do participante.

3.1.3 Identificação prospectiva de infecção por *Leptospira*: Foi utilizado o teste de micro aglutinação (MAT) que é considerado o método sorológico padrão “ouro” para o diagnóstico da leptospirose e a classificação do provável sorovar infectante (FAINE et al., 1999). Foi Utilizado um painel com duas cepas de referência, *L. interrogans* sorovar Copenhageni, cepa L1 130 e *L.kirschneri* sorogrupo Cynopteri cepa 3522C. A escolha deste painel foi definida após a confirmação da infecção por estes sorovares serem presentes em mais de 90% das amostras da coorte (Dados não publicados). As amostras foram triadas em diluições com títulos $\geq 1:50$ e quando aglutinadas, foram avaliadas para determinação de seu máximo título.

A ausência de sintomas clínicos que levassem o participante a ser hospitalizado foi considerada como fator determinante para denominar infecção assintomática e/ou subclínica. que foi definida como a ocorrência de soroconversão entre o teste MAT negativo para um título (1:50) ou aumento de quatro vezes no título da MAT entre amostras consecutivas desses pacientes.

3.2 VIGILÂNCIA DE CASOS GRAVES DE LEPTOSPIROSE

3.2.1 Área de estudo: Para este desfecho a área de estudo foi a cidade de Salvador.

3.2.2 Identificação de casos de leptospirose grave: Com início em 1996, a equipe da Fiocruz montou um programa para vigilância aprimorada para os casos suspeitos de

leptospirose admitidos no Hospital Couto Maia e vem desde então identificando pacientes com suspeita clínica da doença. Esta vigilância permanece atualmente ativa. Quando é confirmada a suspeita de leptospirose em um paciente que apresenta os critérios para inclusão no estudo (descritos abaixo), este indivíduo é convidado a integrar o estudo, e quando aceita ele assina um termo de consentimento livre e esclarecido. A equipe obtém informações clínicas e laboratoriais na vigilância, e epidemiológicas nos domicílios dos casos confirmados, pois são realizadas visitas domiciliares após a alta médica. Além disso, é feita coleta de sangue para avaliação sorológica na fase aguda, aguda tardia e convalescente, para confirmação laboratorial de leptospirose. As visitas domiciliares realizadas após a alta hospitalar, tem o objetivo de mapear seu local de residência e identificar fatores epidemiológicos peridomiciliares (KO et al., 1999; GOUVEIA et al., 2008).

Foram incluídos no estudo pacientes do município de Salvador, com suspeita clínica para leptospirose e que atenderam aos seguintes critérios de inclusão: forte suspeita clínica para leptospirose, como febre aguda associada com qualquer sangramento; insuficiência renal aguda; icterícia; ou lesão hepática aguda com transaminases <1.000 U / L (NABITY et al., 2012); ter idade ≥ 5 anos e termo de consentimento livre e esclarecido assinado (GOUVEIA et al., 2008).

Os casos de leptospirose foram confirmados laboratorialmente através dos seguintes critérios: A) Resultado do teste Elisa IgM reagente B) MAT realizada com amostra aguda com titulação maior ou igual 1:800 e/ou soroconversão ou aumento de quatro vezes no título da MAT entre as amostras aguda e convalescente (utilizando um painel de referência com 10 cepas de oito sorogrupos) C) Isolamento de leptospira em cultura e D) PCR positiva para detecção do DNA bacteriano (KO et al., 1999; GOUVEIA et al., 2008).

a. Dados pluviométricos

Dados de pluviosidade foram coletados da estação meteorológica do Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Bahia (INEMA), situada na Avenida Mario Leal Ferreira (Paralela), no Parque de Exposição da Bahia. Adicionalmente, outra estação meteorológica foi instalada na unidade de emergência de São Marcos para medir a densidade de chuva na área de estudo.

b. Plano de Análise

Os cálculos das incidências de infecções no estudo de coorte foram realizados de forma sazonal para cada período de seguimento. Os cinco inquéritos sorológicos realizados entre 2013 e 2015, permitiram avaliar quatro períodos, estes períodos foram denominados de seguimento (follow-up), e foram definidos inicialmente através da mediana entre as datas de coleta em cada inquérito sorológico e, dessa forma foram calculadas e descritas as incidências por seguimento. Adicionalmente foram refeitas as análises por pessoa – ano, como forma de estabelecer uma incidência fidedigna para cada seguimento. E dividido pelo total de indivíduos seguidos por período (tabela 1), multiplicado por 100 habitantes, sendo descrito o risco relativo estratificado por sexo e idade (Tabela suplementar 4-7).

A incidência de casos hospitalizados de leptospirose foi calculada através do número de casos confirmados laboratorialmente (como descrito acima), adicionalmente foi usada a base do SINAN para os casos de Salvador, dividido pela população de Salvador (IBGE 2014), e multiplicado por 100.000 habitantes. Em análise complementar (tabela suplementar S2), da data de internamento foram subtraídos 15 dias para calcular desta forma a data estimada da infecção (KO et al., 2009). Este cálculo também foi realizado para estimar períodos estacionais no cálculo da incidência de infecção assintomática e casos graves. Foi estimada a média mensal de chuva para o período avaliado, utilizando os dados diários da estação meteorológica do INEMA e de Pau da Lima.

O uso do software Redcap (HARRIS et al., 2009) como base de armazenamento dos dados e controle da segurança da informação, e minimização de possíveis erros de digitação foram controlados com dupla digitação. O ambiente R (TEAM, 2011), apresenta pacotes específicos para as análises de dados epidemiológicos, sendo usado o pacote EPIR, para análises epidemiológicas univariada e/ou multivariada, bem como, foi utilizado o pacote GGLOT para plotagem das figuras e representações gráficas.

A regressão linear foi feita para correlação entre a intensidade de chuva e ocorrência de casos hospitalizados e infecção subclínica usando o modelo linear de análise. O modelo linear generalizado (GLM) e o modelo de equação estimada de generalização (GEE), foram utilizados para análises individuais. As variáveis sexo e faixa etária foram usadas no modelo GLM e GEE, para avaliar quanto chuva influenciaria na análise multivariada.

c. Considerações éticas

Os dados analisados no presente estudo, fazem parte de um maior que foi aprovado nos comitês de ética em pesquisa do IGM-Fiocruz, e Universidade de Yale (HIC#1006006956), EUA, além da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Todos os procedimentos da pesquisa seguiram os termos da resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa em seres humanos. A participação no projeto foi voluntária, após todos serem esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, bem como dos riscos inerentes a sua participação. Todos participantes ou responsáveis legais dos menores de idade assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4 MANUSCRITO

Inesperada elevação na incidência de leptospirose subclínica durante o período inter epidêmico em Salvador, Brasil.

Artigo a ser submetido para publicação

Resumo

Casos de leptospirose grave ocorrem durante o período de alta pluviometria, embora existam poucos estudos para avaliar a influência da ocorrências de chuva nas infecções subclínicas. Quando são comparadas as incidências de casos graves hospitalizados 4.09 (IC95%, 3.18-5.18) e a ocorrência de infecção subclínica 6.84 (IC 95%, 5.61-8.24) com o padrão de precipitação, detectamos uma alta incidência de infecção subclínica durante o período “seco”. Este padrão sugere uma lacuna na compreensão atual sobre a transmissão de leptospirose subclínica e na progressão da gravidade da doença.

Palavras Chave: Leptospiroses, *Leptospira*, comunidade carente urbana, Infecções estacionais, Infecções assintomáticas.

Title: Unexpected high incidence of leptospirosis infection during inter-epidemic periods in Salvador, Brazil

Gielson Almeida Sacramento¹, Kathryn Hacker², Jaqueline Cabral Soares¹, Nivison Nery Júnior¹, Mayara Carvalho¹, Elsio Wunder², Federico Costa¹⁻³, Jose Hagan¹, Janet C. Lindow¹⁻², Mitermayer G. Reis¹, and Albert I. Ko¹⁻²

¹Research Center Gonçalo Moniz, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health Salvador, Brazil

²Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public Health, Yale University, New Haven, CT, USA.

³ Institute of collective Health, Federal University of Bahia, UFBA, Salvador, Brazil

Abstract

Symptomatic leptospirosis cases occur following periods of heavy rainfall. However, there is a lack of studies evaluating how rainfall influences leptospirosis infection or disease severity. When we compared the incidence of hospitalized cases 4.09 (IC 95%, 3.18-5.18) and subclinical infections 6.84 (IC 95%, 5.61-8.24), we detected an unexpected pattern of higher subclinical infection during the dry seasons when compared to rainy seasons. This pattern suggests a gap in our current understanding of leptospirosis transmission and progression of disease severity.

Keywords

Leptospirosis, *Leptospira*, urban slums, seasonal infection, asymptomatic infection

Introduction

Leptospirosis, a leading zoonotic cause of global morbidity and mortality, causes over 1.03 million leptospirosis cases and 58,900 deaths annually, primarily in populations residing in resource-poor settings (1-3). The spirochetal agent is a diverse group of *Leptospira* species capable of colonizing a wide variety of animal hosts, including rats (3). While previously considered a rural disease, urbanization has shifted the leptospirosis to cities, where epidemics occur annually and are strongly associated with rainfall and flooding events (4-6).

In Salvador, the third largest city in Brazil, a single strain, *L. interrogans* serovar Copenhageni, causes the majority of leptospirosis cases (7). Transmission occurs primarily in the household environment through direct contact with water or soil contaminated with rat urine, the principal reservoir host for the bacteria (5, 8-10). While distance to open sewers, mud, and flooding are risk factors for leptospirosis transmission (7), no study has determined whether rainfall affects the severity of leptospirosis infection. Since leptospirosis outbreaks are traditionally associated with flooding, we assessed how rainfall specifically influences leptospirosis transmission in endemic areas. We therefore compared the seasonal incidence of subclinical *Leptospira* infection among a cohort of urban slum dwellers to the seasonal incidence of citywide hospitalized leptospirosis cases and evaluated their associations with rainfall. This enabled us for the first time to directly compare seasonal patterns of subclinical leptospirosis incidence and severe disease in an endemic setting.

The Study

To ascertain serologic evidence of *Leptospira* subclinical infection, we conducted a two year (February 2013-March 2015) prospective cohort study in the Brazilian urban slum of Pau da Lima (13°32'53.47" S; 38°43'51.10" W) in Salvador. The study site, described previously (11), has physical and socioeconomic features similar to urban slums throughout Brazil and other developing countries (7). The participants were included in the study cohort if they resided within 35m of the valley bottom, were at least five years old, slept on average three nights per week within the study area, provided written informed consent, and serum was successfully collected at one of the four follow-up events during the study period. We defined a completed follow-up event as collection of two consecutive serum samples from a participant. During the study period, 3,716 residents met the criteria for inclusion in the cohort study and 2,421 were successfully recruited for the first follow-up period. **Table 1** describes the number of participants that successfully completed a follow-up event and the number of participants that were lost-to-follow up.

We determined the titers of agglutinating antibodies against two pathogenic *Leptospira* strains, *L. interrogans* serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae, using the Microscopic Agglutination Test (MAT). We defined an infection event as an MAT titer increase from negative to $\geq 1:50$ (seroconversion) or a four-fold increase in MAT titer between sequential paired samples, and when agglutinated were determined its highest titer.

To compare the temporal relationship between incidence of subclinical *Leptospira* infection and incidence of hospitalized leptospirosis cases, we defined four-time periods

based on the four cohort study follow-up surveys. We defined each period using the date when the median numbers of participants were enrolled, which corresponded to two wet seasons, and two dry seasons (vertical lines Fig 1A &B). Variation in the duration of the study periods occurred due to differing enrollment times. The mean number of days between sero-surveys was 185 days. However, each of the time periods captured the months when traditionally rainfall is heaviest (April to July, rainy season) and lightest (September to December, dry season) respectively (Fig 1A). We obtained rainfall information (mean rainfall) for the four follow-up periods from weather stations maintained by the Brazilian Institute for the Environment and Water Resources (Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hidricos) located in Canabrava community 1.6 km from the Pau da Lima study site (12).

To identify patients with hospitalized leptospirosis, we analyzed data from two sources. First, our study team in Salvador, Brazil conducts active surveillance for hospitalized leptospirosis cases through a state-run infectious-disease hospital. Secondly, we searched the Brazilian Ministry of Health, Sistema de Notificação de Agravos (SINAN), which records all probable cases of leptospirosis recorded at other city hospitals (cases from SINAM were included in order to recruit leptospirosis cases that were hospitalized in others hospitals than the state-run infectious-disease hospital). We identified patients according to surveillance case definitions and defined cases of leptospirosis based on laboratory confirmation using previously described methods (3, 5, 13): “confirmed” cases had one or more positive laboratory test for leptospirosis; “probable” cases, identified at the reference hospital, had clinical suspicion, but no laboratory confirmation (Fig 1B).

Consistent with patterns observed previously in Brazil (4, 5) and elsewhere (2, 6, 14), mean monthly rainfall (Figure 1A) was significantly associated with monthly hospitalized

leptospirosis cases (Figure 1B, 2B). Higher follow-up period hospitalized leptospirosis cases incidence also corresponded to the follow-up period with the heaviest rainfall (period 1), and decreased during drier seasons (periods 2 and 4) (Fig 1C, 1D, 2A and Table 2).

To assess the correlation of rainfall on the risk of subclinical *Leptospira* infection, we calculated the cumulative amount of rainfall each study participant was exposed to between each of the paired sero-survey events. When we analyzed the association between subclinical infection and cumulative rainfall by period (Table S1), we surprisingly found that *Leptospira* infection was negatively associated with rainfall (Table 2). Indeed, the highest incidences occurred during the dry seasons (periods 2 and 4) (Figure 1C, 1E, 2C and Table 2). This finding is starkly contrasted to patterns we and others have identified for hospitalized leptospirosis (2, 4-6, 14).

The period of leptospiremia (between 7-14 days) may introduce a bias in the identification of the infection period for each individual (both subclinical infections and hospitalized cases). To address this concern we subtracted 15 days to each serum collection date (to correct for infection period) and repeated these aggregated analysis obtaining a similar pattern as described above (Table S2).

Additionally, we confirmed those aggregated results by assessing the association between exposure to rainfall and *Leptospira* subclinical infection at individual level. We used a generalized estimating equation accounting for dependency at the individual, across the four repeated measures (or time periods) and controlling for gender and age. These individual analyses also identified a negative association between the level of rainfall and *Leptospira* subclinical infection (Table S3), supporting the findings from the aggregated analyses (Figure 2C and Table 2).

Finally, the individual analysis, stratified at seasonal level, shown a demographic profile for subclinical infection and severe cases similar to results previously published (5, 7, 11). Briefly, increasing age and male gender were significantly associated with *Leptospira* subclinical infection and males older than >25 year had higher incidence of severe leptospirosis in all periods (Table S4-7).

Conclusions

Leptospirosis is traditionally associated with heavy rainfall and flooding events both in Brazil (4, 5) and worldwide (2, 6, 14). Our findings support that hospitalized leptospirosis cases follow rainfall events. However, we found that rainfall was slightly negatively associated with rainfall. This trend may indicate that specific reservoir host, immunogenic factors, or changes in population behavior may drive subclinical infection, rather than significant rainfall events. Previous studies support that rat abundance does not change seasonally (15), however rat movement may increase during dry periods resulting in persistent shedding of the bacterium in the environment and continual, low-level exposure for urban slum-dwellers. Alternatively, during heavy rainfall the rain may diffuse *Leptospira* from the soil and concentrate the bacteria, resulting in flooded areas where transmission events of larger inoculums could occur, thus increasing the risk of severe disease. Additional studies are needed to assess the specific contribution of human immunogenic and reservoir host factors that influence disease severity.

During our investigation, rainfall decreased throughout the study period, without a marked rainy or dry season, typical in tropical regions (Fig. 1C). While we identified an association between rainfall, subclinical leptospirosis infection, and hospitalized cases, a longer study period is necessary to identify seasonal trends in leptospirosis infection.

At the onset of this study, we anticipated identical patterns between hospitalized

leptospirosis cases and infections. Our findings indicate that leptospirosis infection and hospitalized cases have distinct transmission dynamics, which could influence measurements of disease burden. While this study does not specifically assess sub-clinical symptomatic infection, it provides further evidence that the burden of leptospirosis is greatly underestimated, and physicians should be aware that leptospirosis infection may present clinically year-round regardless of rainfall events. Furthermore, the unexpected high incidence of subclinical *Leptospira* infection during the periods of low rainfall indicates a critical gap in our current understanding of leptospirosis transmission and progression of disease severity.

Table 1: Description of 2,421 cohort participants according to their participation during the four prospective seasonal follow-up periods, at the urban slum study site, from 2013-2015.

	Follow-Up 1	Follow-Up 2	Follow-Up 3	Follow-Up 4
Season	Rainy	Dry	Rainy	Dry
Time period	Feb 2, 2013 - September 10, 2013	September 10, 2013 - March 14, 2014	March 14, 2014 - Aug 8, 2014	Aug 8, 2014 - March 3, 2015
Completed follow-up	1601	1492	1602	1401
No follow-up	651	608	356	617
1. Not found	250	281	112	314
2. Refusal to participate	171	158	71	125
3. Moved	230	167	166	174
4. Mental incapacity	0	2	2	1
5. Death	0	0	5	3

Table 2: Incidence for hospitalized cases of leptospirosis and cumulative incidence of subclinical *Leptospira* infection among a cohort of urban slum dwellers and the mean rainfall during the four follow-up periods.

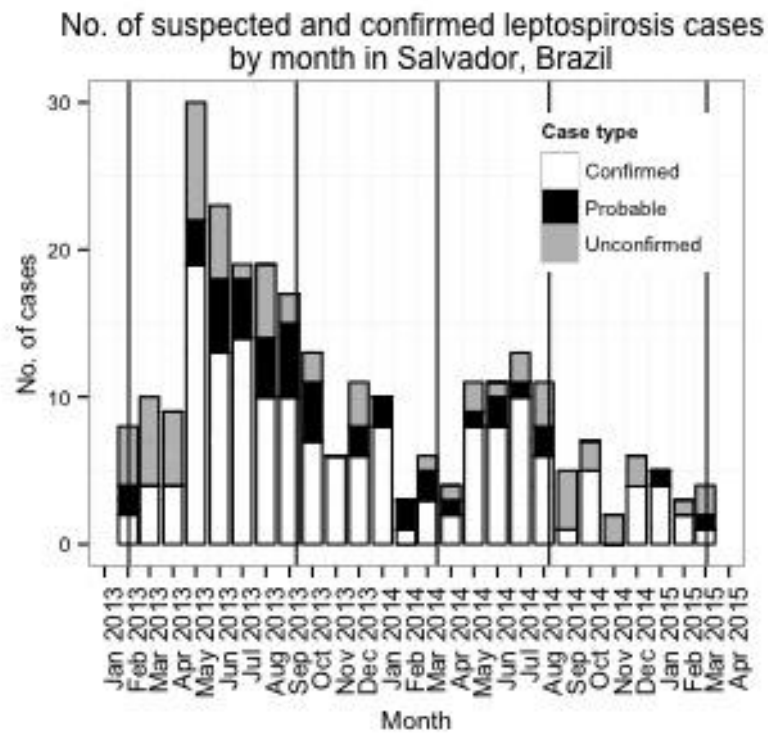
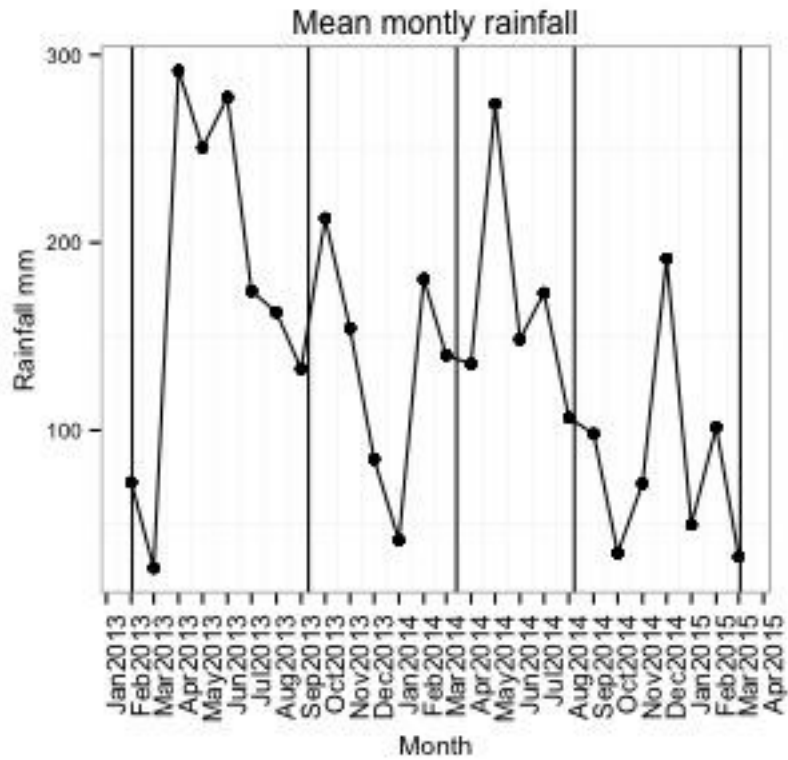
Time Period	Season	Mean Rainfall (SD)	Incidence of subclinical <i>Leptospira</i> infection per 100 (95% CI)	Incidence of leptospirosis hospitalized cases per 100,000 (95% CI)
Follow-Up 1	Rainy	165.3(186.30)	4.10(3.18 - 5.19)	3.44(2.77 – 4.22)
Follow-Up 2	Dry	120.1(92.35)	6.84(5.61 - 8.24)	1.72(1.26 – 2.29)
Follow-Up 3	Rainy	135.9(98.53)	2.94(2.17 - 3.89)	1.50(1.07 – 2.04)
Follow-Up 4	Dry	76.7(53.08)	4.93(3.85 - 6.19)	0.86(0.54 – 1.29)

Figures:

Figure 1: Differing temporal patterns of rainfall, subclinical leptospirosis infection, and hospitalized cases in Salvador, Brazil from February 2013 – March 2015. (A) Mean monthly rainfall - Mean monthly rainfall in Salvador, Brazil during study period (vertical lines represent the four follow-up time periods), (B) No. of probable, and confirmed hospitalized leptospirosis cases by month in Salvador, Brazil - cases reported by month reference hospital throughout Salvador, (C) Mean monthly rainfall by follow-up group– Mean rainfall recorded in Canabrava by month during each follow-up period. Data represents the mean \pm standard deviation, (D) Incidence of hospitalized cases - incidence of all hospitalized cases of leptospirosis for each follow-up period, (E) Cumulative incidence by follow-up period: Pau da Lima cohort - Cumulative incidence of subclinical leptospirosis for each follow-up period.

Figure 2: The association between the mean monthly rainfall and incidence of hospitalized leptospirosis cases and subclinical incidence of *Leptospira* infection. (A) Mean monthly rainfall vs. hospitalized leptospirosis incidence - evaluation of the association between the incidence of hospitalized cases and mean rainfall for the four follow-up periods. (B) Mean monthly rainfall vs. the number of hospitalized cases per month – relationship between of the number of hospitalized leptospirosis cases and mean monthly rainfall by month. (C) Mean monthly rainfall vs. cumulative leptospirosis incidence - examination of the relationship between subclinical *Leptospira* infection incidence among cohort participants and mean monthly rainfall for the four follow-up periods.

Figures
1A e 1B



Figures 1C e D

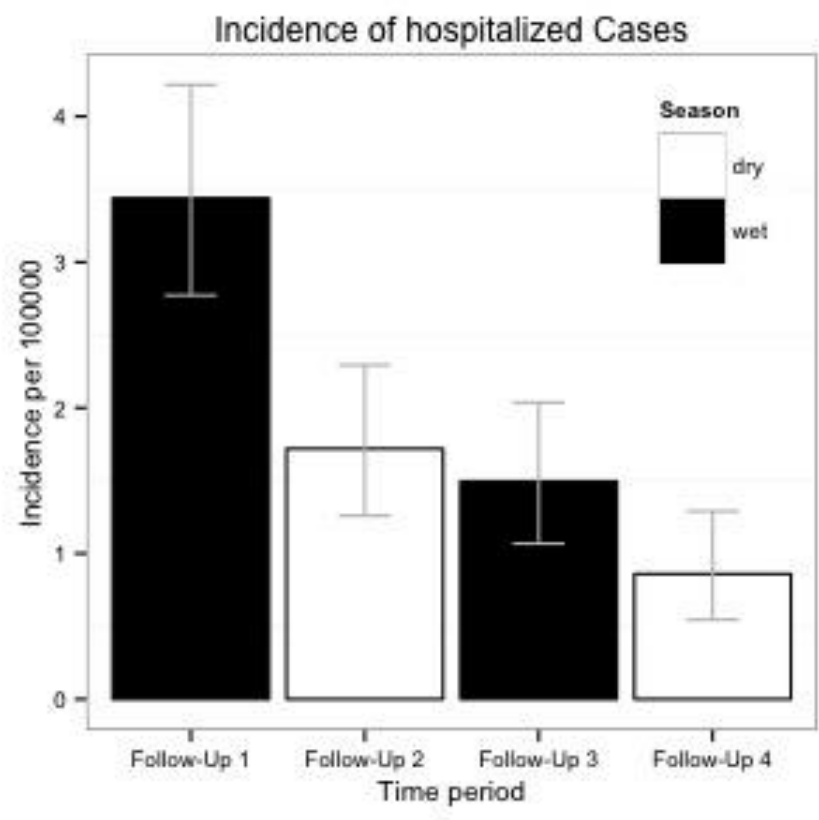
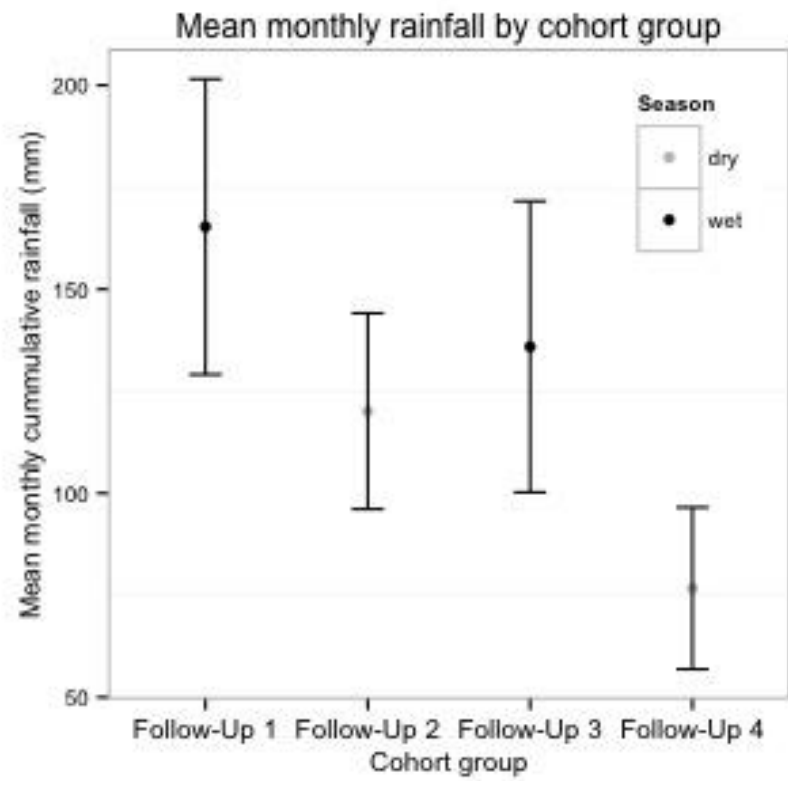
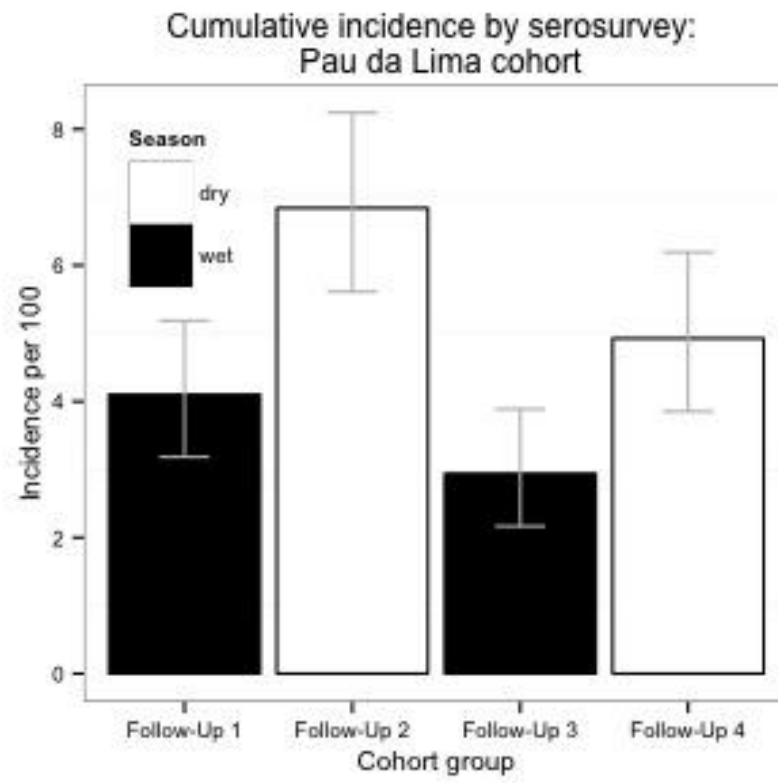
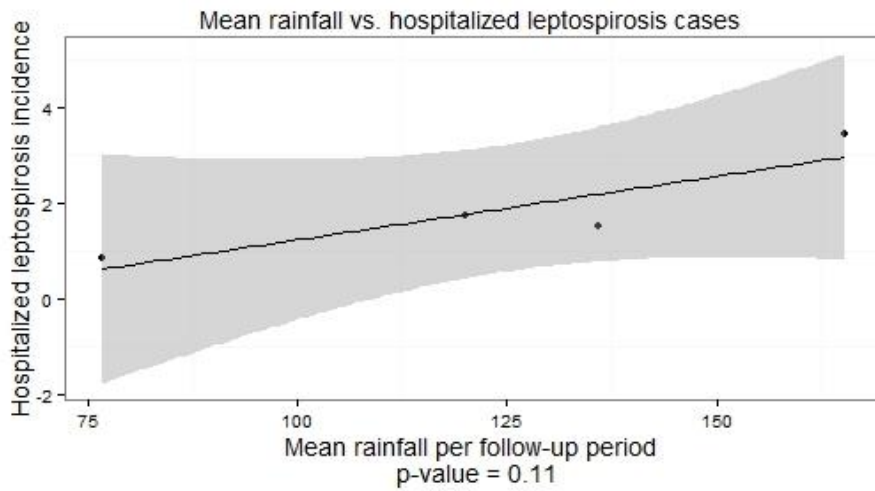


Figure 1E

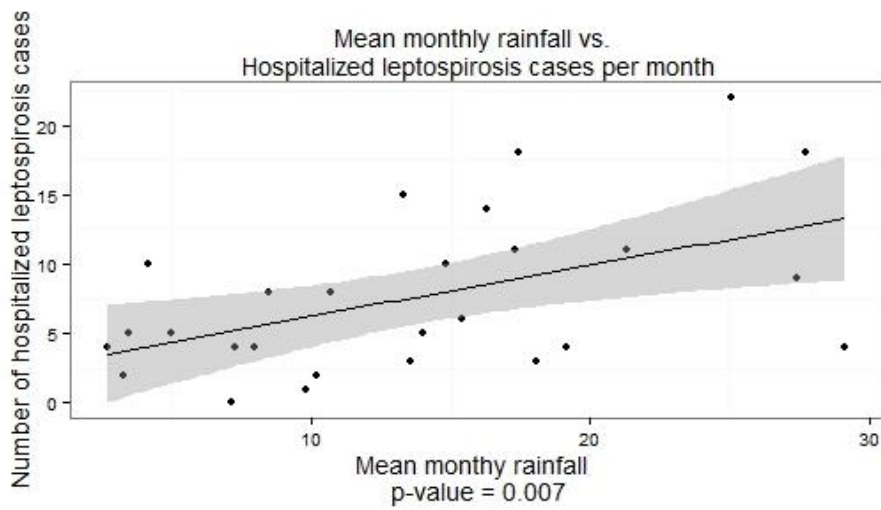


Figures 2A, 2B and 2C

2A)



2B)



2C)

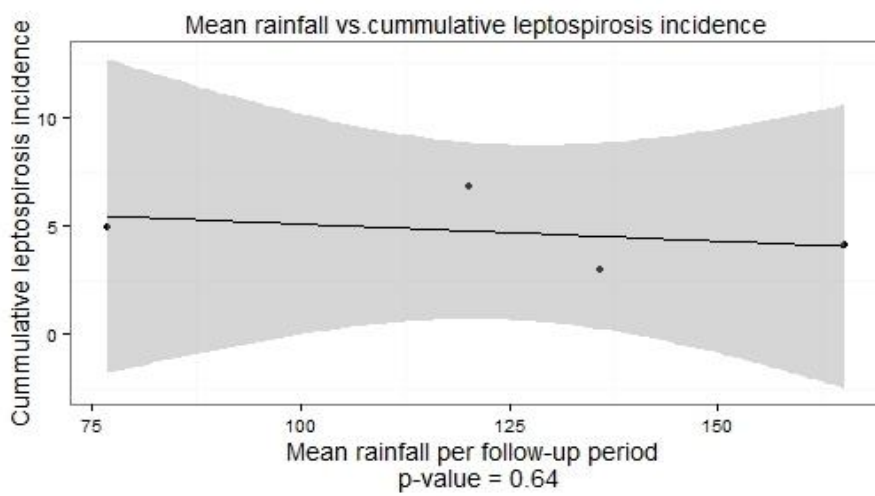


Table S1: Distribution of infections detected in each follow-up period by seroconversion or 4-fold increase of the paired title.

	Follow Up 1	Follow Up 2	Follow Up 3	Follow Up 4
Dates	Feb 2, 2013 - Sep 10, 2013	Sep 10, 2013 - March 14, 2014	March 14, 2014 - Aug 8, 2014	Aug 8, 2014 - March 3, 2014
Season	Rainy	Dry	Rainy	Dry
Study Population (CH)	1610	1491	1600	1401
all positives (+)	66	102	47	69
Seroconversion (SC)	50	93	36	55
Four-Found Title (FFT)	16	9	11	14

Table S2: Incidence for hospitalized leptospirosis and cumulative incidence of subclinical *Leptospira* infection among a cohort of urban slum dwellers and the mean cumulative rainfall during the four follow-up periods.

Follow-Up Period*	Dates (-15 days/person)	Cumulative Rainfall Total (SD)	Citywide Hospitalized Surveillance		Community Cohort	
			No. Cases	Cumulative Incidence/ 100,000 (95% CI)	No. Infected (Uninfected)	Cumulative Incidence /100 (95% CI)
Period 1	2/2/2013 - 9/10/2013	1256.65 (130.44)	88	3.29 (2.67 – 4.01)	44 (817)	5.11 (3.74 – 6.80)
Period 2	9/10/2013 - 3/14/2014	806.89 (207.38)	46	1.72 (1.26 – 2.29)	74 (787)	8.60 (6.81 – 10.67)
Period 3	3/14/2014 - 8/8/2014	925.17 (163.10)	40	1.50 (1.07 – 2.04)	18 (835)	2.09 (1.24 – 3.28)
Period 4	8/8/2014 - 3/3/2015	565.20 (108.15)	23	0.86 (0.54 - 1.29)	42 (819)	4.88 (3.54 – 6.54)

Table S3: Generalized Estimating Equation evaluating the association of age, gender, and period and rainfall as an interaction term on leptospirosis infection assuming a dependence on the individual level across the four repeated measures.

Variable	Odds Ratio (Lower Estimate – Upper Estimate)
Period	
Period 1	Ref
Period 2	0.91 (0.48 - 1.73)
Period 3	0.24 (0.12 - 0.45)
Period 4	0.35 (0.16 - 0.78)
Age	1.02 (1.01 -1.03)
Gender	1.98 (1.37 - 2.88)
Rainfall (m)	0.25 (0.10 - 0.62)

Supplemental Material - Relative risk from subclinical infection and severe cases stratified by sex and age by time period.

Table 4. Description of the rainy season pattern the cohort study at Pau da lima by gender and age.

Risk Factor	Follow- up 1 Leptospirosis Infection (N = 66)		Follow- up 1 Leptospirosis Hospitalized Case (N = 92)	
	No. Infections (%)	Relative Risk (95% CI)	No. Cases (%)	Relative Risk (95% CI)
Male Gender	38 (57.6%)	1.85 (1.15, 2.99)	79 (85.9%)	6.94 (3.86, 12.48)
Age Group				
5- 14	11 (16.7%)	Ref	1 (1.2%)	Ref
15-24	11 (16.7%)	1.28 (0.56, 2.93)	14 (15.2%)	11.59 (1.52, 88.14)
25-34	13 (19.7%)	1.63 (0.74, 3.60)	28 (30.4%)	19.76 (2.69, 145.26)
35 - 44	12 (18.2%)	2.09 (0.93, 4.65)	28 (30.4%)	26.07 (3.55, 191.64)
45 - 55	8 (12.1%)	1.98 (0.81, 4.85)	7 (7.6%)	8.29 (1.02, 67.37)
>55	11 (16.7%)	3.26 (1.44, 7.35)	13 (14.1%)	13.90 (1.82, 106.28)

Table 5. Description of the dry season pattern the cohort study at Pau da lima by gender and age.

Risk Factor	Follow- up 2 Leptospirosis Infection N = 102		Follow- up 2 Leptospirosis Hospitalized Case N = 46	
	No. Infections (%)	Relative Risk (95% CI)	No. Cases (%)	Relative Risk (95% CI)
Male Gender	53 (52.0%)	1.48 (1.02, 2.15)	35 (76.1%)	3.63 (1.85, 7.16)
Age Group				
5-14	17 (16.7%)	Ref	2 (4.3%)	Ref
15-24	14 (13.7%)	1.19 (0.60, 2.38)	9 (19.6%)	3.73 (0.80, 17.24)
25-34	23 (22.5%)	2.01 (1.09, 3.70)	10 (21.7%)	3.53 (0.77, 16.11)
35-44	21 (20.6%)	2.35 (1.26, 4.36)	12 (26.1%)	5.59 (1.25, 24.97)
45-55	13 (12.7%)	2.23 (1.11, 4.49)	6 (13.0%)	3.55 (0.72, 17.60)
>55	14 (13.7%)	2.69 (1.36, 5.31)	7 (15.2%)	3.74 (0.78, 18.02)

Table 6. Description of the rainy season pattern the cohort study at Pau da lima by gender and age.

Risk Factor	Follow- up 3 Leptospirosis Infection N = 47		Follow- up 3 Leptospirosis Hospitalized Case N = 40	
	No. Infections (%)	Risk Ratio (95% CI)	No. Cases (%)	Risk Ratio (95% CI)
Male Gender	29 (61.7%)	2.05 (1.15, 3.67)	36	10.28 (3.66, 28.89)
Age Group				
5-14	5 (10.6%)	Ref	0	Ref
15-24	8 (17.0%)	1.90 (0.63, 5.76)	9 (22.5%)	15.73 (0.92, 270.24)
25-34	14 (29.8%)	3.69 (1.34, 10.13)	9 (22.5%)	13.41 (0.78, 230.43)
35-44	12 (25.5%)	4.02 (1.43, 11.26)	8 (20%)	15.83 (0.91, 274.29)
45-55	5 (10.6%)	2.40 (0.70, 8.18)	8 (20%)	20.13 (1.16, 348.73)
>55	3 (6.4%)	1.69 (0.41, 7.00)	6 (15%)	13.90 (0.78, 246.80)

Table 7. Description of the dry season pattern the cohort study at Pau da lima by gender and age.

Risk Factor	Follow- up 4 Leptospirosis Infection N = 69		Follow- up 4 Leptospirosis Hospitalized Case N = 23	
	No. Infections (%)	Risk Ratio (95% CI)	No. Cases (%)	Risk Ratio (95% CI)
Male Gender	43 (62.3%)	2.15 (1.34, 3.46)	21 (91.3%)	12.00 (2.81, 51.16)
Age Group				
5-14	7 (10.1%)	Ref	0	Ref
15-24	10 (14.5%)	1.81 (0.70, 4.69)	4 (17.4%)	7.45 (0.40, 138.39)
25-34	18 (26.1%)	3.50 (1.48, 8.27)	3 (13.0%)	4.94 (0.26, 95.66)
35-44	12 (17.4%)	2.90 (1.16, 7.27)	10 (43.5%)	19.56 (1.15, 333.74)
45-55	6 (8.7%)	2.12 (0.72, 6.21)	4 (17.4%)	10.66 (0.57, 197.93)
>55	16 (23.2%)	5.85 (2.46, 13.92)	2 (8.7%)	5.35 (0.26, 111.39)

References

1. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003 Dec;3(12):757-71.
2. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep;9(9):e0003898.
3. McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Oct;18(5):376-86.
4. Flannery B, Pereira MM, Velloso LD, Carvalho CD, De Codes LG, Orrico GD, et al. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Nov;65(5):657-63.
5. Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson WD, Riley LW, Grp SLS. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*. 1999 Sep 4;354(9181):820-5.
6. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 Oct;104(10):631-8.
7. Hagan JE, Moraga P, Costa F, Capian N, Ribeiro GS, Wunder EA, Jr., et al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year

- Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan;10(1):e0004275.
8. Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG, Riley LW. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):191-5.
 9. de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*. 2008 Oct;108(1):1-5.
 10. Tucunduva de Faria M, Athanazio DA, Goncalves Ramos EA, Silva EF, Reis MG, Ko AI. Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *Journal of comparative pathology*. 2007 Nov;137(4):231-8.
 11. Felzemburgh RD, Ribeiro GS, Costa F, Reis RB, Hagan JE, Melendez AX, et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2927.
 12. Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hidricos. Salvador, Brazil: Instituto Do Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

13. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I, et al.
Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 May;66(5):605-10.

14. Victoriano AF, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis.* 2009;9:147.

5 DISCUSSAO GERAL

Poucos estudos tem tentado avaliar a associação sazonal da chuva entre os diferentes desfechos clínicos da leptospirose. Este é o primeiro estudo a realizar uma avaliação prospectiva estacional da infecção assintomática por *Leptospira*. Adicionalmente a comparação da ocorrência de casos assintomáticos com a ocorrência de casos graves hospitalizados de leptospirose permitiram obter resultados inovadores sobre os determinantes climáticos desta zoonose.

Foram observadas incidências subclínicas mais elevadas durante o período de baixa precipitação (seco) em relação ao período de alta precipitação (chuvoso). Estes dados contrastaram com o padrão de leptospirose grave clássico observado em Salvador e em outros locais do mundo (PAPPACHAN et al., 2004; GAYNOR et al., 2007; LAU et al., 2012). A avaliação estacional permitiu também comparar e discutir que a transmissão nesta área é maior ao que havia sido previamente observado em estudos anuais (HAGAN et al., 2016). Estes achados permitirão a definição de novas hipóteses sobre a transmissão da leptospirose nas comunidades carentes urbanas e sua relação com a precipitação na determinação da gravidade do desfecho da doença.

Contrário à nossa hipótese inicial, no período seco o padrão de incidência de infecção assintomática foi maior que no período chuvoso, para isso, foi analisado de forma individualizada controlando os efeitos da chuva sobre o risco de infecção/doença, ajustando também para um possível viés de observação, foram ajustadas não apenas a mediana da data de coleta dos grupos, mais também ajustado os intervalos de avaliação em 15 dias anterior à data de coleta para controle do período de leptospiremia, e ainda assim o comportamento das incidências de infecção e casos graves foi o mesmo. Não existem outros estudos de infecção assintomática realizados em períodos estacionais para comparar com nossos achados, e o padrão encontrado é oposto ao observado nos desfechos graves da leptospirose, onde o número de casos é consideravelmente maior na estação chuvosa (PAPPACHAN et al., 2004; CHADSUTHI et al., 2012; WEINBERGER et al., 2014). Outras doenças zoonóticas, como dengue, febre amarela, hantavirose, também possuem um padrão estacional de doença associado à chuva (ENGELTHALER, 1999; HII et al., 2012; KOUADIO et al., 2012).

Nós propomos três hipóteses (ainda que prematuras) para tentar explicar este fenômeno, as quais devem ser testadas no futuro. Na primeira hipótese, sugerimos que o aumento da atividade de roedores no período seco poderia justificar a maior transmissão

neste período, o que não ocorre no período de alta precipitação, onde os animais migram para áreas mais altas dos vales. Um estudo realizado na mesma área mostrou que a abundância de roedores não mudou nas estações chuvosa e seca (PANTI-MAY et al., 2016). Entretanto, os moradores relatam que no verão a atividade (movimento) de roedores é visivelmente maior. Esta mudança na atividade dos roedores reservatórios poderia estar associada a uma maior dispersão de leptospiros no momento da excreção (COSTA et al., 2015). Atualmente, a equipe está realizando estudos da atividade de roedores para testar esta hipótese.

Na segunda hipótese sugerimos que a concentração de leptospiros no solo é mais homogênea no período seco. Estudos não publicados do grupo (Casanovas-Massana et al, em publicação) indicam que as leptospiros no solo de Pau da Lima são carregadas pela água da chuva, acarretando sua maior concentração na parte mais baixa do vale. Assim, durante o período seco poderia acontecer do solo apresentar maior concentração dispersa de *Leptospira*, e este fato poderia estar associado a um maior risco de infecção subclínica.

Na terceira hipótese propomos que pode existir mudança no comportamento dos residentes com relação à prevenção da leptospirose nas diferentes estações. Um estudo sobre conhecimento, atitudes e práticas sobre leptospirose neste bairro mostrou que os residentes possuem maior preocupação com relação à leptospirose durante o período chuvoso (NAVEGANTES DE ARAÚJO et al., 2013). Inclusive, não é incomum a crença popular de que os roedores só urinam (e conseqüentemente liberam leptospiros) durante períodos de chuvas fortes.

Entretanto, apesar destas hipóteses possuírem embasamento científico, este ainda não está publicado, para explicar as mudanças sazonais de ocorrência de infecção assintomática por *Leptospira* e são, portanto, especulativas. Assim, serão necessários estudos de fatores de risco estratificando entre estações para poder identificar os determinantes socioambientais da transmissão. Estudos prévios mostram que os fatores de risco para infecção assintomática e doença são similares (proximidade a esgotos, infestação de ratos e pobreza) (MACIEL et al., 2008; REIS et al., 2008; SARKAR et al., 2012; COSTA et al., 2012; FELZEMBURGH et al., 2014; HAGAN et al., 2016). Contudo a contribuição deles nas diferentes estações devem ser ainda determinadas.

As principais limitações para estabelecer uma relação causal estiveram relacionadas às alterações no padrão climático, com a elevação das precipitações fora do período esperado, o que restringiu a nossa capacidade de determinar períodos clássicos de chuva e seca. Porém as avaliações utilizando o nível de precipitação, permitiu obter

medidas de correlação entre precipitação e transmissão da leptospirose. O estudo apresentou 18% de perda de seguimento. A principal causa de perda de seguimento (>80%) foi mudança para fora da área de estudo, especialmente homens de mais de 20 anos (o grupo de maior incidência para infecção assintomática). Assim, as estimativas gerais de incidências podem ter sido subestimadas.

Um desafio do estudo é a determinação do momento de infecção subclínica nos participantes da coorte. Neste trabalho foi utilizada a técnica de MAT que é a metodologia padrão ouro para estudos de coorte (FAINE et al., 1999). Devido ao período de leptospiremia, de 7-14 dias desde o dia da infecção, que é o período necessário para produção de anticorpos identificáveis pela MAT, pode ter acontecido viés de identificação do período de infecção em um grupo de indivíduos da coorte ou da vigilância. Entretanto a correlação elevada entre incidência de casos graves e precipitação mostrou um padrão consistente com os numerosos estudos previamente publicados (KO et al., 2009; WEINBERGER et al., 2014). Adicionalmente, corroboramos nossos achados com outras duas análises. Primeiro, corrigimos a possível data de infecção subtraindo 15 dias do momento de coleta da infecções subclínicas e da data de hospitalização nos casos graves e repetimos as análises obtendo o mesmo padrão que sem a correção. Segundo, realizamos análises de nível individual, controlando por fatores demográficos, e novamente encontramos a mesma associação que durante as análises agregadas. Em conjunto, estas estratégias provem suporte aos achados deste trabalho sugerindo que infecções subclínicas e casos graves possuem diferentes dinâmicas com relação a precipitação.

A incidência de leptospirose grave mostrou um padrão típico, com aumento no período chuvoso e diminuição no período seco. Este padrão tem sido observado em ambientes urbanos e rurais de todos os países onde a doença tem sido estudada (KO et al., 1999; SPICHLER et al., 2008; CHADSUTHI et al., 2012; WEINBERGER et al., 2014; LALL et al., 2016)

Para entender o padrão inesperado de infecção pela bactéria, na forma assintomática, e se estava relacionado a características demográficas como sexo e faixa etária, foi realizado análises estratificadas para estas características de forma a suplementar os achados. Homens adultos entre 15 e 49 anos apresentaram taxas elevadas independentemente da estação do ano, na infecção subclínica. Estes dados são concordantes com estudos previamente publicados em avaliações anuais (RIBEIRO, 2008; PAPLOSKI, 2013; HAGAN et al., 2016). No entanto, indivíduos com mais de 50

anos apresentaram maiores incidências também, o que não tinha sido previamente relatado. Estudos epidemiológicos direcionados a este grupo de homens mais velhos devem ser realizados para entender os fatores de risco na transmissão desta zoonose.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os achados descritos neste trabalho indicam associação positiva entre os níveis de precipitação e a incidência de casos hospitalizados por leptospirose em Salvador, adicionalmente, observando gênero como fator descritivo e suplementar ao projeto, o sexo masculino continua sendo o mais incidente na evolução para as formas graves, como observado em muitos estudos prévios, e indicando a emergente necessidade de políticas públicas com o foco no saneamento básico como forma de minimizar exposição a bactéria.

Nossos dados indicam que baixos níveis de precipitação estiveram associados a maiores incidências de leptospirose subclínica. Com isso, se faz necessário avaliar este novo padrão de infecção assintomática e seus fatores de risco no período inter – epidêmicos como forma de entendimento dos determinantes para progressão de gravidade da doença e medidas de intervenções ambientais agora voltados ao período de menor precipitação.

REFERÊNCIAS

ATHANAZIO, D. A. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 176–180, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093568>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

BACKSTEDT, B. T. et al. Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309903008302>>. Acesso em: 2 dez. 2014.

CASTRO, V. et al. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo; Risk factors to leptospirosis in cows in São Paulo state, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1438–1442, 2009. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=537273&indexSearch=ID>>.

CHADSUTHI, S. et al. Modeling seasonal leptospirosis transmission and its association with rainfall and temperature in Thailand using time-series and ARIMAX analyses. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 7, p. 539–546, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764512600959>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

CHANG, S. L.; BUCKINGHAM, M.; TAYLOR, M. P. Studies on *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. 1943. Faltou dados da publicação

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

COSTA, F. et al. Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996-2005: a review of data from ministries of health. **Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health**, v. 32, n. 3, p. 169–177, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3970205&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

COSTA, F. et al. Influence of household rat infestation on leptospira transmission in the urban slum environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3338, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25474580>>. Acesso em: 8 dez 2014.

DESVARS, A. et al. Seasonality of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20377, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3105052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

DIAS, J. P. et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 499–504. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992402>>. Acesso em: 28 out. 2016.

ENGELTHALER, D. Climatic and Environmental Patterns Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome, Four Corners Region, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 87–94, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no1/engelthaler.htm>>. Acesso em: 28 out. 2016.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 1999.

FARIA, M. T. de et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2596941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12/12/2014.

FELZEMBURGH, R. D. M. et al. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an Urban Slum Community: Role of Poor Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

GANOZA, C. A. et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. e308, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1551915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 dez. 2014.

GAYNOR, K. et al. AN Outbreak Associated With Flooding of a University Campus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 5, p. 882–886, 2007. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/76/5/882.long>>. Acesso em: 29 maio 2015.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2570821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

HAGAN, J. E. et al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004275, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004275>>.

HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal Biomedical Inform**, v. 42, n. 2, p. 377–381, 2009.

HII, Y. L. et al. Forecast of Dengue Incidence Using Temperature and Rainfall. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.

IDO, Y. et al. The rat as carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (spirochetosis icterohaemorrhagica). **Journal Experimental Medicine & Hygiene**, v. 26, p. 341–353, 1917.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire. , **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27–31, 1967.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820–825, 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3384523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 out. 2014.

KOUADIO, I. K. et al. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 95–104, 2012.

- KUPEK, E. et al. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil, 1991-1996. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 131–134, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934496>>. Acesso em: 12 dez. 2014.
- LALL, C. et al. Prevalence and Diversity of Leptospire in Different Ecological Niches of Urban and Rural Areas of South Andaman Island. **Microbes and Environments**, v. 0, n. 0, 2016. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/advpub/0/advpub_ME15149/_article>.
- LAU, C.; CLEMENTS, A.; SKELLY, C. Leptospirosis in American Samoa—estimating and mapping risk using environmental data. **PLoS Neglected Tropical**, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001669>>. Acesso em: 11 dez. 2014.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis , **American Society for Microbiology**, v. 14, n. 2, 2001.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- MACIEL, E. A. P. et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, p. e154, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2270796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 jun. 2016.
- MEITES, E. et al. Reemerging Leptospirosis, California. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 406, 2004.
- MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4952–4958, 2008.
- NABITY, S. A. et al. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of Human Leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.
- NAVEGANTES DE ARAÚJO, W. et al. Knowledge, attitudes, and practices related to Leptospirosis among urban slum residents in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 359–363, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3583330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

NOGUCHI, H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*) (Inada and Ido). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 27, n. 5, p. 575–592, 1918. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2125876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

OLIVEIRA, D. de et al. *Leptospira* in breast tissue and milk of urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). **Epidemiology and Infection**, p. 1–10, abr. 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268816000637>.

OLIVEIRA D. **Desigualdades intraurbanas de leptospirose no Recife**, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

PANTI-MAY, J. A. et al. A Two-Year Ecological Study of Norway Rats (*Rattus norvegicus*) in a Brazilian Urban Slum. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. e0152511, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0152511>>.

PAPLOSKI, I. A. D. **História natural da leptospirose urbana: influência do sexo e da idade no risco de infecção, progressão clínica da doença e óbito**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saude e Medicina Investigativa)- Fundação Gonçalo Moniz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, 2013.

PAPPACHAN, M. J.; SHEELA, M.; ARAVINDAN, K. P. Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 58, n. 12, p. 1054, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1732650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 maio. 2015.

PASTUER, Institut , Disponível em : <<https://www.pasteur.fr/en/medical-center/disease-sheets/leptospirosis>> Acessado em: 13 junho 2015

REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. e228, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2292260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 nov. 2014.

RIBEIRO, G. S. **Estudo longitudinal da leptospirose urbana: investigação de fatores de risco para infecção e para o desenvolvimento de formas graves após a infecção**. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saude e Medicina Investigativa)- Fundação Gonçalo Moniz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz 2008.

ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections ??? An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012???2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 41, p. 1–8, 2014.

SANTOS, L. A. **Leptospira interrogans sorovar copenhageni e icterohaemorrhagiae: relação evolutiva, diferenças genéticas e associação com defecho clínico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saude e Medicina Investigativa)- Fundação Gonçalo Moniz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, 2015.

SARKAR, J. et al. Leptospirosis: A re-emerging infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 500–502, 2012.

SARKAR, U. et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 605–610, 2002.

SPICHLER, A. S. et al. Predictors of Lethality in Severe Leptospirosis in Urban Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 911–914, 2008. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/79/6/911.full>>. Acesso em: 28 maio. 2015.

SZONYI, M. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (Cebus) monkeys. **Changes**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

R Core Team (2015). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2004.

UN-HABITAT. **UN-HABITAT State of the World's Cities 2010/2011: Bridging The Urban Divide**. GB. Earthscan. 2010.

VERNE, J. et al. Fatal Human Co-infection with *Leptospira* spp . and Dengue Virus , Puerto Rico , 2010. , v. 18, n. 5, p. 878–880, 2012.

VIJAYACHARI P, SUGUNAN AP, S. A. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Bioscience**, v. 33, n. November, p. 557–569, 2008.

WEINBERGER, D. et al. El Niño Southern Oscillation and leptospirosis outbreaks in New Caledonia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2798, 2014. Disponível em:

<[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3990495&tool=pmcentrez
&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3990495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)>. .

ANEXOS

Manuscritos publicados durante o mestrado relacionados a outros projetos.

Original Investigation

Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil

Bruno de Paula Freitas, MD; João Rafael de Oliveira Dias, MD; Juliana Proença, MD; Gelson Almeida Sacramento, BS; Albert Icksang Ko, MD; Mauricio Maia, MD, PhD; Rubens Belfort Jr, MD, PhD

 Invited Commentary

IMPORTANCE The Zika virus (ZIKV) has rapidly reached epidemic proportions, especially in northeastern Brazil, and has rapidly spread to other parts of the Americas. A recent increase in the prevalence of microcephaly in newborn infants and vision-threatening findings in these infants is likely associated with the rapid spread of ZIKV.

OBJECTIVE To evaluate the ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed intrauterine ZIKV infection in Salvador, Bahia, Brazil.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS Case series at a tertiary hospital. Twenty-nine infants with microcephaly (defined by a cephalic circumference of ≤ 32 cm) with a presumed diagnosis of congenital ZIKV were recruited through an active search and referrals from other hospitals and health unities. The study was conducted between December 1 and December 21, 2015.

INTERVENTIONS All infants and mothers underwent systemic and ophthalmic examinations from December 1 through December 21, 2015, in the Roberto Santos General Hospital, Salvador, Brazil. Anterior segment and retinal, choroidal, and optic nerve abnormalities were documented using a wide-field digital imaging system. The differential diagnosis included toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex virus, syphilis, and human immunodeficiency virus, which were ruled out through serologic and clinical examinations.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Ocular abnormalities associated with ZIKV.

RESULTS Twenty-three of 29 mothers (79.3%) reported suspected ZIKV infection signs and symptoms during pregnancy, 18 in the first trimester, 4 in the second trimester, and 1 in the third trimester. Of the 29 infants (58 eyes) examined (18 [62.1%] female), ocular abnormalities were present in 17 eyes (29.3%) of 10 children (34.5%). Bilateral findings were found in 7 of 10 patients presenting with ocular lesions, the most common of which were focal pigment mottling of the retina and chorioretinal atrophy in 11 of the 17 eyes with abnormalities (64.7%), followed by optic nerve abnormalities in 8 eyes (47.1%), bilateral iris coloboma in 1 patient (2 eyes [11.8%]), and lens subluxation in 1 eye (5.9%).

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Congenital infection due to presumed ZIKV exposure is associated with vision-threatening findings, which include bilateral macular and perimacular lesions as well as optic nerve abnormalities in most cases.

Author Affiliations: Department of Ophthalmology, Hospital Geral Roberto Santos, Salvador, Brazil (de Paula Freitas); Vision Institute, Department of Ophthalmology, Paulista Medical School, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil (de Oliveira Dias, Proença, Maia, Belfort); Gonçalo Montez Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil (Sacramento, Ko); Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, Connecticut (Ko).

Corresponding Author: Rubens Belfort Jr, MD, PhD, Vision Institute, Department of Ophthalmology, Paulista Medical School, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu, 822, São Paulo 04025-042, Brazil (rbelfort@uol.com.br).

JAMA Ophthalmol. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0267
Published online February 9, 2016.

RESEARCH ARTICLE

Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise

Manoel Sarno^{1,2}, Gielson A. Sacramento³, Ricardo Khouri³, Mateus S. do Rosário¹, Federico Costa^{2,3,4}, Gracinda Archanjo¹, Luciane A. Santos³, Nivison Nery, Jr.³, Nikos Vasilakis⁵, Albert I. Ko^{3,4*}, Antonio R. P. de Almeida^{1,2}

1 Hospital Geral Roberto Santos, Secretaria Estadual da Saúde da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, 2 Faculdade de Medicina da Bahia and Instituto da Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, 3 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, Brazil, 4 Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, Connecticut, United States of America, 5 Department of Pathology and Center of Biodefense and Emerging Infectious Diseases, Institute for Human Infections and Immunity, The University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America

* albert.ko@yale.edu



CrossMark
click for updates

Abstract

Background

The rapid spread of Zika virus in the Americas and current outbreak of microcephaly in Brazil has raised attention to the possible deleterious effects that the virus may have on fetuses.

Methodology/Principal Findings

We report a case of a 20-year-old pregnant woman who was referred to our service after a large Zika virus outbreak in the city of Salvador, Brazil with an ultrasound examination that showed intrauterine growth retardation of the fetus at the 18th gestational week. Ultrasound examinations in the 2nd and 3rd trimesters demonstrated severe microcephaly, hydranencephaly, intracranial calcifications and destructive lesions of posterior fossa, in addition to hydrothorax, ascites and subcutaneous edema. An induced labor was performed at the 32nd gestational week due to fetal demise and delivered a female fetus. ZIKV-specific real-time polymerase chain reaction amplification products were obtained from extracts of cerebral cortex, medulla oblongata and cerebrospinal and amniotic fluid, while extracts of heart, lung, liver, vitreous body of the eye and placenta did not yield detectable products.

Conclusions/Significance

This case report provides evidence that in addition to microcephaly, there may be a link between Zika virus infection and hydrops fetalis and fetal demise. Given the recent spread of the virus, systematic investigation of spontaneous abortions and stillbirths may be warranted to evaluate the risk that ZIKV infection imparts on these outcomes.

OPEN ACCESS

Citation: Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosário MS, Costa F, Archanjo G, et al. (2016) Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004517. doi:10.1371/journal.pntd.0004517

Editor: Peter J. Hotez, Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital, UNITED STATES

Received: February 16, 2016

Accepted: February 16, 2016

Published: February 25, 2016

Copyright: © 2016 Sarno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data will be available in the manuscript.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.