



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**HISTÓRIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA:  
ESTUDO LONGITUDINAL PROSPECTIVO EM UMA  
COMUNIDADE DE ALTO RISCO DURANTE EPIDEMIAS  
URBANAS EM SALVADOR - BAHIA**

**RIDALVA DIAS MARTINS FELZEMBURGH**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2006**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

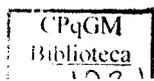
HISTÓRIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA:  
ESTUDO LONGITUDINAL PROSPECTIVO EM UMA  
COMUNIDADE DE ALTO RISCO DURANTE EPIDEMIAS  
URBANAS EM SALVADOR - BAHIA

RIDALVA DIAS MARTINS FELZEMBURGH

Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Patologia como  
requisito obrigatório para obtenção do  
grau de mestre.

Salvador - Bahia  
2006



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

F329h Felzemburgh, Ridalva Dias Martins  
História natural da leptospirose urbana: estudo longitudinal prospectivo em uma comunidade de alto risco durante epidemias urbanas em Salvador - Bahia. [manuscrito]. / Ridalva Dias Martins Felzemburgh. - 2006. 82 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientadores: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Dr. Albert Ieksang Ko, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

1. Leptospirose. 2. Epidemias Urbanas. 3. Historia Natural. 4. Epidemiologia. I. Título.

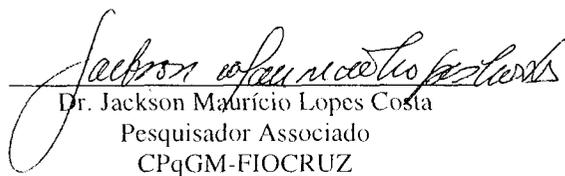
CDU 616.986.7:502.2(813.8)

HISTÓRIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA: ESTUDO LONGITUDINAL PROSPECTIVO EM  
UMA COMUNIDADE DE ALTO RISCO DURANTE EPIDEMIAS URBANAS EM SALVADOR-BAHIA

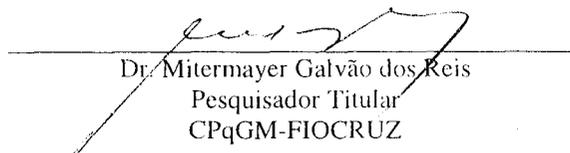
RIDALVA DIAS MARTIN FELZEMBURGH

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dr. Jackson Maurício Lopes Costa  
Pesquisador Associado  
CPqGM-FIOCRUZ

  
Dr. Edson Duarte Moreira Junior  
Pesquisador Adjunto  
CPqGM-FIOCRUZ

  
Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM-FIOCRUZ

Aos meus pais e a Maurício, meus eternos amores,  
meus maiores incentivadores, enfim, meu “tudo”.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Albert Icksang Ko e Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pela oportunidade de descobrir o que realmente tenho prazer em fazer, pela confiança, incentivo e por compartilharem comigo parte do seu vasto conhecimento.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, em especial a Tatiana Otero, Edilane Gouveia, Balbino Lino dos Santos, Renato Reis, Salvatore Cala, Emanuel Bernardes, Andréia Carvalho, à equipe de campo e digitação, pela competência, empenho e, sobretudo, pela amizade.

Aos colegas e amigos do mestrado, ao coordenador do curso Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, às secretárias do colegiado Sra. Rosália Oliveira, Lana, Taise e Rosângela, que juntos edificam o curso de que tenho imenso orgulho em participar.

À Dra. Marília Sá Carvalho e aos analistas de métodos quantitativos Dr. Cláudio Bustamante Pereira de Sá e Wagner Tassinari pela presteza e esclarecimentos tão importantes.

A Hugo Vasconcelos do setor de processamento de dados – CPqGM pela recuperação de meus arquivos.

Ao Dr. Lee Riley pelos conselhos.

Aos funcionários da biblioteca do CPqGM, em especial à bibliotecária Ana Maria Fiscina pela normatização deste trabalho.

À FAPEX, NIH e ao CNPq pela concessão das bolsas de estágio (duas primeiras) e mestrado (última).

Ao Dr. Warren Jonhson, chefe da Divisão Internacional de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de Cornell, Nova Iorque, por disponibilizar os recursos necessários à realização deste estudo.

A todos que, embora não tenham seus nomes aqui citados, colaboraram para o alcance deste objetivo.

Em especial, aos moradores de Pau da Lima, que nos recebem com carinho em seus lares, em nós confiam parte de suas vidas, que foram, portanto, fundamentais para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Leptospirose: Aspectos Históricos.....	18
2.2 Agente etiológico e reservatórios .....	19
2.3 Fisiopatogenia da Leptospirose .....	24
2.4 Aspectos clínicos e laboratoriais.....	27
2.5 Aspectos epidemiológicos.....	31
2.5.1 Leptospirose no mundo .....	31
2.5.2 Leptospirose no Brasil .....	33
2.5.3 Leptospirose na Bahia e em Salvador .....	36
3 RACIONAL E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	39
4 HIPÓTESES .....	41
5 OBJETIVOS DO ESTUDO .....	42
5.1 Objetivo Geral .....	42
5.2 Objetivos Específicos .....	42
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
6.1 Equipe .....	42
6.2 Considerações éticas .....	42
6.3 Desenho e local do estudo .....	44
6.4 População e amostra .....	46
6.5 Período do estudo .....	48

6.6 Coleta de dados epidemiológicos e sorológicos .....	48
6.7 Teste laboratorial utilizado para diagnóstico .....	50
6.8 Definições .....	51
6.9 Análises dos dados obtidos .....	53
7 RESULTADOS.....	59
7.1 Características sócio-demográficas .....	59
7.2 Prevalência do título recíproco de anticorpos aglutinantes e distribuição dos sorogrupos prevalentes .....	63
7.3 Taxas de infecção e distribuição dos sorogrupos incidentes no primeiro ano de seguimento .....	65
7.4 Razão doença grave:infecção .....	73
7.5 Fatores epidemiológicos de risco para infecção por <i>Leptospira</i> .....	73
8 DISCUSSÃO .....	80
8.1 Taxas de infecção .....	80
8.2 Razão doença grave:infecção .....	81
8.3 Fatores de risco para infecção por <i>Leptospira</i> .....	82
8.4 Limitações do estudo .....	84
8.5 Perspectivas para o futuro .....	86
9 CONCLUSÕES .....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
ANEXOS	
Anexo A Termos de consentimento originais	
Folhas comuns para menores de idade e adultos .....	95
Folha específica para menores de idade .....	96
Anexo B Termos de consentimento traduzidos	
Folha comum para menores de idade e adultos .....	97
Folha específica para menores de idade .....	98

Anexo C Questionário com dados basais (recrutamento da coorte), incluindo as variáveis .....	99
Anexo D Questionário utilizado no primeiro ano de seguimento .....	102
Anexo E Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM – FIOCRUZ.....	105
Anexo F Parecer do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa .....	106
Anexo G Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cornell – E.U.A.....	108
Anexo H Protocolo de Coleta de Sangue .....	109
Anexo I Protocolo para processamento e recepção das amostras .....	112
Anexo J Prova de microaglutinação (MAT) para diagnóstico de leptospirose – Titulação .....	114
Anexo K Prova de microaglutinação (MAT) para soroprevalência .....	120

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
°C	Graus Celsius
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
Elisa – IgM	Reação Imunoenzimática de Captura de IgM
FIOCURZ	Fundação Oswaldo Cruz
GIS	do inglês <i>Geographical Information System</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
FAPEX	Fundação de Apoio à Pesquisa e à Extensão
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MAT	Microaglutinação
NEB	Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística
Nº	Número
NIH	do inglês National Institutes of Health – Estados Unidos da América
NSA	Não se aplica
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RR	Risk Ratio
SESAB	Secretaria de Saúde da Bahia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>
ZI	Zona de informação

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Microscopia eletrônica da <i>Leptospira interrogans</i> .....	19
Figura 2 Desenho esquemático simplificado da taxonomia da <i>Leptospira</i> adaptado de LEVETT (2001) .....	21
Figura 3 Foto do <i>Rattus Norvegicus</i> .....	23
Figura 4 Esquema das características físicas do <i>Rattus Norvegicus</i> .....	23
Figura 5 Foto do <i>Rattus rattus</i> .....	23
Figura 6 Esquema das características físicas do <i>Rattus rattus</i> .....	23
Figura 7 Foto do <i>Mus Musculus</i> .....	23
Figura 8 Esquema das características físicas do <i>Mus Musculus</i> .....	23
Figura 9 Distribuição espacial dos casos de leptospirose no Brasil no ano de 2000. Salvador, Bahia, 2006 .....	35
Figura 10 Área de Estudo História Natural da Leptospirose Urbana- localizada no contexto da Cidade do Salvador – Bahia .....	44
Figura 11 Foto de uma parte da área do estudo ressaltando o padrão das habitações no local. Salvador, Bahia, 2006 .....	45
Figura 12 Área de Estudo História Natural da Leptospirose Urbana: fronteiras de alto risco delimitadas pela distribuição de casos de leptospirose grave entre 1996-2003 na Zona de Informação Pau da Lima. Salvador, Bahia, 2006 .....	46
Figura 13 Fluxograma dos indivíduos desde o censo até o final do recrutamento da coorte. Salvador, Bahia, 2006.....	47
Figura 14 Figura 14 Área de Estudo História Natural da Leptospirose Urbana em Salvador: distribuição espacial dos 684 domicílios selecionados. Salvador, Bahia, 2006 .....	47
Figura 15 Fluxograma dos indivíduos desde o censo até o final do primeiro ano de seguimento da coorte. Salvador, Bahia, 2006.....	60
Figura 16 Histograma do tempo decorrido entre o recrutamento e o seguimento da coorte. Salvador, Bahia, 2006 .....	62
Figura 17 Prevalência dos máximos títulos de anticorpos aglutinantes na microaglutinação em 2003 para A- indivíduos participantes do primeiro acompanhamento (n=1.585) e B- perdas de seguimento (n=418). Salvador, Bahia, 2006 .....	63

Figura 18 Prevalência dos máximos títulos de anticorpos aglutinantes na microaglutinação em 2003 por faixa etárias e sexo para A- indivíduos participantes do primeiro acompanhamento (n=1.585) e B- perdas de seguimento (n=418). Salvador, Bahia, 2006 .....	64
Figura 19 Taxas de A- infecção, B- nova infecção, C- reinfecção, estratificadas por faixa etária, sexo e ajustadas para estas mesmas variáveis. (n=1.585). Salvador, Bahia, 2006 .....	70
Figura 20 Localização dos domicílios georreferenciados na área de estudo contendo, pelo menos, um indivíduo infectado. A- Distribuição dos canais abertos e B- Distinção entre canais de água pluvial e água servida (esgoto doméstico). Salvador, Bahia, 2006 .....	72
Figura 21 Gráficos Kaplan-Meier mostrando o tempo decorrido até infecção para as exposições: gênero masculino, leptospirose grave no passado, não ser alfabetizado, faixa etária, contato com lama no peridomicílio e na rua. Salvador, Bahia, 2006 .....	76
Figura 22 Gráficos Kaplan-Meier mostrando o tempo decorrido até infecção para as exposições contato com lixo e alagamento no peridomicílio e na rua, alagamento da rua, residir em área sujeita a alagamento. Salvador, Bahia, 2006 .....	77
Figura 23 Gráficos Kaplan-Meier mostrando o tempo decorrido até infecção para as variáveis contato com esgoto no peridomicílio e na rua, desentupir esgoto da rua, residir a até 10m de esgoto aberto, criar gato no domicílio. Salvador, Bahia, 2006 .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de óbitos por leptospirose segundo município de ocorrência no ano de 2004. Salvador, Bahia, 2006 .....	36
Tabela 2 Número de óbitos por leptospirose segundo município de residência no anos de 2004. Salvador, Bahia, 2006 .....	36
Tabela 3 Número de óbitos por leptospirose segundo município de ocorrência no ano de 2005. Salvador, Bahia, 2006 .....	37
Tabela 4 Número de óbitos por leptospirose segundo município de residência no ano de 2005. Salvador, Bahia, 2006 .....	37
Tabela 5 Fatores de risco para aquisição de leptospirose em um estudo caso-controle, Salvador- Bahia .....	40
Tabela 6 Características da coorte que completou o seguimento. Salvador, Bahia, 2006. ....	61
Tabela 7 Comparação entre participantes e perdas no estabelecimento (recrutamento) e seguimento da coorte. Salvador, Bahia, 2006 .....	61
Tabela 8 Distribuição dos sorogrupos identificados na microaglutinação para prevalência nos dados basais e no primeiro ano de seguimento. Salvador, Bahia, 2006 .....	65
Tabela 9 Taxa bruta de infecção, estratificada por faixas etárias e sexo. Salvador, Bahia, 2006 .....	66
Tabela 10 Taxa bruta de nova infecção, estratificada por faixas etárias e sexo. Salvador, Bahia, 2006 .....	66
Tabela 11 Taxa bruta de reinfecção, estratificada por faixas etárias e sexo. Salvador, Bahia, 2006 .....	66
Tabela 12 Fatores de ponderação para análises ajustadas. Salvador, Bahia, 2006 .....	67
Tabela 13 Taxa de infecção, estratificada por faixas etárias, sexo e ajustada para estas mesmas variáveis. Salvador, Bahia, 2006 .....	68
Tabela 14 Taxa de nova infecção, estratificada por faixas etárias, sexo e ajustada para estas mesmas variáveis. Salvador, Bahia, 2006 .....	68
Tabela 15 Taxa de reinfecção, estratificada por faixas etárias, sexo e ajustada para estas mesmas variáveis. Salvador, Bahia, 2006 .....	69

Tabela 16 Distribuição dos sorogrupos identificados na microaglutinação para os indivíduos com infecção no primeiro ano de seguimento. Salvador, Bahia, 2006 .....	71
Tabela 17 Razão doença grave:infecção para os indivíduos participantes do estudo comparados aos residentes na área do estudo (coorte) e com os moradores da ZI Pau da Lima. Salvador, Bahia, 2006 .....	73
Tabela 18 Fatores de risco para infecção por <i>Leptospira</i> identificados nas análises univariadas. Salvador, Bahia, 2006 .....	75
Tabela 19 Fatores de risco para infecção por <i>Leptospira</i> identificados nas análises univariadas e confirmados como fatores de risco independentes nas análises multivariadas com modelo de Cox. Salvador, Bahia, 2006 .....	79

## RESUMO

**HISTÓRIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA EM SALVADOR – BAHIA: ESTUDO LONGITUDINAL PROSPECTIVO EM UMA COMUNIDADE DE ALTO RISCO DURANTE EPIDEMIAS URBANAS. RIDALVA DIAS MARTINS FELZEMBURGH.** INTRODUÇÃO: A leptospirose, considerada a antrozoose mais difundida no mundo, é uma doença febril aguda de início súbito causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A infecção por *Leptospira* patogênica produz uma diversidade de sintomas clínicos que podem variar desde uma forma assintomática ou sub-clínica até a doença de Weil que acomete aproximadamente 10% dos casos clínicos e pode levar ao óbito. A leptospirose em Salvador é responsável por epidemias anuais acometendo predominantemente indivíduos residentes em comunidades desprovidas de infra-estrutura sanitária. Para traçarmos medidas efetivas de saúde pública, torna-se necessário entender a história natural da leptospirose urbana, a razão entre casos graves e infecção, os fatores de risco para aquisição da doença. OBJETIVOS: 1- Determinar a taxa de infecção por *Leptospira* em uma sub-coorte de indivíduos residentes em uma comunidade de alto risco; 2- Calcular a razão entre os casos graves de leptospirose e os indivíduos com infecções assintomáticas ou sub-clínicas; 3- Identificar fatores de risco para aquisição de infecção por *Leptospira*. MÉTODOS: Uma coorte prospectiva de 9.862 indivíduos foi estabelecida no bairro periférico de pau da lima, Salvador-Bahia e uma sub-coorte de 2.003 indivíduos selecionados randomicamente foi acompanhada anualmente. Destes indivíduos foram coletados dados epidemiológicos e uma amostra de sangue para avaliação sorológica. Para cálculo da taxa de infecção este último termo foi definido como soroconversão ou aumento de quatro vezes o título recíproco na microaglutinação entre amostras pareadas. RESULTADOS: Foi identificada uma taxa de infecção de 49,0 por 1.000 pessoas/anos de seguimento nesta sub-coorte e razões doença grave:infecção de 1:516 na coorte e 1:598 para a ZI Pau da Lima; fatores de risco estatisticamente significantes foram: gênero masculino (RR 1,98; IC 95% 1,19 - 3,29); faixa etária de 25-34 (2,35; 1,12 - 4,94), não ser alfabetizado (2,45; 1,45 - 4,15), passado clínico de leptospirose (5,16; 1,26 - 21,11), contato com lama no peridomicílio (1,95; 1,18 - 3,22), contato com lama na rua (2,14; 1,28 - 3,58), contato com lixo no peridomicílio (1,92; 1,13 - 3,26), contato com lixo na rua (2,33; 1,41 - 3,85), contato com alagamento no peridomicílio (2,07; 1,25 - 3,45), contato com alagamento na rua (2,40; 1,38 - 4,16), alagamento da rua (2,40; 1,38 - 4,16), residir em local sujeito a alagamento (1,67; 1,05 - 4,78), contato com esgoto no peridomicílio (2,02; 1,22 - 3,36), contato com esgoto na rua (2,95; 1,78 - 4,91), desentupir esgoto da rua (2,26; 1,35 - 3,77), residir a até 10m de esgotos abertos (1,89; 1,09 - 3,27), possuir gato em casa (2,52; 1,49 - 4,28). Nas análises multivariadas utilizando o modelo de Cox com e sem efeitos aleatórios no domicílio, foram fatores de risco independentes: sexo masculino (2,12; 1,25 - 3,60), faixas etárias de quinze a vinte e quatro (2,74; 1,22 - 6,16) e vinte e cinco a trinta e quatro (4,24; 1,88 - 9,52) ambas em relação aos indivíduos de cinco a quatorze anos, não ser alfabetizado (2,92; 1,65 - 5,17), contato com alagamento na rua (2,14; 1,20 - 3,82), criar gato no domicílio (2,51; 1,46 - 4,32). CONCLUSÕES: Foi identificada uma alta taxa de infecção na população, destacando-se as faixas etárias de 15 a 34 anos e o sexo masculino com maior número de indivíduos infectados (59%), nenhum fator de risco ocupacional foi identificado, reforçando a hipótese de transmissão peridomiciliar de nossos estudos anteriores. Baseados nestes dados poderemos implementar e avaliar intervenções de saúde pública nesta comunidade de alto risco para infecção.

## ABSTRACT

NATURAL HISTORY OF URBAN LEPTOSPIROSIS IN SALVADOR - BAHIA: A LONGITUDINAL STUDY IN A HIGH RISK COMMUNITY DURING URBAN EPIDEMICS. **RIDALVA DIAS MARTINS FELZEMBURGH.** INTRODUCTION: Leptospirosis, considered to be the most widespread antropozoonose in the world, is an acute febrile illness that begins suddenly, caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. *Leptospira* infection produces a wide range of clinical presentation that can vary from an asymptomatic or sub-clinical form to Weil's disease which causes approximately 10% of the clinical cases and can lead to death. Leptospirosis in Salvador is responsible for annual epidemics predominantly affecting individuals that are resident in communities with poor sanitary infrastructure. To identify public health measures for prevention, it is necessary to understand the natural history of urban leptospirosis, the relationship between severe cases and infection, the risk factors for acquiring the illness. OBJECTIVES: 1- To determine the leptospiral infection rate in a sub-cohort of resident individuals in a high risk community; 2- To calculate the relationship between the severe cases and the asymptomatic or sub-clinical infected individuals and 3- To identify the risk factors for acquiring leptospiral infection. METHODS: a cohort of 9.862 individuals was established in Pau da Lima, Salvador-Bahia and one sub-cohort of 2.003 randomly selected individuals was followed during one year. We collected epidemiologic data from these individuals and a blood sample for sorologic evaluation. Infection was defined as seroconversion or a four fold rise in reciprocal titers as determined in the microagglutination test. RESULTS: We identified an infection rate of 49,0 per 1.000 people/years of follow-up and a proportions severe disease:infection of 1:516 in the cohort and 1:598 in Pau da Lima; statistically significant risk factors were: masculine gender (RR 1,98; IC 95% 1,19 - 3,29); age range from 25-34 (2,35; 1,12 - 4,94), lacky literacy (2,45; 1,45 - 4,15), severe leptospirosis in the past (5,16; 1,26 - 21,11), peridomiciliar contact with mud (1,95; 1,18 - 3,22), contact with mud in street (2,14; 1,28 - 3,58), peridomiciliar contact with garbage (1,92; 1,13 - 3,26), contact with garbage in street (2,33; 1,41 - 3,85), peridomiciliar contact with waste water (2,07; 1,25 - 3,45), contact with waste water in street (2,40; 1,38 - 4,16), waste water in the street (2,40; 1,38 - 4,16), residence in flooding area (1,67; 1,05 - 4,78), peridomiciliar contact with sewer (2,02; 1,22 - 3,36), contact with sewer in the street (2,95; 1,78 - 4,91), to remove blocking sewers in the street (2,26; 1,35 - 3,77), residence 10m from an open sewer (1,89; 1,09 - 3,27), presence of a cat in the house (2,52; 1,49 - 4,28). In the multivaried analyses using the Cox model with and without intra-domiciliary aleatory effects, the independent risk factors were: masculine sex (2,12; 1,25 - 3,60), age range from 15 to 24 (2,74; 1,22 - 6,16) and 25 to 34 (4,24; 1,88 - 9,52) both compared to age range from 5 to 14, lacky literacy (2,92; 1,65 - 5,17), contact with waste water in street (2,14; 1,20 - 3,82), presence of a cat in the house (2,51; 1,46 - 4,32). CONCLUSIONS: We identified a high infection rate in the population, especially in males aged from 15 to 34 years were the largest number of infected individuals (59%), no occupational risk was identified, strengthening the hypothesis of peridomiciliar transmission from our previous studies. Based on these findings we can implement and e avaliate public health measures in this high risk community.

## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose, considerada a antropozoonose mais difundida no mundo, é uma doença que tem como agentes etiológicos espiroquetas do gênero *Leptospira*. A infecção por *Leptospira* patogênica produz uma diversidade de sinais e sintomas clínicos que podem variar desde uma infecção sub-clínica ou auto-limitada até a doença de Weil que é potencialmente fatal<sup>37,50,52</sup>.

Ela encontra-se distribuída de forma global, sendo considerada a antropozoonose mais difundida no mundo<sup>7</sup>, mas sua incidência é maior nas regiões tropicais onde possui condições mais favoráveis para transmissão tais como, precária infra-estrutura sanitária e alta infestação de roedores. A forma grave da doença foi descrita pela primeira vez por Adolf Weil (1886) e volta a emergir no cenário urbano sendo responsável por surtos de caráter sazonal, acometendo especialmente comunidades carentes (favelas)<sup>6,16,17,19,24,36,43,52,59</sup>. A forma grave denominada doença de Weil representa de 5 a 10% do total de casos e a taxa de letalidade varia de 5 a 20%. Nas formas mais graves, que evoluem com disfunção de múltiplos órgãos e sepse, incluindo hemorragia pulmonar, a letalidade pode chegar a 50%<sup>26,42</sup>.

Animais domésticos e silvestres podem ser reservatórios para o patógeno podendo carrear-lo e disseminá-lo por toda a vida. O ser humano é acometido de forma acidental ou incidental ao entrar em contato direto ou indireto com ambiente contaminado principalmente pelos excretas destes animais<sup>16,21,32,58</sup>. As medidas de prevenção no ambiente urbano estão concentradas na eliminação dos roedores, principais reservatórios para a *Leptospira*, porém não têm demonstrado redução no número de casos da doença, comprovado pelo alto número de casos a cada ano<sup>36</sup>.

Para traçar medidas de prevenção efetivas, toma-se necessário conhecer as áreas de maior incidência dentro do nosso contexto urbano e as exposições ambientais de maior risco para infecção. Isto só é possível através do acompanhamento prospectivo para melhor compreensão da história natural da doença. Este estudo objetiva compreender melhor a história natural da leptospirose urbana através do acompanhamento de uma coorte de base populacional, adquirindo conhecimento das taxas de infecção para estes indivíduos, da razão caso grave:infecção e dos fatores epidemiológicos de risco para infecção.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LEPTOSPIROSE: ASPECTOS HISTÓRICOS

A leptospirose tem sua primeira menção como icterícia infecciosa relatada por Hipócrates. Em 1880 no Egito, Larrey observou e descreveu dois casos desta síndrome icterica no exército de Napoleão no Cairo. O isolamento do agente etiológico ocorreu em 1914 quando Inada e Ido identificaram a *Leptospira* no fígado de um cobaio inoculado com sangue de um indivíduo que apresentava a mesma icterícia infecciosa. Inada e Ido denominaram o patógeno de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* e também identificaram o rato como reservatório para as leptospirosas, passo importante para a compreensão dos aspectos epidemiológicos da leptospirose. Em 1886, Adolf Weil, descreveu a forma grave da doença a partir do estudo de quatro casos clínicos em seres humanos. Os sinais e sintomas que estes indivíduos apresentavam eram muito semelhantes: doença de início abrupto com icterícia, esplenomegalia e nefrite. Esta forma grave da doença mais tarde foi denominada Doença de Weil (síndrome ictero-hemorrágica)<sup>21</sup>.

Em 1917, Beaurepaire de Aragão descreveu a leptospirose, pela primeira vez em nosso país, demonstrando a presença de leptospirosas em ratos. No mesmo ano, Noguchi isolou a *Leptospira icteroides* e a considerou como o agente etiológico da febre amarela que acometia indivíduos no Equador. A febre amarela era confundida com a doença de Weil naquela época devido à semelhante apresentação clínica e dificuldade de métodos de diagnóstico. Posteriormente, esta *Leptospira* foi reconhecida como sendo a *Leptospira icterohaemorrhagiae* isolada por Inada e Ido. Em 1918, Noguchi, na Bahia, descreveu os aspectos microscópicos do patógeno que são válidos na atualidade e criou o gênero *Leptospira* pela forma espiralada da bactéria<sup>21</sup>.

## 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E RESERVATÓRIOS

O agente etiológico da leptospirose é uma espiroqueta, bactéria helicoidal do gênero *Leptospira*, obrigatoriamente aeróbia, que possui alta motilidade além de compartilhar características de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Elas são morfológicamente espiraladas, flexíveis, unicelulares, helicoidais, delgadas, possuindo um diâmetro de 0,1µm e comprimento de 10 a mais de 20 µm, suas extremidades possuem forma de gancho, (figura 1). São constituídas por membrana plasmática, parede celular de peptidoglicano justaposta à membrana plasmática semelhante às bactérias gram-positivas, membrana externa onde se localiza o lipopolissacarídeo, principal componente antigênico da superfície e proteínas importantes para a virulência do patógeno. Entre a parede celular e a membrana externa, espaço periplasmático, localizam-se dois flagelos que são responsáveis pela alta motilidade da bactéria e a estrutura destes flagelos compartilha características de bactérias gram-negativas, o final de cada flagelo é inserido próximo a um pólo do cilindro protoplasmático<sup>21,63</sup>. As leptospiros encontram meio favorável ao seu crescimento com temperatura entre vinte e oito a trinta graus Celsius e pH entre 7.2 a 7.6 pois são sensíveis ao meio ácido; é necessário oxigênio, um fator que limita o crescimento, uma fonte de energia ( $\beta$ -oxidação de ácidos graxos), determinada concentração de CO<sub>2</sub> e meio líquido<sup>21</sup>.

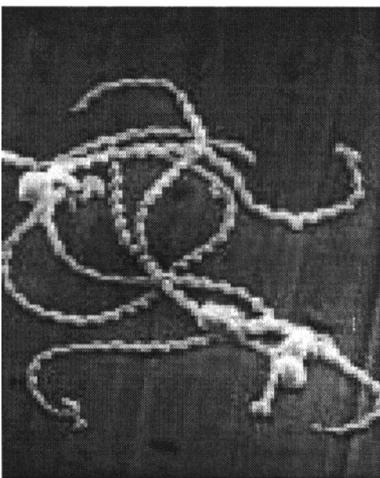


Figura 1 Microscopia eletrônica da *Leptospira interrogans*

Fonte: [www.idsc.nih.go.jp](http://www.idsc.nih.go.jp)

A família Leptospiraceae, pertencente à ordem Spirochaetales, está subdividida em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneria*. O gênero *Leptospira* é atualmente classificado em oito espécies genômicas de espiroquetas sendo as mais conhecidas: *Leptospira interrogans sensu lato*), patogênica, e *Leptospira biflexa (sensulato)*, saprófitas de vida livre e as primeiras serem descritas<sup>15,19,29,47</sup>. A *L. interrogans* é subdividida em vários sorogrupos que, por sua vez, são divididos em diversos sorotipos denominados também sorovares (figura 2). Mais de duzentos sorovares, classificados em vinte e quatro sorogrupos já foram identificados de acordo com a diversidade antigênica do lipopolissacarídeo destas leptospiros patogênicas pois, apesar de serem morfológicamente semelhantes, as leptospiros apresentam propriedades genotípicas e fenotípicas diferentes<sup>9,21,32</sup>. Cada sorovar pode estar associado a uma característica grave ou doença, afinidade por um hospedeiro ou distribuição geográfica distinta, por exemplo a *L. interrogans* sorovar hadjo tem nos bovinos seus hospedeiros naturais enquanto que em cães os mais comuns são os sorovares icterohaemorrhagiae e canícola<sup>3,21,24,61</sup>.

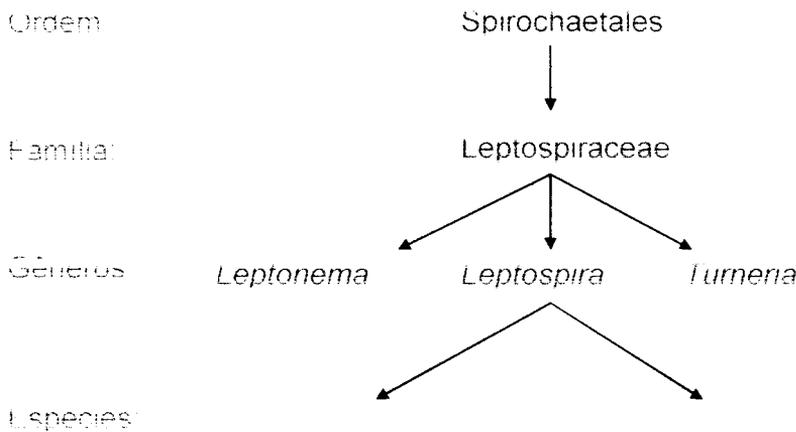


TABLE 2. Genomospecies of *Leptospira* and distribution of serogroups a  
Species Serogroups b

<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
<i>L. santarosai</i>	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii c</i>	Codice
<i>L. biflexa c</i>	Semarang, Andamana
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae,
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
<i>L. inadai</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
<i>L. parva c</i>	Turneria
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini

a Based on data reported by Brenner et al. (81) and Perolat et al. (450)  
b Serogroups Semarang, Andamana, Codice, and Turneria contain nonpathogenic leptospires.

c Currently only nonpathogenic strains of these species are known.

TABLE 3. Genomospecies associated with serogroups a  
Serogroup Genomospecies

Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Codice	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Semarang	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i>

a Based on data reported by Brenner et al. (81) and Perolat et al.

Figura 2 Desenho esquemático simplificado da taxonomia da *Leptospira* adaptado de LEVETT (2001).

A grande variação antigênica, amplo número de possíveis hospedeiros e a capacidade de sobreviver, persistindo no meio ambiente favorável (umidade, veículo hídrico) por até seis meses são fatores ligados ao agente etiológico que possibilitam a persistência da leptospirose como um importante agravo em termos de saúde pública. Os animais são os reservatórios essenciais para a persistência dos focos da infecção, enquanto os seres humanos são apenas hospedeiros acidentais ou incidentais, não se tomando portadores crônicos, salvo em raros casos de transmissão interhumana<sup>47</sup>. A leptospirose é considerada a antropozoonose mais difundida no mundo, devido à habilidade do patógeno de induzir um estado de portador em uma gama extensa de animais selvagens e domésticos<sup>16,21,32,58</sup>. Quase todos os mamíferos e marsupiais podem ser reservatórios para a *Leptospira*, porém os principais são roedores domésticos, das espécies *Rattus norvegicus* (figuras 3 e 4) que é o roedor urbano de maior porte, seu habitat é o solo das redes de esgoto e terrenos baldios onde escava túneis subterrâneos como tocas, alimentando-se de lixo; *Rattus rattus* (figuras 5 e 6) também um roedor urbano de grande porte porém menor que a ratazana, faz seus ninhos em árvores ou nos telhados dos domicílios e *Mus musculus* ou camundongo (figuras 7 e 8) que é o de menor porte entre os roedores do cenário urbano, habita o interior dos domicílios em porões, armários. O *Rattus norvegicus* é o principal portador da *Leptospira Icterohaemorrhagiae*, uma das mais patogênicas para o homem. Outros reservatórios do patógeno também importantes são: caninos, suínos, bovinos, eqüinos, ovinos e caprinos.



Figura 3 Foto do *Rattus Norvegicus*.

Fonte: [www.educ.csmv.qc.ca](http://www.educ.csmv.qc.ca)



Figura 5 Foto do *Rattus rattus*.

Fonte: [www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org)



Figura 7 Foto do *Mus Musculus*.

Fonte: [www.hlasek.com](http://www.hlasek.com)



Figura 4 Esquema das características físicas do *Rattus Norvegicus*

Fonte [www.technovet.com.br](http://www.technovet.com.br)

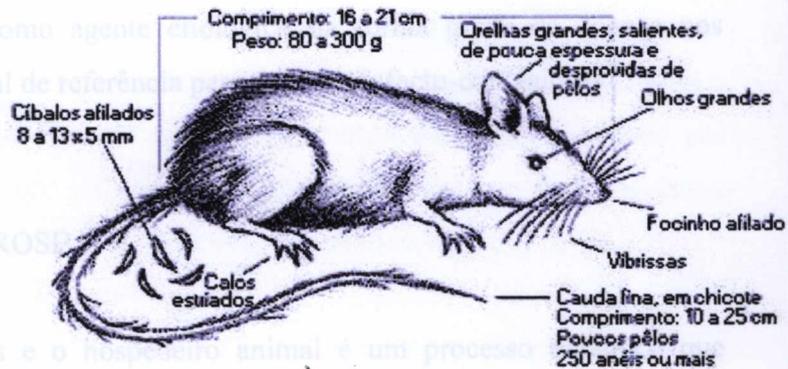


Figura 6 Esquema das características físicas do *Rattus rattus*.

Fonte [www.technovet.com.br](http://www.technovet.com.br)

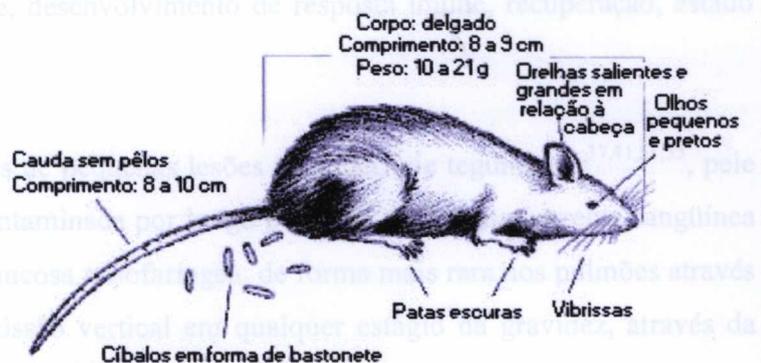


Figura 8 Esquema das características físicas do *Mus Musculus*.

Fonte: [www.technovet.com.br](http://www.technovet.com.br)

Alguns dos reservatórios animais ao se infectarem não desenvolvem a doença, albergam a *Leptospira* nos rins e a excretam viável no meio ambiente, principalmente através da urina, possibilitando a contaminação da água, solo, esgotos, lama e alimentos, entre outros. A leptospirose é mantida pela colonização persistente dos túbulos proximais nos rins dos animais considerados reservatórios, podendo um animal infectado apresentar-se assintomático e estar liberando organismos infectantes na urina durante todo o seu período de vida. A excreção pela urina pode ser intermitente ou contínua. A *Leptospira* necessita de um meio alcalino para sobreviver e proliferar (urina alcalina), desta forma, animais que excretam urina alcalina (herbívoros) são portadores mais relevantes que os demais<sup>9,21,43</sup>. Em Salvador, as diferenças na gravidade do quadro clínico não parecem relacionadas às diferenças no sorovar do patógeno. Durante uma epidemia em 1996, a *Leptospira interrogans* sorovar copenhageni (sorogrupo Icterohaemorrhagiae) foi identificada como agente etiológico da forma grave da doença nos indivíduos internados no hospital estadual de referência para doenças infecto-contagiosas<sup>36</sup>.

### 2.3 FISIOPATOGENIA DA LEPTOSPIROSE

A interação entre as leptospirosas e o hospedeiro animal é um processo dinâmico que envolve fatores relacionados tanto ao agente etiológico quanto ao hospedeiro. Existem mecanismos através dos quais as leptospirosas podem causar lesão em seu hospedeiro: penetração, sobrevivência, crescimento, toxicidade, desenvolvimento de resposta imune, recuperação, estado de portador, imunidade à reinfecção<sup>21</sup>.

As leptospirosas penetram através de pequenas lesões na superfície tegumentar<sup>37,41,51,55</sup>, pele e mucosa íntegras imersas em água contaminada por longo período<sup>10,37,43,44</sup>, na corrente sanguínea ou sistema linfático pela conjuntiva, mucosa nasofaríngea, de forma mais rara nos pulmões através da inalação de aerossóis, pela transmissão vertical em qualquer estágio da gravidez, através da ingestão ou inalação de água após imersão<sup>2,11,37,55</sup>, ingestão de alimentos contaminados, contato com sangue, tecidos e excretas animais, mordeduras<sup>37</sup>. A infecção inter-humana é extremamente rara e pode ocorrer através do contato com urina, sangue, secreções, e tecidos de pessoas infectadas. As leptospirosas se disseminam imediatamente da porta de entrada (lesões, por exemplo)

para a corrente sanguínea, circulando por todo o corpo, sendo encontradas primeiramente nos pulmões, fígado e baço<sup>22</sup>. *Leptospiras* não virulentas são eliminadas de forma rápida por aglutinação, opsonização ou fagocitose em animais já imunes ou, em animais não imunes, podem se reproduzir e causar danos ao endotélio vascular. Aquelas que sobrevivem crescem exponencialmente na corrente sanguínea e tecidos.

O número elevado de leptospiras no sangue e tecidos leva ao surgimento de lesões. A primeira lesão consiste no rompimento da integridade da membrana celular das células endoteliais e pequenos vasos em todas as partes do corpo, provavelmente devido à deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos e órgãos. Este evento pode resultar em extravasamento capilar e hemorragia<sup>55</sup>, originando isquemia local e necrose tubular renal, hepatoesplenomegalia, meningite, icterícia, episódios hemorrágicos. Alguns órgãos como o fígado podem se recuperar dos danos sofridos, porém o coração, por exemplo, a depender da gravidade da miocardite, tende a apresentar seqüelas. A imunidade a uma infecção inicial é aparentemente apenas humoral por tratar-se de um patógeno extra-celular e pode ser transferida de forma passiva através da placenta, colostro ou soro, embora os mecanismos de imunidade celular não estejam elucidados.

Nos animais que não morrem por leptospirose aguda, as leptospiras podem persistir em alguns tecidos, protegidas dos anticorpos da corrente sanguínea, especialmente nos túbulos renais proximais, são excretadas vivas na urina, encapsuladas por polissacarídeo ou proteína com origem no próprio hospedeiro, isto permite que elas não sofram aglutinação em contato com anticorpos aglutinantes. A imunidade adquirida pós-infecção, que resulta da maturação e desenvolvimento de uma resposta imunológica mediada por células B, é sorotipo-específica. Uma reinfecção com a mesma sorovar ocorre raramente, mas uma reinfecção com diferente sorovar pode ocorrer com mais facilidade. Ainda não se compreende o motivo de apenas, no máximo, 10% dos indivíduos infectados, evoluírem para a forma grave da doença enquanto os demais evoluem assintomáticos ou com sintomatologia semelhante à de um resfriado comum<sup>24</sup>. Sabendo-se que as complicações mais graves surgem após o desenvolvimento de uma resposta adaptativa e que ocorrem as alterações funcionais mesmo diante do pequeno número de leptospiras encontradas nos tecidos, falta entender se as lesões têm como causa principal reações imunológicas como se acredita que

acontece no caso da hemorragia pulmonar<sup>45</sup> ou a toxicidade bacteriana como parece ocorrer no tecido hepático<sup>9</sup>.

A leptospirose é comumente definida como uma doença generalizada associada à diátese hemorrágica de patogenia pouco compreendida que é a uma manifestação grave da leptospirose e manifestada por hemorragia gengival, púrpura, equimose, hematúria identificada macroscopicamente, hematêmese e melena, hemoptise, sangramento difuso em diversos órgãos, sufusão conjuntival especialmente ao redor da córnea, causada por dilatação vascular<sup>4,16,17,23,62</sup>. A perda de função do tecido antecede o surgimento de reação inflamatória, que parece refletir apenas efeitos tóxicos ou alterações isquêmicas secundárias ao dano vascular<sup>3,63</sup>. O quadro morfológico renal é classicamente descrito como lesão do epitélio tubular associado à nefrite intersticial. Alterações degenerativas, como tumefação do epitélio tubular e das células endoteliais, são precoces<sup>3,4,18,63</sup>. A inflamação do tecido renal é um achado tardio na evolução da doença. A nefrite desenvolve-se nos pacientes que sobrevivem o tempo necessário para desenvolvê-la e pode evoluir para necrose tubular. Este quadro foi comparado ao da nefrite nefrotóxica por diversas etiologias, admitindo-se a possibilidade de lesão mediada diretamente pela *Leptospira* ou seus produtos<sup>3,4,18,21,63</sup>.

A icterícia é um achado típico nas formas graves de leptospirose, mas não está relacionada à necrose hepatocelular. O quadro histológico predominante é a destrabeculação das células hepáticas com alterações citológicas de aspecto regenerativo como mitoses, binucleação e multinucleação. O infiltrado inflamatório tende a ser discreto e restrito às áreas portais<sup>3,4,18,63</sup>. Nos pulmões, podem ser observadas congestão, hemorragia focal sub-pleural e intersticial, nos casos de hemorragia pulmonar grave o extravasamento de sangue pode ocorrer nos bronquíolos e brônquios. Alterações eletrocardiográficas ocorrem freqüentemente contrastando com o achado incomum de disfunção cardíaca clinicamente detectável, miocardite intersticial com infiltrado leucocitário focal. A ativação leucocitária e a secreção de citocinas pró-inflamatórias ocorrem em respostas a componentes da *Leptospira* como lipopolissacarídeo, extrato de glicolipoproteína e proteoglicana. A trombocitopenia é achado freqüente da patologia humana. O quadro fisiopatológico da leptospirose parece estar mais ligado à púrpura trombocitopênica trombótica desencadeada por lesão endotelial e ativação plaquetária<sup>18</sup>.

A mialgia, devido à degeneração da musculatura estriada levando a intenso espasmo muscular, é um sintoma freqüente da leptospirose aguda. Também o são os sintomas de irritação meníngea, pois um quadro auto-limitado de meningite linfocítica pode ocorrer mesmo em casos oligossintomáticos muitas vezes não diagnosticados<sup>9,21</sup>. A hemorragia pulmonar vem sendo reconhecida como importante fator de prognóstico sombrio e causa de óbito<sup>9,24,59</sup>, a forma grave e hemorrágica do acometimento pulmonar pode ocorrer em epidemias ou casos esporádicos, associada ou não à icterícia. O mecanismo de hemorragia na doença de Weil inclui dilatação dos vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade capilar causado pela ação de toxinas da *Leptospira* com extravasamento de hemáceas dos vasos, podendo ocorrer rutura capilar<sup>26,42,59</sup>.

## 2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

A infecção por *Leptospira* patogênica produz uma diversidade de sinais e sintomas clínicos que podem variar desde uma infecção sub-clínica ou auto-limitada até a apresentação clássica denominada doença de Weil que representa de 5 a 10% do total de casos<sup>17,55</sup> e é potencialmente fatal<sup>23, 37, 52</sup>. A taxa de letalidade varia de 5 a 20%. Nas formas mais graves, que evoluem com disfunção de múltiplos órgãos e sistemas e sepse, incluindo hemorragia pulmonar, a letalidade pode chegar a 50%<sup>24,26,36,42</sup>.

A gravidade da infecção pode estar relacionada a fatores, tais como o sorovar de *Leptospira* que o infecta, características do hospedeiro como a idade do indivíduo e seu estado nutricional. O período de incubação é usualmente dez dias, mas pode durar de dois a trinta dias<sup>21,34,35</sup>. Os quadros discretos (forma anictérica) apresentam sinais e sintomas inespecíficos como febre de início súbito, cefaléia e mialgias, conjuntivite, anorexia, algia abdominal, náuseas e vômitos, hemorragias: subcutânea (petéquias e púrpuras), gengival e palatar, do trato gastrointestinal, conjuntival, genital, hematúria. Os sinais de infecção grave (forma ictérica) podem incluir icterícia, hepatoesplenomegalia, meningite asséptica, podendo evoluir para a mais grave forma que é a doença de Weil com falência renal (após lesão renal tubular e microvascular e evolução para nefrite) e hepática, miocardite, hemorragia pulmonar maciça e óbito. Esta forma é potencialmente letal se o indivíduo não for tratado de forma adequada<sup>10,15,17,24,37,43,46,50,62</sup>. Entre os

sinais e sintomas neurológicos, podem ocorrer cefaléia intensa, distúrbios da consciência, delírios, rigidez de nuca<sup>14,23,37,43</sup>.

A fase septicêmica ou fase de leptospiremia tem duração provável de quatro a sete dias, quando é possível isolar o agente do sangue ou líquido de indivíduos infectados pois há multiplicação do agente na corrente circulatória e em diversos órgãos, suas características são doença febril aguda (38 a 40°C), cefaléia, calafrios, mialgias, principalmente em panturrilhas, desconforto gastrointestinal, anorexia, sede intensa. Nesta fase, é constante a presença de afecção renal pela localização do microorganismo neste parênquima, os sinais e sintomas simulam um processo infeccioso e a icterícia por lesão hepática. Em seguida, ocorre remissão dos sintomas durante um a três dias. Após este período, pode ter início a fase imune ou fase de leptospirúria com duração de até um mês, é nela que ocorre a produção de anticorpos aglutinantes IgM que determinam a formação de imunocomplexos circulantes, a diminuição da leptospiremia, localização das leptospiras em locais de difícil acesso para os anticorpos produzidos (elas se acumulam nos túbulos contornados renais, câmara anterior do globo ocular, sistema reprodutivo) e a excreção das mesmas pela urina. Pode haver evolução do quadro com presença de meningite, meningoencefalite, pneumonia, fenômenos hemorrágicos, icterícia, insuficiências renal e hepática, hepatoesplenomegalia, hemoptise, hemorragia pulmonar maciça, miocardite (com alterações no funcionamento do órgão e, conseqüentemente no eletrocardiograma), podendo levar o paciente ao óbito<sup>14,21,24,37,59</sup>. A ocorrência de insuficiência renal aguda freqüentemente leva à falência de múltiplos órgãos e conseqüente óbito, sendo também a diátese hemorrágica e complicações neurológicas, assim como a insuficiência renal aguda, marcadores de prognóstico sombrio<sup>17</sup>. A síndrome de hemorragia pulmonar grave ocorrida em surtos como na Nicarágua e no Rio de Janeiro, não associada a icterícia e insuficiência renal, representa um novo padrão clínico com determinantes ainda desconhecidos e elevado número de óbito (até 50%) mesmo com suporte ventilatório intensivo<sup>26,42,59</sup>.

A maior parte dos casos de leptospirose não é diagnosticada devido à inespecificidade de sinais e sintomas, isto permite a confusão com doenças que vão desde um resfriado comum ou uma gripe a outras mais graves como meningite, hepatites, malária, dengue, febre amarela, entre outros. A confirmação do diagnóstico toma-se difícil, pois é laborioso isolar o organismo e

realizar os testes laboratoriais<sup>34,35</sup>. A história clínica, sintomas e achados no exame físico, dados epidemiológicos como relatos de exposições ambientais de risco podem levar a uma suspeita do diagnóstico clínico precoce de leptospirose, porém, é necessária a confirmação laboratorial. Entre os sinais e sintomas que podem ser relatados e levar à suspeita de leptospirose estão: doença febril aguda, cefaléia, rash de mucosa e tegumento, sufusão conjuntival, algia muscular especialmente em panturrilhas. Proteinúria, leucocitose com neutrofilia e alta sedimentação eritrocitária são achados laboratoriais que auxiliam no diagnóstico precoce<sup>37</sup>. Os indivíduos geralmente se recuperam completamente da forma leve. Se ocorre o progresso da leptospirose para sua forma grave com hemorragia de órgãos vitais, falências renal e hepática, tratamento com diálise e suporte podem elevar as chances de sobrevivência, porém complicações pulmonares e cardiológicas podem levar à morte<sup>18,42</sup>.

A *Leptospira* pode ser identificada na urina, em fluidos corporais e tecidos através de observação microscópica (diagnóstico direto), podendo ser isolada em meios de cultivo e inoculada em animais de laboratório (hamster, cobaio jovem). A confirmação do diagnóstico pode ser feita através de testes laboratoriais, sendo que a microaglutinação (MAT) é considerada o método de referência ou padrão-ouro na confirmação do diagnóstico de leptospirose<sup>43</sup>. Ela é realizada a partir de antígenos vivos, além de detectar anticorpos específicos, é usada na identificação e classificação dos sorovares isolados. Na MAT, teste bastante laborioso, são utilizados antígenos dos sorovares representativos de todos os sorogrupos ou daqueles mais representativos em cada contexto<sup>43</sup>. Os anticorpos aglutinantes começam a ser produzidos por volta dos sete dias de infecção podendo permanecer a níveis detectáveis pelo teste por três anos ou mais em alguns indivíduos<sup>37</sup> ou por toda a sua vida. O acréscimo de quatro vezes ou mais no título de anticorpos entre duas amostras pareadas confirma o diagnóstico de infecção aguda, embora, na análise de amostras positivas deva ser considerada a reação cruzada de anticorpos pois as reações podem não ser específicas para um determinado sorovar<sup>37</sup>, as dificuldades inerentes ao teste o tornam realizável em laboratórios de referência<sup>21</sup>. Um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção (inicial) pois o nível de anticorpos produzidos pode ainda ser insuficiente para se tornar detectável ao teste.

Os anticorpos começam ser detectados na primeira semana da doença (três a dez dias) e alcançam títulos máximos por volta da terceira e quarta semanas quando começam a decair progressivamente por semanas ou meses, podendo persistir por anos<sup>37</sup>. Por este motivo, toma-se difícil afirmar, diante de um resultado positivo (reagente), se a infecção está em atividade ou já ocorreu no passado. Uma outra limitação do teste, relacionada à detecção de casos graves, é a necessidade de amostras pareadas para confirmação de diagnóstico. Outro teste utilizado é o ELISA IgM (imunoenzimático) que detecta anticorpos na primeira semana da doença, pois os anticorpos aglutinantes IgM. Este teste é menos laborioso que a microaglutinação e mais fácil de interpretar especialmente quando não se possui amostras pareadas. Porém, é aconselhável uma posterior confirmação pela MAT pois o resultado do ELISA é considerado preliminar<sup>43</sup>. Os testes ELISA IgM e antígenos recombinantes são mais sensíveis que a microaglutinação porém não o suficiente para decidir as avaliações e intervenções clínicas<sup>24</sup>. Métodos baseados na detecção do DNA da bactéria demonstram positividade na fase inicial da doença porém são utilizados apenas em nível laboratorial para pesquisas.

O medicamento de eleição para quimioprofilaxia após exposição por curto período de tempo é a doxiciclina. Porém, seu uso contínuo como rotina ou prolongado em riscos ocupacionais não é indicado. A antibioticoterapia deve, preferencialmente, ser implementada o mais breve possível, sete a dez dias após infecção e deve ser fornecida imediatamente diante de suspeita ou diagnóstico de leptospirose. A terapêutica com antibiótico parece reduzir o avanço dos sintomas e a ocorrência de seqüelas, podendo prevenir evolução para as manifestações mais graves da doença, embora ainda seja um assunto controverso<sup>35</sup>. A antibioticoterapia é útil na remoção das leptospiras dos tecidos embora não reverta os danos já causados. As leptospiras são resistentes ao cloranfenicol, vancomicina, rifampicina. O medicamento de escolha para tratamento é a penicilina G cristalina na dose para adultos de 6 a 12 milhões de unidades/dia, divididas em 4 doses diárias, durante 7 a 10 dias<sup>21</sup>.

Como alternativa podem ser utilizadas a ampicilina (4g/dia para adultos), a tetraciclina (2g/dia para adultos) ou a doxiciclina (100mg de 12/12horas) por igual período. Para os pacientes com história de hipersensibilidade à penicilina, que apresentarem lesão renal e icterícia, sugere-se o uso de cefotriaxona. A tetraciclina e a doxiciclina são contra-indicadas em pacientes com

insuficiência renal aguda ou hepática, gestantes, crianças menores de nove anos. Porém, o tratamento atual concentra-se na quimioterapia sintomática e de suporte, a exemplo de reposição hidroeletrólítica por via endovenosa, assistência cárdio-respiratória, hemotransfusões, nutrição enteral ou parenteral, proteção gástrica, correção do desequilíbrio ácido-básico se necessário, avaliação de fenômenos hemorrágicos para indicar transfusões, monitoração contínua dos sinais vitais, analgésicos para mialgias e cefaléia, antipiréticos para hipertermia, diazepam no caso de convulsões. A realização do balanço hídrico rigoroso para ingestão e perdas é de extrema importância para se indicar a instalação de diálise peritoneal precoce aos primeiros sinais de oligúria, o que reduz o dano renal e as taxas de letalidade da doença<sup>2</sup>. É necessário acompanhamento de hemograma, dosagem sanguínea de uréia, creatinina e eletrólitos, volume urinário, balanço hídrico, temperatura, tensão arterial, pulso, nível de transaminases, tempo de protombina, realizados eletrocardiograma e raios X de tórax, entre outros que se fizerem necessários, tudo isto para nortear as intervenções antes citadas.

## 2.5 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

### 2.5.1 LEPTOSPIROSE NO MUNDO

A leptospirose é uma antroponose de importância global<sup>9,61</sup>, estando distribuída em todos os cinco continentes, nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, dos países considerados desenvolvidos aos em desenvolvimento<sup>52</sup>. Porém, sua incidência é maior nas regiões tropicais onde encontra condições mais favoráveis para transmissão<sup>9,21,61</sup>. As atividades ocupacionais e exposições da população em geral durante sua rotina, sobretudo associada à pobreza, aos períodos de chuva (sazonalidade) são de grande importância<sup>9,16,43,60,61</sup>. A leptospirose foi considerada, primariamente, como uma doença rural ou ocupacional associada a pessoas que trabalham em esgotos, em lavouras de arroz, açougueiros, pescadores, veterinários e militares<sup>9,11,21,34,57</sup>. Nos países em desenvolvimento, ocorrem muitos casos em ambientes urbanos como epidemias associadas a estações chuvosas e enchentes relacionados às condições precárias de vida e saneamento (bairros pobres; favelas)<sup>6,8,16,17,19,36,38,52,59</sup> ou, em países considerados desenvolvidos, às atividades recreativas que envolvem imersão em água ou enchentes<sup>11,15,19,25,30,43,44,50,57</sup>.

A leptospirose é uma antropozoonose de grande importância social e econômica por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, alto custo hospitalar, perdas de dias de trabalho e também por sua letalidade. O impacto sócio-econômico da leptospirose pode ser avaliado pelos custos diretos e indiretos. Em termos de custos diretos, o impacto da leptospirose para o setor saúde está relacionado à gravidade da doença - a consequência é um elevado número de hospitalizações o que demanda alto investimento em cuidados de terapia intensiva, ventilação mecânica, diálise. A morbi-mortalidade associada às formas clínicas graves são os principais determinantes do impacto em saúde pública causado pelas epidemias emergentes. Vale ressaltar ainda as implicações na produtividade pois a população mais acometida é formada por indivíduos do sexo masculino em idade produtiva (20 a 40 anos) levando, portanto, a uma perda na relação produtividade/tempo e faltas no trabalho por ser uma doença incapacitante. Também ocorrem perdas na pecuária dos animais que produzem carne, leite, lã e morte de animais domésticos de estimação. Em termos de custos indiretos, poderíamos citar o investimento na pesquisa, desenvolvimento, produção e avaliação de vacinas para animais e seres humanos, controle de roedores (anti-ratização e desratização), ações de vigilância, custos com equipamentos de proteção individual, processamento de alimentos.

A ocorrência da forma grave, denominada doença de Weil, está relacionada às precárias condições de infra-estrutura sanitária e alta infestação de roedores infectados<sup>19</sup>. As inundações propiciam a disseminação e a persistência do agente causal no ambiente, facilitando a eclosão de surtos. Fatores como atividade do reservatório animal, potencial do ambiente em garantir sobrevivência do organismo, comportamento e hábitos ocupacionais podem ser determinantes da incidência e prevalência da doença<sup>55</sup>. Os dados de incidência de leptospirose são subestimados devido à forma sub-clínica da doença que pode ser confundida com um resfriado comum e tende a passar despercebida<sup>9,32,35,60</sup>. Estudos também associam soroconversão com história de doença febril<sup>33</sup>. A inexistência de um teste diagnóstico rápido para leptospirose também colabora para subestimar o número real de casos, sendo o diagnóstico precoce o fator mais importante para o prognóstico do indivíduo que apresenta a forma grave da doença<sup>9,35,37</sup>.

A leptospirose pode ocorrer em indivíduos de todas as idades e em ambos os sexos<sup>37</sup>, porém, entre os casos notificados as maiores frequências têm sido encontradas entre indivíduos do

sexo masculino, na faixa etária de 20 a 40 anos<sup>3,43,52</sup>, sendo a taxa de mortalidade crescente de acordo com a idade<sup>37</sup>. As condições ambientais afetam intensamente a transmissão da leptospirose através da modificação da biologia e comportamento da população e da ecologia das espiroquetas e seus hospedeiros. Ela é considerada uma doença primariamente de mamíferos domésticos ou selvagens sendo o homem infectado acidentalmente por contato direto ou indireto com a urina de animais contaminados<sup>9,21,31,43,49,61</sup>. As fontes mais frequentes de infecção são água superficial, lama e solo contaminados por urina do animal infectado<sup>43,60,62</sup>. A eliminação da *Leptospira*, através da urina destes animais, ocorre de forma intermitente, podendo durar por toda a sua vida, segundo a espécie animal e o sorovar envolvido.

## 2.5.2 LEPTOSPIROSE NO BRASIL

Estudos<sup>36,58,61</sup> apontam a leptospirose como um problema de saúde pública que está emergindo novamente nos centros urbanos. No Brasil, é considerada uma doença endêmica (figura 9), com a migração da zona rural para urbana e o crescimento populacional ocorreu a formação de favelas desprovidas de infra-estrutura sanitária adequada, aumentando o potencial para a infecção por *Leptospira*<sup>29</sup>, pois um importante fator de risco identificado é algamento<sup>5,6,19,21,24,36,59</sup>. O número de casos está em ascensão associado ao crescimento da população urbana. No nosso país, a leptospirose é a causa de epidemias urbanas com mais de 10.000 casos graves por ano com surtos relacionados aos períodos de chuvas intensas<sup>5,6,13,36</sup> semelhante ao que se observa em várias partes do mundo<sup>43</sup>. Entre os casos notificados, as maiores frequências têm sido encontradas entre indivíduos do sexo masculino, na faixa etária de 20 a 40 anos, ainda que não seja comprovada uma predisposição de gênero ou de idade para contrair a infecção<sup>36</sup>. Em nosso meio, a maior parte dos casos ocorre entre pessoas que habitam ou trabalham em locais com más condições de saneamento e expostos à urina de roedores<sup>36,55</sup>.

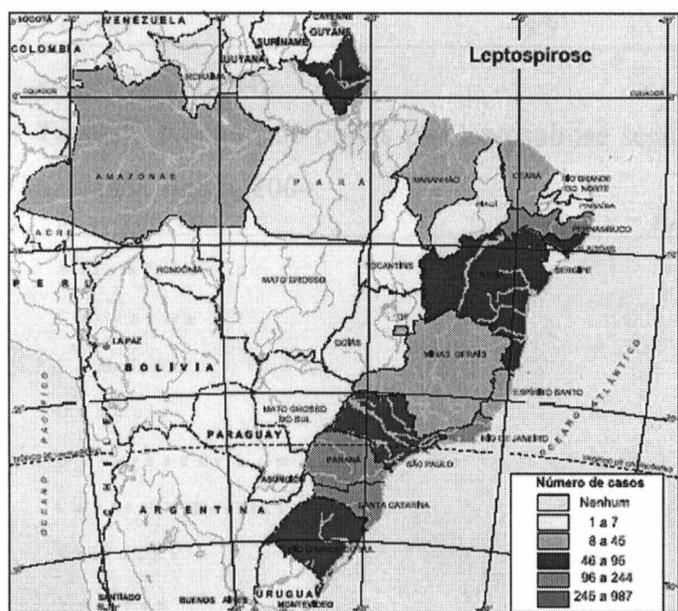
Nas áreas urbanas, as populações com baixas condições sócio-econômicas estão mais vulneráveis à aquisição da doença. Elas habitam locais suscetíveis a inundações, carentes de infra-estrutura e saneamento básico, com alta proliferação de roedores. Estes fatores diante das fortes chuvas (sazonalidade) e drenagem ineficiente da água levam às inundações. As medidas

preventivas utilizadas não demonstram efetividade, isto pode ser comprovado pelo alto índice de morbi-mortalidade da leptospirose, especialmente nos períodos de chuvas torrenciais, comprovando a necessidade de desenvolver medidas preventivas de forma a otimizar recursos humanos e materiais, mantendo uma boa relação custo-benefício. As medidas de prevenção disponíveis estão concentradas em intervenções sobre os elos da cadeia epidemiológica objetivando a quebra da mesma: controle de reservatórios, proteção aos que trabalham em atividades consideradas de maior risco, melhoria das condições higiênico-sanitárias da população e medidas corretivas no meio ambiente<sup>37</sup>.

No Brasil, não está disponível a imunização para humanos mas os animais como cães, bovinos e suínos devem ser vacinados anualmente para não adoecerem ou transmitirem a doença. Os animais suspeitos de estarem doentes devem ser isolados, diagnosticados e tratados. Quanto ao controle dos principais reservatórios, as medidas utilizadas são a anti-ratização, que objetiva mudar as características ambientais que favorecem a penetração, a instalação e a livre proliferação de roedores, por meio da eliminação dos fatores que propiciam o acesso desses animais a alimento, água e abrigo e a desratização ou eliminação direta dos roedores através de métodos mecânicos e químicos. As intervenções no cenário urbano se concentram no controle e eliminação do rato doméstico como reservatório (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*), porém a alta densidade de ratos no ambiente urbano torna as medidas de controle químico e ecológico caras para países em desenvolvimento. As vacinas contra leptospirose são específicas para sorogrupos, a imunidade é de breve duração (são bacterinas) o que exige reforços periódicos elevando seu custo e impossibilitando sua utilização sistemática nos países em desenvolvimento. Alguns efeitos adversos que levam desconforto aos indivíduos como hipertermia também colaboram para limitar o uso das vacinas sendo que, em países como França e alguns países europeus, a vacinação é direcionada a grupos de alto risco para aquisição da doença<sup>46</sup>.

Algumas medidas de prevenção são voltadas para cuidados de higiene e saneamento básico, tais como, cuidados com água e alimentos para evitar contaminação, drenagem de água pluvial e servida, coleta de lixo, medidas para evitar contato com água e solo contaminados (equipamentos de proteção individual). Porém, uma medida de prevenção extremamente importante é a educação em saúde que auxilia na conscientização da comunidade a respeito da

epidemiologia da doença e formas de prevenção, é uma estratégia para conscientizar a todos sobre a responsabilidade de cada um no bem-estar coletivo e continua sendo uma opção pouco explorada pela comunidade e pelo poder público. O diagnóstico a nível ambulatorial e o início da antibioticoterapia nos primeiros dias de doença pode impedir a progressão de infecção clínica para doença grave<sup>35</sup>. A forma grave da leptospirose é uma doença fulminante e mais de 50% dos óbitos ocorrem nas primeiras 48 horas de hospitalização. Apesar de medidas agressivas de suporte e terapia com penicilina, a letalidade permanece maior que 10% sendo que a apresentação clínica ampla e não específica da leptospirose inicial dificulta a identificação de casos na fase inicial da doença<sup>24,36</sup>. A identificação de fatores de risco geográficos, sociais, culturais, climáticos, ocupacionais, aparentemente deveria tomar mais fácil prevenir a leptospirose, porém a dificuldade em controlar ou modificar estes fatores, a complexidade da interação homem e meio ambiente, fatores desconhecidos ou altamente mutáveis contribuem para a persistência da alta prevalência da doença e das epidemias cíclicas durante o período de chuvas fortes. A terapêutica não mostra resultados pois o número de casos por ano e a letalidade permanecem elevados, a busca pelo conhecimento e a prevenção ainda se mostram como as grandes armas para reduzir o número de casos<sup>24,36</sup>.



Fonte: IBGE (2004)

Figura 9 Distribuição espacial dos casos de leptospirose no Brasil no ano de 2000. Salvador, Bahia, 2004.

### 2.5.3 LEPTOSPIROSE NO ESTADO DA BAHIA E EM SALVADOR

O Ministério da Saúde, através do relatório de situação 2005 do sistema nacional de vigilância em saúde, identificou no ano de 2003 103 casos confirmados, com uma incidência de 0,8/100 mil habitantes. A letalidade encontrada foi de 19%. Para o ano de 2004, foram notificados 69 casos em nosso Estado. De acordo com a SESAB, foram identificados para os anos de 2004 e 2005, 32 e 78 casos de leptospirose seguidos de óbito, respectivamente. Salvador permanece como o município responsável por 50 a 69% dos óbitos em 2004 e 77 a 92% em 2005 (tabelas 1, 2, 3, 4). Isto reflete a posição da cidade tanto como o local com maior número de casos graves que evoluem para óbito, como de referência aos indivíduos que procuram tratamento para leptospirose.

Tabela 1 Número de óbitos por leptospirose segundo município de ocorrência no ano de 2004. Salvador, Bahia, 2004.

Município	Nº de óbitos
Itabuna	1
Lauro de Freitas	1
Salvador	36
Valença	1
Total	39

Fonte: SESAB (2004).

Tabela 2 Número de óbitos por leptospirose segundo município de residência no anos de 2004. Salvador, Bahia, 2004.

Município	Nº de óbitos
Alagoinhas	1
Cachoeira	1
Camaçari	1
Candeias	1
Governador Lomanto Júnior	1
Lauro de Freitas	2
Salvador	30
Valença	2
Total	39

Fonte: SESAB (2004).

Tabela 3 Número de óbitos por leptospirose segundo município de ocorrência no ano de 2005. Salvador, Bahia, 2005.

Município	Nº de óbitos
Ilhéus	1
Itabuna	7
Porto Seguro	1
Salvador	22
Valença	1
Total	32

Fonte: SESAB (2005).

Tabela 4 Número de óbitos por leptospirose segundo município de residência no ano de 2005. Salvador, Bahia, 2005.

Município	Nº de óbitos
Buerarema	1
Camaçari	2
Candeias	1
Ilhéus	2
Itabuna	2
Ipitanga	1
Jacobina	1
Mairi	1
Maragojipe	1
Porto Seguro	1
Salvador	16
São Sebastião do Passé	1
Ubaitaba	1
Município ignorado	1
Total	32

Fonte: SESAB (2005)

Fonte: SESAB (2005).

Salvador apresentou a partir de 1970 e 1980 um processo de crescimento sempre dinâmico, contínuo e progressivo resultando em uma cidade que se apresenta como "capital" do nordeste brasileiro e tem a imagem forte do turismo e modernos negócios. Este crescimento físico não necessariamente foi acompanhado de desenvolvimento. A cidade dos precariamente incluídos, a cidade dos pobres possui uma extensão e peso considerável na estrutura urbana de Salvador que se apresenta com padrão precário de ocupação, edificações nas encostas, ausência de saneamento básico e infra-estrutura de um modo geral<sup>28</sup>.

Resultados da vigilância hospitalar para leptospirose demonstraram que, em Salvador, a leptospirose ocorre em epidemias cíclicas anuais, relacionadas à pobreza, durante o período de chuvas acompanhadas por alagamento de zonas urbanas de baixas condições sanitárias<sup>13,16,59</sup>. Ao mesmo tempo em que a grande maioria das infecções resulta em formas auto limitadas, cerca de 15% desenvolvem complicações graves<sup>7</sup> como icterícia, insuficiência renal aguda e hemorragia pulmonar e os índices de mortalidade variam de 10-15% entre os casos graves identificados durante surtos relacionados ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda<sup>9</sup> e que podem ser elevados a 50% diante da ocorrência de hemorragia pulmonar que vem despertando atenção pelo crescente potencial de letalidade no Brasil e no mundo<sup>11,42,59</sup>. O sorogrupo Icterohaemorrhagiae é o mais incidente e os sorovares deste grupo são mais associados às formas ictericas da doença embora outros sorovares também possam causá-las. As taxas de incidência são subestimadas devido à falta de registros da doença, às diversas formas de manifestações clínicas que se confundem com outras patologias, dificultando o diagnóstico, e à ausência de testes diagnósticos rápidos e eficientes<sup>9,52</sup>.

### 3 RACIONAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

Na cidade de Salvador, a leptospirose é a causa de epidemias cíclicas associadas a chuvas torrenciais<sup>36</sup>. Isto ocorre anualmente, durante período sazonal (meses de março a agosto) afetando as populações residentes em favelas; foram identificados, por nossa vigilância no Hospital Couto Maia, referência estadual para doenças infecto-contagiosas, duzentos e cinquenta e oito casos no ano de 2005 e estas formas graves da leptospirose estavam associadas com alta taxa de mortalidade (5 a 40% em casos de hemorragia pulmonar grave)<sup>36</sup>. Durante um único período de alta precipitação entre março e novembro de 1996, uma vigilância no hospital estadual de referência para doenças infecto-contagiosas descreveu um surto de 326 casos de leptospirose grave, 80% eram indivíduos do sexo masculino, a média de idade foi de 35,9+/- 15,2. A incidência calculada foi de 12,5 casos por 100.000 indivíduos, a letalidade foi de 15% (50 casos) sendo que 50% dos óbitos ocorreram nas primeiras quarenta e oito horas de internação e a *Leptospira interrogans* sorovar *copenhageni* foi isolada de 87% dos casos, identificando o rato doméstico como o principal reservatório para as leptospiros em nossa cidade<sup>36</sup>.

Investigações tipo caso-controle em ambientes rurais e urbanos ressaltam a relevância de exposições ambientais na aquisição de infecção por *Leptospira*<sup>12,57,59</sup> e estudos ecológicos sugerem que regiões com esgotos abertos e propensas a inundações são ambientes que podem servir como fontes de contaminação<sup>5,6</sup>. Embora indivíduos das mesmas comunidades sejam frequentemente expostos às fontes de contaminação, só alguns desenvolvem leptospirose clínica; acreditamos então, que a progressão de infecção para doença grave pode estar associada a comportamentos de risco que influenciam a dose do inóculo durante exposições ambientais de risco.

Entre 1996 e 2001 nossa equipe de vigilância hospitalar identificou 1442 casos de leptospirose grave em Salvador, estes residentes principalmente em favelas, em grande parte chefes de família que ganhavam menos de um salário mínimo ( R\$ 260/mês, R2=0.29), e alta proporção de domicílios servidos por esgotos a céu aberto (R2=0.25). Padrões de risco demográficos e geográficos similares foram observados durante os cinco anos de vigilância

citados e permanecem sendo identificados na atualidade, sugerindo que os mesmos riscos de exposição de ano a ano são responsáveis pela natureza cíclica dos surtos de leptospirose grave. Cada epidemia ocorreu no mesmo período sazonal de aumento da precipitação pluviométrica seguida por inundações. É importante ressaltar que a doença em sua forma grave representa uma fração das infecções clínicas.

Um estudo tipo caso-controle foi conduzido em Salvador durante a epidemia de 2000 objetivando identificar fatores de risco para aquisição de leptospirose. Residência nas proximidades de um esgoto a céu aberto (OR pareado, 5.15; 95% IC, 80-14.74), ver ratos no peridomicílio (4.49; 1.57-12.83), ver grupos de cinco ou mais ratos (3.90; 1.35-11.27) foram fatores de risco independentes para leptospirose. Residência nas proximidades (a menos de cinco metros) de um esgoto aberto foi o fator de risco independente mais forte. Ver cinco ou mais ratos foi um preditor independente para leptospirose.<sup>55</sup> (Tabela 5).

Tabela 5 Fatores de risco para aquisição de leptospirose em um estudo caso-controle, Salvador, Bahia, 2001.

Fator de risco	Casos N <sup>o</sup> (%)	Controles N <sup>o</sup> (%)	OR (95% CI)*	OR ajustada (95% CI)*
Esgoto a céu aberto próximo à residência	42 (64)	48 (38)	5.08 (2.04 – 12.64)	5.15 (1.80 – 14.74)
Ver ratos no peridomicílio	46 (70)	58 (46)	3.40 (1.74 – 11.78)	4.49 (1.57 – 11.27)
Ver grupos com cinco ou mais ratos	27 (41)	22 (18)	5.00 (2.22 – 21.25)	3.90 (1.35 – 11.27)
Exposição ocupacional à contaminação	35 (53)	31 (25)	3.27 (1.48 – 7.22)	3.71 (1.35 – 10.17)

\* Mantel-Haentzel odds ratio e intervalos de confiança comparando casos e controles pareados por idade, sexo e local de residência.

Durante o surto de 2001, foi realizado um estudo domiciliar de infecção prévia por *Leptospira*. Concluiu-se que, contactantes dos casos-índice tinham 5.3 vezes (95% CI, 2.3-12.0) maior risco de ter uma infecção prévia do que contactantes dos controles-índice. Foram associados ao risco de adquirir infecção a presença de esgoto peridomiciliar a céu aberto OR=2.66 (1.5-4.9), alagamento da rua OR=2.29 (1.3-4.0); contato com lama, água de esgoto e ver mais que cinco ratos próximos ao domicílio. Este estudo demonstrou que exposições peridomiciliares foram associadas à aquisição da infecção por *Leptospira* durante as epidemias urbanas.

Diante do exposto acima, ainda existem duas questões críticas para responder ao problema: a primeira é que carga da doença é desconhecida, as formas graves provavelmente representam pequena fração das infecções. Sabemos por estudos realizados em nossa cidade, porém não publicados, que 8% dos pacientes que procuram as emergências em Salvador com doença febril aguda têm confirmação para leptospirose (Barbosa, 1999) e que 12% da população de Salvador tem evidência de infecção prévia (Dias, 2005). Porém, não há informações sobre a razão doença grave:infecção na literatura isto porque existem poucos estudos longitudinais realizados e, desta forma, não temos dados prospectivos para taxa de infecção. Outra questão relevante é que as medidas atuais de intervenção, especialmente focalizadas no controle do reservatório animal, não são efetivas e isto pode ser evidenciado pelo alto número anual de casos graves a cada ano. As medidas preventivas têm focalizado o controle químico de reservatórios que é altamente custoso/paliativo e o saneamento básico que em comunidades carentes é negligenciado. As informações a respeito dos fatores de risco para infecção podem nortear o desenvolvimento de medidas de saúde pública que sejam mais efetivas. Mas só possuímos informações retrospectivas do já citado estudo caso-controle pareado realizado em 2000 por nossa equipe<sup>55</sup>. Porém, este estudo esteve sujeito a vieses, especialmente de memória e são necessários , portanto, dados prospectivos para confirmar estes achados.

## **4 HIPÓTESES**

4.1 O número de infecções na população estudada está subestimado considerando-se a dificuldade de identificar formas assintomáticas e sub-clínicas;

4.2 Fatores ambientais (exposições) de risco estão relacionados às infecções assintomáticas/subclínicas, como ocorre com as formas graves da doença.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar prospectivamente a história natural da leptospirose em uma coorte de indivíduos residentes em comunidade carente na cidade de Salvador.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a taxa de infecção por *Leptospira* nessa coorte de indivíduos;
- Calcular a razão entre doença grave e infecções por *Leptospira*;
- Identificar fatores de risco para aquisição de infecção por *Leptospira*.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 EQUIPE

A equipe do estudo era multidisciplinar e consistiu em doze profissionais distribuídos entre graduados, técnicos secundaristas na área de saúde e estudantes universitários. Deste total, sete indivíduos residiam na comunidade de Pau da Lima - São Marcos. Todos os membros do grupo receberam treinamento para as atividades de campo e eram periodicamente avaliados no desempenho de suas funções.

### 6.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa do CPqGM – Fiocruz/Bahia e pelo Hospital Presbiteriano de Nova Iorque, Colégio de Medicina de Weil na Universidade de Cornell nos Estados Unidos da América. Um censo entre os residentes de Pau da Lima foi

realizado no ano de 2003 para identificar idade e sexo. A equipe do estudo visitou todos os domicílios dos indivíduos informando os moradores a respeito dos riscos, benefícios do estudo, procedimentos a serem realizados no campo e aqueles para assegurar confidencialidade dos dados obtidos, enfim, os convidando a participarem sabendo seus direitos. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo (9.862) assinaram formalmente um consentimento livre e esclarecido.

O acompanhamento anual só foi realizado mediante o consentimento oral do indivíduo para reafirmar o consentimento escrito já assinado na sua inclusão no estudo. A quantidade máxima de sangue coletado foi de dez mililitros o que não comprometeu o estado clínico do indivíduo (protocolo anexo). As amostras de sangue coletadas foram transportadas para o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em automóvel oficial, para o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) onde foram efetuadas as alíquotas e posteriores análises sorológicas. Os resultados dos testes sorológicos foram entregues aos participantes de forma confidencial e com os esclarecimentos necessários à sua compreensão. Crianças menores de cinco anos de idade foram excluídas pois não apresentam risco significativo de desenvolver leptospirose grave. Estudos comprovam a benignidade da leptospirose na infância, mostrando a forma oligossintomática, e forma influenza-símile que ocorre nesta faixa etária<sup>58</sup>. Estes grupos etários de crianças e adolescentes foram incluídos devido a seu elevado risco de desenvolver leptospirose grave assim como infecção por *Leptospira*, uma vez que os riscos aumentam significativamente com a idade (começando com o grupo em idade escolar primária).

Os riscos para os indivíduos foram mínimos e incluíram dor, desconforto, e equimose associados à coleta das amostras de sangue e possível desconforto nas respostas a questões sobre atividades diárias durante a execução dos questionários. O estudo realizado foi observacional. Uma equipe treinada e reavaliada mensalmente realizou as entrevistas e coletou amostras de sangue para minimizar os riscos potenciais. Todos os dados dos questionários foram codificados numericamente, impossibilitando a identificação dos participantes do estudo. Toda a informação contida nos questionários foi arquivada em armários trancados e digitada nos bancos de dados em computadores com senha e ligados a um único servidor. Apenas o investigador principal tinha acesso ao dicionário de dados. Antes de serem analisados, todos os dados foram validados. Semanalmente era realizado backup dos bancos de dados objetivando prevenir a perda das

informações digitadas. Este estudo teve como um dos seus objetivos identificar intervenções preventivas para leptospirose epidêmica, para a qual os indivíduos do estudo são considerados em alto risco. A partir desta identificação poderemos implementar intervenções de saúde pública no local de onde provêm os indivíduos do estudo e outras regiões similares em Salvador (comunidades carentes). Portanto, acreditamos que os benefícios potenciais se sobrepõem aos citados riscos.

### 6.3 DESENHO E LOCAL DO ESTUDO

A história natural da leptospirose só pode ser estudada prospectivamente, já que avaliações sorológicas longitudinais são necessárias para identificação de infecções assintomáticas e subclínicas. Com base nesta questão, o desenho do estudo foi uma coorte prospectiva realizada em uma comunidade de alto risco em Salvador (figura 10). A área do estudo foi constituída por parte dos bairros de Pau da Lima e São Marcos incluindo os vales principais (Figura 12). A Zona de Informação Pau da Lima foi escolhida pois era responsável, junto com o subúrbio ferroviário, pelo maior número de casos de leptospirose grave em Salvador. No contexto da cidade do Salvador, ela está localizada em região geograficamente central porém de difícil acesso, mas do ponto de vista de assistência à saúde e de distribuição de renda, ela é uma comunidade periférica.

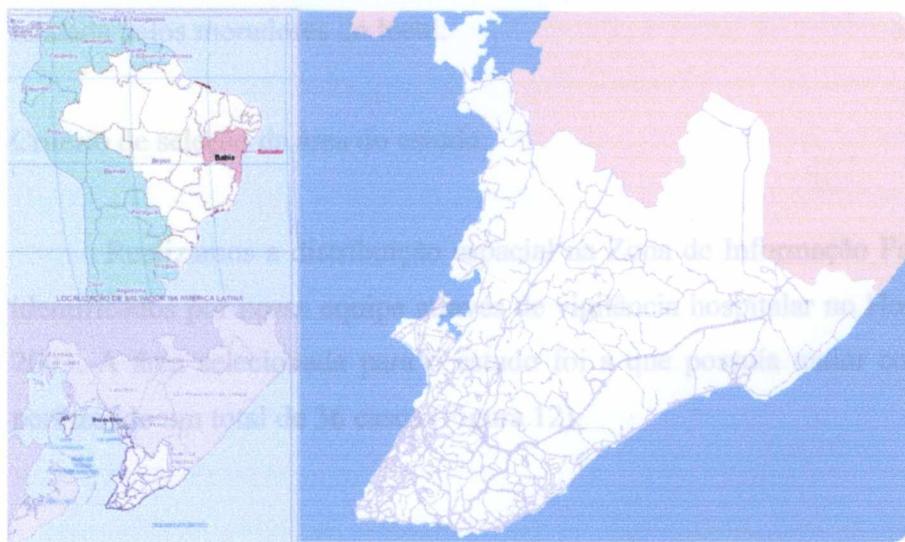


Figura 10 Área de Estudo História Natural da Leptospirose Urbana- localizada no contexto Brasil-Bahia- Cidade do Salvador. Salvador, Bahia, 2006.

Fonte: *Digitalização* a partir da base cartográfica SICAR/Região Metropolitana de Salvador.

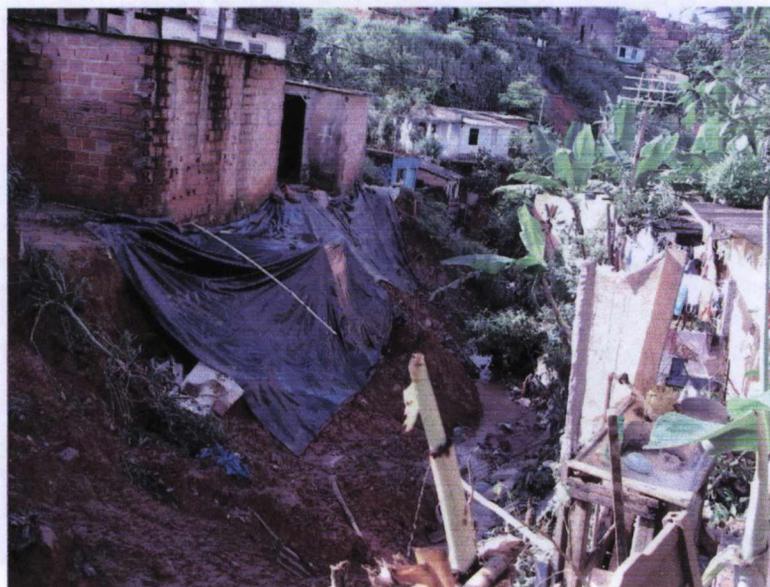


Figura 11 Foto de uma parte da área do estudo ressaltando o padrão das habitações no local. Salvador, Bahia, 2006.

A figura 11 mostra uma parte da área do estudo que representa o padrão do local: habitações precárias em encostas e vales, sujeitas a desmoronamentos e inundações, ausência de saneamento básico adequado. Os esgotos a céu aberto transbordam durante os períodos de maior índice pluviométrico, há também intensa população de ratos observada pela equipe de campo e relatada pelos moradores do local.

**Critério de seleção da área do estudo:**

Realizamos a distribuição espacial na Zona de Informação Pau da Lima dos casos graves identificados por nossa equipe através de vigilância hospitalar no Hospital Couto Maia de 1996 a 2003. A área selecionada para o estudo foi a que possuía maior concentração de casos graves, perfazendo um total de 36 casos (Figura 12).

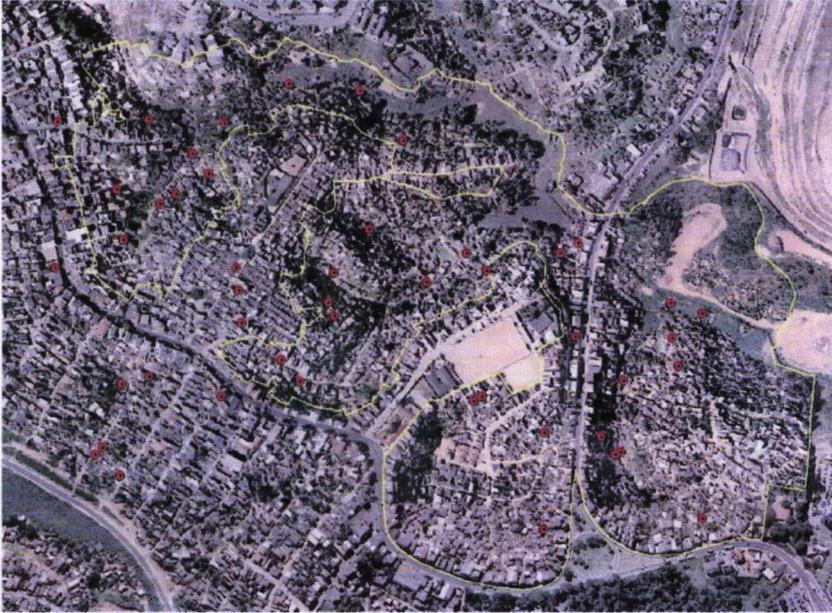


Figura 12 Área de Estudo História Natural da Leptospiriose Urbana: fronteiras de alto risco delimitadas pela distribuição de casos de leptospiriose grave entre 1996-2003 na Zona de Informação Pau da Lima. Salvador, Bahia, 2006.

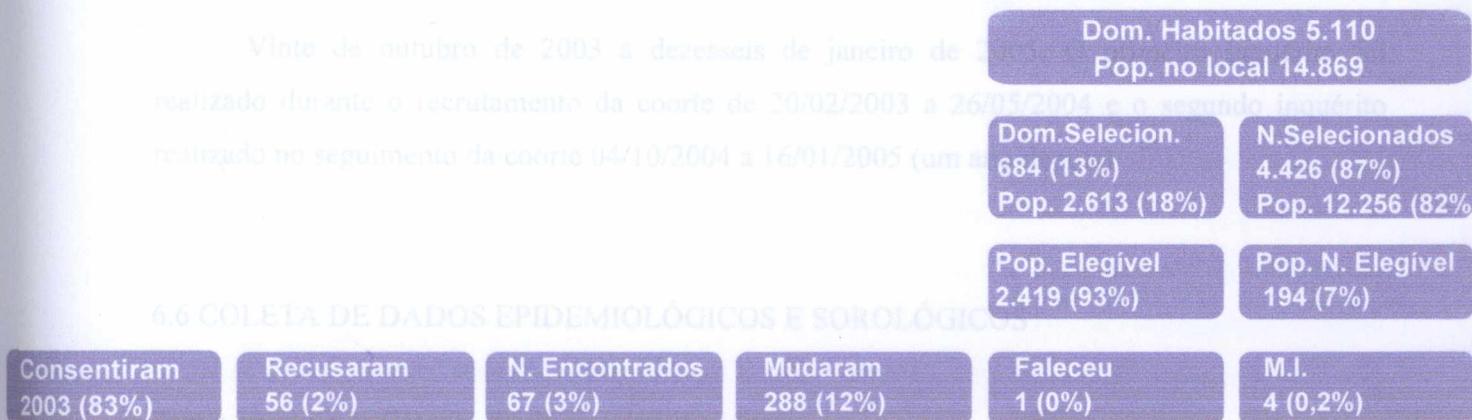
#### 6.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Realizamos um censo nesta comunidade, a coorte foi estabelecida em 2003 e identificamos 5.110 domicílios habitados por 14.869 indivíduos (figura 13), destes, 12.648 (85%) tinham cinco ou mais anos de idade. Deste total de domicílios, selecionamos randomicamente 684, ou seja, 13% (figura 14), com 2.613 residentes, dos quais, 2.419 (93%) preenchem os critérios para inclusão no estudo sendo, portanto, a população elegível.

##### Critérios de inclusão

- indivíduos residindo (dormindo, pelo menos, duas noites por semana) nos domicílios selecionados;
- idade igual ou superior a cinco anos;
- consentirem oralmente a participação no seguimento, pois já havia consentimento escrito e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz- Bahia.

Deste indivíduos elegíveis, 2003 (83%) consentiram a participação durante o recrutamento da coorte e 288 (12%) das perdas foram por mudança de domicílio (figura 13).



Nota: M.I. = Mentalmente Incapaz

Figura 13 Fluxograma dos indivíduos desde o censo até o final do recrutamento da coorte. Salvador, Bahia, 2006.

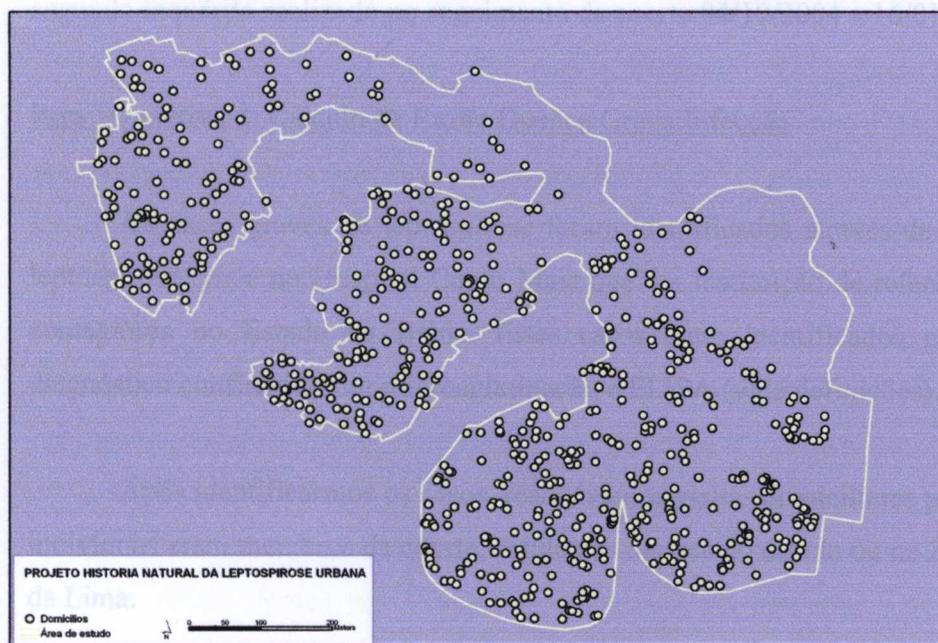


Figura 14 Área de Estudo História Natural da Leptospirose Urbana em Salvador: distribuição espacial dos 684 domicílios selecionados. Salvador, Bahia, 2006.

## 6.5 PERÍODO DO ESTUDO:

Vinte de outubro de 2003 a dezesseis de janeiro de 2005. O primeiro inquérito foi realizado durante o recrutamento da coorte de 20/02/2003 a 26/05/2004 e o segundo inquérito realizado no seguimento da coorte 04/10/2004 a 16/01/2005 (um ano depois).

## 6.6 COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS

### Para o objetivo 1: Cálculo das Taxas de infecção

As taxas de infecção foram mensuradas no período entre dois inquéritos sorológicos. O primeiro inquérito realizado durante o recrutamento da coorte de 20/02/2003 a 26/05/2004 e o segundo inquérito realizado no seguimento da coorte 04/10/2004 a 16/01/2005 (um ano depois).

### Para o objetivo 2: Cálculo da Razão Doença Grave:Infecção

Os casos graves de leptospirose foram identificados através de vigilância hospitalar para leptospirose grave no Hospital Couto Maia que é a instituição de referência para doença infecto-contagiosas no Estado da Bahia. Estes casos eram identificados por critérios clínicos e o diagnóstico confirmado por microaglutinação e ELISA (vide definições).

Após identificarmos os casos, realizávamos visitas domiciliares para confirmar se os indivíduos eram membros da coorte, residentes na área do estudo ou na Zona de Informação Pau da Lima.

### Para o objetivo 3: Identificação dos Fatores de Risco para Infecção

Entrevistas individuais foram realizadas no recrutamento e no seguimento da coorte. As informações que foram obtidas no primeiro inquérito (recrutamento da coorte), através de entrevista com questionário padronizado, foram: características demográficas (idade, sexo,

escolaridade, raça, renda familiar), história de doença prévia (hipertemia, leptospirose, dengue), informações ocupacionais (trabalho formal ou não, atividade profissional desempenhada especialmente relacionada às ocupações já identificadas como sendo de maior risco para aquisição de infecção por leptospirosas, local de trabalho), fontes ambientais de contaminação individual (contato com lama, lixo, água de alagamento, água de esgoto no peridomicílio, na rua ou no local de trabalho; alagamento da rua, alagamento do domicílio, desentupir esgoto da rua, presença de esgoto a céu aberto), reservatórios (criar cachorro, gato, galinha; ver ratos no peridomicílio ou no local de trabalho, número de ratos vistos de uma só vez e em que turno para entender se estamos tratando de infestação dos roedores). Muitas dessas questões tratam de exposições identificadas como fatores de risco importantes nas investigações de caso-controle e provavelmente não variam significativamente com o tempo.

O ambiente peridomiciliar foi inspecionado para determinar a presença e a proximidade de esgotos abertos, área de alagamento, evidência de infestação de ratos e condições ambientais que servem de habitat para os roedores. Até o momento, não existem métodos disponíveis para detecção ambiental de *Leptospira* patogênica que possam avaliar diretamente exposições dependentes do tamanho do inóculo. Contudo, nossas investigações de caso-controle identificaram fatores de risco significativos que são substituições para associações dependentes do tamanho do inóculo, indicando que tais exposições podem ser medidas acuradamente. No estudo longitudinal, as medidas substitutas que foram utilizadas incluíram esgotos abertos através da identificação de distância do domicílio, largura, comprimento e profundidade; exposições associadas com inundações e chuvas fortes: frequência de inundações documentadas no ambiente peridomiciliar, profundidade da inundação e proximidade da residência, frequência de exposição à água de esgoto e de alagamento relatados pelos sujeitos e outras fontes de contaminação ambiental – área e distância dessas fontes em relação ao domicílio. As questões a respeito de ratos e outros reservatórios potenciais basearam-se no número de ratos identificados, durante as sessões de observação; número de ratos vistos pelos indivíduos durante o dia e à noite; número de tocas de ratos e distância das tocas para os domicílios; tamanho do lixo acumulado, terrenos baldios, vegetação e distância dessas condições ambientais das residências. No segundo inquérito em 2004 foram confirmados dados sócio-demográficos tais como idade, escolaridade, renda, também aqueles relacionados à história de doença prévia, já mencionados.

Uma amostra de, no máximo, dez mililitros de sangue foi coletada em tubo vacutainer etiquetado com o número do estudo e o do indivíduo no estudo e guardada em caixa térmica (temperatura ambiente) própria para armazenamento de material biológico. Este material era transportado, juntamente com uma pasta contendo os questionários epidemiológicos, para o CPqGM – FIOCRUZ em carro oficial deste Centro. Chegando a este destino, os questionários eram levados ao NEB (Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística) onde foram duplamente digitados, em banco criado no Epi Info Windows contendo check, por membros da equipe treinados para este fim. Posteriormente estes documentos eram arquivados em armários trancados, ficando as chaves acessíveis apenas à gerente e ao coordenador do projeto. Os dados de inspeção eram inseridos em um banco de dados através de sistema de informação geográfica (SIG ou GIS) criado em ArcView 3.2. As amostras de sangue coletadas em campo eram transportadas para o LPBM (Laboratório de Patologia e Biologia Molecular) e recebidos pelo biomédico responsável por conferir os números das amostras e os da lista de coleta. Em seguida, o mesmo indivíduo elaborava as alíquotas (vide protocolo) e estocava as mesmas em freezer a -20 C para posteriores avaliações sorológicas (vide protocolo de microaglutinação). Qualquer intercorrência no seguimento das etapas citadas era imediatamente comunicada à gerente do projeto para resolução dos problemas e continuidade do processo. Foi determinada a prevalência basal de infecção prévia para esta população estudada em uma comunidade de alto risco. No segundo inquérito, novamente os dados sorológicos foram obtidos dos mesmos indivíduos, exceto as perdas. A equipe de campo localizou ativamente os sujeitos que mudaram de residência, mas permaneceram na área do estudo. Os que não foram encontrados na área do estudo foram considerados perdas de seguimento, da mesma forma que o foram as recusas, não encontrados e falecimentos.

## 6.7 TESTE LABORATORIAL UTILIZADO PARA DIAGNÓSTICO

Os desfechos avaliados foram: Infecção (composta por nova infecção por *Leptospira* e reinfeção por *Leptospira*) e doença grave (vide definições). A técnica de microaglutinação (MAT) foi o teste sorológico realizado por ser considerado o método padrão para avaliação de infecção prévia por *Leptospira*<sup>5</sup>. A microscopia de campo escuro foi utilizada para avaliar a soroaglutinação de seis cepas de referência<sup>58</sup> e dois isolados clínicos representando cinco sorogrupos de *Leptospira*.

Os sorovares utilizados na bateria foram: copenhageni, canicola, seramanga, icterohaemorrhagiae, automnalis, ballum, grippotyphosa pertencentes aos respectivos sorogrupos: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Patoc (empiricamente, sabe-se que aglutina com soro de indivíduos que foram infectados com diversos sorovares), Icterohaemorrhagiae, Automnalis, Ballum, Grippotyphosa. O uso dessa bateria reduzida obteve 100% de concordância com a bateria de dezoito sorogrupos recomendada pelo WHO em nosso estudo preliminar. Diluições de soro de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 foram triadas para evitar falsos resultados por causa do efeito prozona. Sendo observada aglutinação em um título de 1:50, o soro foi titulado para determinar o maior título. Para a prevalência basal, a evidência de infecção prévia por *Leptospira* foi definida de acordo com critério já aceito, um título na MAT igual ou superior a cinquenta. O provável sorogrupo infectante foi definido como o sorogrupo de sorovar contra o qual o maior título da MAT foi direcionado.

## 6.8 DEFINIÇÕES

*Infecção*: pode ser sintomática ou assintomática. Dentro da infecção sintomática podemos ter as infecções sub-clínicas ou clínicas. As infecções clínicas podem ser discretas (sinais e/ou sintomas inespecíficos: febre de início súbito, mialgias, cefaléia, mal estar e/ou prostração) ou graves (exacerbação dos sinais e sintomas clínicos inespecíficos, icterícia, insuficiência renal aguda, manifestações hemorrágicas). As últimas manifestações exigem hospitalização, geralmente com cuidados de terapia intensiva. Avaliamos neste estudo infecções: assintomática, sintomática (sub-clínica ou clínica) e grave.

*Infecção assintomática (título positivo)*:

- não adquiriu leptospirose grave nem apresentou sintomatologia leve (não relatou durante o acompanhamento) durante o período no qual desenvolveu evidência sorológica para infecção;
- soroconversão entre amostras pareadas obtidas a partir de duas avaliações anuais sequenciais ou teve um aumento de quatro vezes o título inicial (no título aglutinante)..

*Infecção sub-clínica de leptospirose (oligossintomática):*

- presença de sintomatologia leve (vide discreta acima);
- soroconversão entre amostras pareadas obtidas a partir de duas avaliações anuais seqüenciais ou teve um aumento de quatro vezes o título inicial (no título aglutinante)..

*Nova infecção:* satisfazer a **ambos** os critérios abaixo:

- não existir evidência de reação de aglutinação das leptospiras a nenhum dos sorovares testados na avaliação da primeira amostra de soro (recrutamento da coorte);
- evidência de soroconversão entre a primeira (recrutamento da coorte) e a segunda amostra (seguimento da coorte) a, pelo menos, um ou mais sorovares. Sendo soroconversão definida como:

*Soroconversão:* Ausência da reação de aglutinação na primeira amostra e presença de aglutinação com um título igual ou superior a 1:50 no mesmo sorovar na segunda amostra de soro (seguimento da coorte).

*Reinfecção:* satisfazer a **ambos** os critérios abaixo:

- evidência de uma primeira infecção por *Leptospira* indicada por reação de aglutinação com título igual ou superior a 1:25 para, pelo menos, um sorovar na primeira amostra de soro;
- um acréscimo de quatro vezes o título inicial no mesmo sorovar ou outro sorovar entre a primeira e a segunda amostra.

*Reinfecção pelo mesmo sorogrupo:* satisfazer a **ambos** os critérios abaixo:

- evidência para reinfecção, como definida acima;
- entre as reações de aglutinação, demonstrativas de soroconversão ou aumento de quatro vezes o título inicial, o maior título de aglutinação na segunda amostra é devido ao mesmo sorogrupo da infecção prévia. Para a infecção prévia, o sorogrupo que presume-se ser o responsável pela infecção é definido como o sorogrupo do(s) sorovar(es) a que o maior título de aglutinação foi atribuído na primeira amostra.

*Reinfecção por um sorogrupo diferente:* satisfazer a **ambos** os critérios abaixo:

- evidência para reinfecção como foi anteriormente definida;

- entre as reações de aglutinação, demonstrativas de soroconversão ou aumento de quatro vezes o título inicial, o maior título de aglutinação na segunda amostra é devido a um sorogrupo diferente daquele ao qual presume-se ser atribuída a infecção prévia.

*Caso de leptospirose grave neste estudo:*

- indivíduo admitido no Hospital Couto Maia (hospital estadual de referência para doenças infecto-contagiosas), preenchendo os seguintes critérios: sinais e sintomas clínicos compatíveis, icterícia, insuficiência renal aguda (oligúria, creatinina maior ou igual a 1.5 mg/dl, uréia com valores acima de 75mg/dl), manifestações hemorrágicas, febre aguda;
- evidência sorológica de infecção caracterizada por teste ELISA-IgM reagente, um aumento de quatro vezes na titulação da MAT ou um título de 1.600 ou mais em uma amostra;
- Isolamento da *Leptospira* patogênica (em sangue, líquido, urina ou tecidos) e/ou detecção de DNA de *Leptospira* patogênica por PCR.

## 6.9 ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS

As informações contidas nos questionários e análises sorológicas foram duplamente digitadas em bancos de dados elaborados com Epi Info Windows, sendo posteriormente realizada a validação dos mesmos. Em seguida, os questionários foram arquivados em armários que permanecem trancados no Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB) do mesmo Centro de Pesquisas, os soros foram armazenados em uma soroteca conforme procedimentos para congelamento já citados anteriormente. As análises dos dados foram realizadas em Epi Info Windows com plataforma Microsoft Access, Pacote estatístico R com as bibliotecas MASS (modelos logísticos) e nlme (modelos logísticos efeitos aleatórios) para as análises de regressão de Cox com efeitos aleatórios no domicílio, ArcView 3.2 para análises espaciais e confecção de mapas, Epi Info 6.0, Microsoft Excel para confecção de tabelas e gráficos. Os indivíduos da coorte foram estratificados de acordo com os critérios da microaglutinação para infecção prévia por *Leptospira* (definições). A distribuição da prevalência e incidência de anticorpos anti- *Leptospira* foi determinada de acordo com idade e sexo.

Análises descritivas foram efetuadas, a fim de explorar variáveis sócio-demográficas, comparar os grupos de indivíduos elegíveis e participantes em relação a fatores demográficos através do cálculo das medidas de tendência central (média e mediana de idade, renda) e distribuição com histograma, plot, cálculo do coeficiente de normalidade desta distribuição, quartis; o mesmo foi feito para as demais variáveis contínuas (número de indivíduos por domicílio e de ratos vistos pelos moradores) com o objetivo de estratificar o mais equitativamente possível estas variáveis; para as variáveis categóricas a exemplo de raça, escolaridade, sexo foram realizadas frequências para confirmar codificação correta das mesmas; foram elaboradas frequências qui-quadrado para tendência (faixa etária, sexo) ou exato de Fisher, para amostras menores, tentando identificar a existência de viés de seleção. As mesmas análises foram realizadas para comparar participantes e perdas de seguimento.

#### Para o objetivo 1: Cálculo das Taxas de Infecção (infecção, nova infecção e reinfecção)

As taxas foram calculadas dividindo o número de indivíduos infectados por mil pessoas-anos de acompanhamento da população estudada. A duração do acompanhamento de cada indivíduo da coorte foi determinada a partir da data da primeira entrevista até a data da última. As taxas de infecção foram calculadas com base em densidade de incidência e não incidência cumulativa, pois a primeira se aplica melhor ao nosso estudo por conter diferentes períodos de acompanhamento para cada indivíduo da coorte.

1- Infecção:

$$\left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de infectados}}{\text{população X anos de seguimento}} \right) \times 1.000$$

2- Nova Infecção:

$$\left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de novos infectados}}{\text{população sem exp. prévia X anos de seguimento}} \right) \times 1.000$$

3- Reinfecção:

$$\left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de reinfectedados}}{\text{população com exp. prévia X anos de seguimento}} \right) \times 1.000$$

Os ajustes por idade e sexo foram realizados da seguinte maneira: primeiro foram calculadas as taxas de infecção para cada sexo e faixa etária (total de sete faixas) da amostra; em seguida foi calculada a percentagem de cada sexo e faixa etária na população (12.468 indivíduos) e, por último, cada taxa de infecção calculada para a amostra foi multiplicada pela percentagem de composição da população (fator de ponderação - tabela 12) levando às taxas de infecção ajustadas por idade e sexo.

Para o objetivo 2: Cálculo da Razão Doença Grave:Infecção

Para o cálculo da razão doença grave:infecção, primeiro traçamos medianas: uma das datas de coleta dos dados basais, outra das datas de coleta dos dados no primeiro ano de acompanhamento, no período entre estas medianas identificamos o número de casos graves na coorte, na área do estudo e na ZI Pau da Lima. A partir destes números calculamos a incidência de casos graves por 100.000 pessoas para cada grupo sob risco citado anteriormente. A taxa de infecção foi calculada para a coorte e generalizada para a coorte e ZI Pau da Lima. Para calcularmos a razão, dividimos a incidência de casos graves (100.000 pop) pela taxa de infecção X 1.000 convertida para 100.000 pessoas-anos de seguimento.

### Para o objetivo 3: Identificação dos Fatores de Risco para Infecção

Nas análises univariadas, a variável dependente foi o desfecho laboratorial infecção (nova infecção e reinfecção) e as variáveis independentes investigadas estão listadas a seguir: 1- sóciodemográficas: idade, sexo, raça, tempo de moradia no local, número de indivíduos residentes em cada domicílio, escolaridade, renda familiar; 2- história de doença prévia: presença de hipertermia no último ano, história individual de leptospirose ou de alguém no domicílio, episódio de dengue; 3- ocupação: se trabalha, trabalho formal ou não, qual a atividade que realiza (opções de atividades já identificadas como de risco para aquisição de leptospirose: pedreiro ou ajudante, manejo de esgoto, vendedor ambulante, gari, mecânico, outra profissão), trabalho em Pau da Lima; 4- exposições ambientais de risco potencial: contato peridomiciliar, na rua ou no local de trabalho com: lama, lixo, água de alagamento ou de esgoto; alagamento da rua ou do domicílio, desentupir o esgoto da rua; 5- reservatórios: criar gato, cachorro ou galinha, ver ratos no peridomicílio, rua ou local de trabalho, número de ratos vistos de uma só vez (estratificado em menos de cinco e de cinco ratos acima), turno em que os ratos foram vistos.

Foi calculado o RR (razão de densidade de incidência, ou seja, número de indivíduos infectados por pessoas-anos de seguimento da coorte para os infectados e o mesmo para os não infectados). Além disto, foram realizadas análises com IC 95% para dados de incidência obtidos nas avaliações, considerando-se um valor de p menor que 0,05 para significância estatística. Além disto, realizamos uma estimação não paramétrica da frequência de sobrevida, denominada Kaplan-Meier que utiliza conceitos de independência de eventos de probabilidade condicional para desdobrar a condição sobreviver (que em nosso estudo entendemos por ausência de infecção) até o tempo t em uma seqüência de elementos independentes que caracterizam a sobrevivência em cada intervalo de tempo anterior a t e cuja probabilidade é condicional aos que estão em risco em cada período. A probabilidade de sobrevida até a data especificada é estimada considerando-se que a sobrevivência até cada tempo é independente da sobrevivência até outros tempos e, conseqüentemente, a probabilidade de se chegar até o tempo t é o produto da probabilidade de se chegar até cada um dos tempos anteriores. O método Kaplan-Meier gera uma função escada que salta em cada tempo onde ocorreu um evento, o nº de eventos observados neste tempo e o número de observações censuradas (perdas de seguimento: recusas, não encontrados, mudanças,

falecimentos, mentalmente incapazes) ocorridas antes dela, determinam o tamanho do salto. A função é uma escada porque o risco se mantém constante até a ocorrência do próximo evento. A estratégia que este método utiliza para comparar curvas de sobrevivência de diferentes grupos é a estratificação. A curva de sobrevivência é estimada separadamente para cada estrato.

Para comparar as curvas de sobrevida utilizamos o teste logrank que compara os valores observados e esperados de cada estrato sob a hipótese de que o risco é o mesmo em todos os estratos. Testar se as curvas são iguais equivale a testar se a incidência de eventos é semelhante em cada estrato. Teste de logrank é um teste de hipótese que compara a distribuição de ocorrência de eventos observados em cada estrato com a distribuição que seria esperada se a incidência fosse igual em todos os estratos. Quando as distribuições não são equivalentes diz-se que a covariável tem efeito na sobrevida. Quando apenas dois estratos estão sendo comparados, a estatística logrank é calculada utilizando-se apenas um dos estratos. A estimação Kaplan-Meier é uma forma simples de gerar uma curva de sobrevida levando em consideração o tempo de participação dos indivíduos no estudo. Ela computa o número de indivíduos que saíram (foram perdidos) em determinado ponto, dividido pelo número de indivíduos que permaneceram no estudo. Estas probabilidades são multiplicadas pelas probabilidades anteriores, por isto também é denominado estimação produto-limite.

As probabilidades para sobreviver envolvem a estimação do tempo para ocorrer o evento. Para as perdas de seguimento temos informações parciais, mas não devemos ignorá-las pois elas fornecem informações sobre sobrevivência, devem apenas receber tratamento diferente. Estávamos interessados no tempo até os indivíduos apresentarem o evento específico infecção. Os participantes do estudo foram seguidos a partir de um ponto de partida e foram acompanhados ao longo do tempo para identificação do evento infecção. Se cada indivíduo fosse acompanhado até apresentar infecção a curva poderia ser estimada apenas calculando a fração de sobrevida a cada momento. Porém, devido às perdas de seguimento, era necessária uma análise que nos permita estimar a sobrevida (tempo sem infecção) ao longo do tempo, mesmo quando ocorreram as perdas em diferentes momentos. A probabilidade de sobreviver a cada momento foi estimada a partir da probabilidade cumulativa de sobreviver a cada um dos intervalos precedentes (calculada como produto dos intervalos anteriores).

Nas análises multivariadas, análises estratificadas e o modelo de regressão foram utilizados para tentar controlar variáveis de confusão e investigar interações entre as variáveis, ou seja, para que pudéssemos avaliar se realmente existe associação entre a variável independente e a dependente de maneira que fosse possível prever (predizer) o desfecho a partir da variável considerada como fator de risco. Dentro da regressão foi utilizada a regressão múltipla, pois possuíamos diversas variáveis independentes a serem consideradas ao mesmo tempo. No contexto da análise de regressão múltipla, foi escolhido o modelo de regressão de Cox que é similar ao modelo de análises de regressão múltipla porém nos permite avaliar mais de uma variável juntas no mesmo espaço de tempo. Portanto, foram realizadas análises de sobrevida (o tempo entre a entrada do indivíduo no estudo e a ocorrência do evento, neste caso, infecção) para avaliar a associação entre covariáveis e infecção com o ajuste do modelo de riscos proporcionais de Cox para avaliar o efeito de algumas covariáveis no tempo até infecção. As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico R.

No gráfico Kaplan-Meier as probabilidades de sobrevida são constantes entre os eventos e só decrescem a cada evento. Mas este teste não pode explorar (ajustar para) o efeito de diversas variáveis que podem estar influenciando a sobrevida, o que pode fornecer mais precisão à estimativa. O modelo de Cox, por sua vez, é uma técnica estatística semiparamétrico pois não assume qualquer distribuição estatística para a função de risco basal, assume apenas que as covariáveis agem multiplicativamente sobre o risco. É utilizado para explorar a relação entre a sobrevivência de um indivíduo e variáveis explicativas. Ele nos possibilita calcular o Hazard (risco) de infecção dadas as suas variáveis de prognóstico. O Hazard é a probabilidade que um indivíduo tem de experimentar um evento dentro de um pequeno intervalo de tempo considerando que o indivíduo sobreviveu além do início do intervalo, ou seja, o risco de ocorrência do evento (infecção) num tempo  $t$ . Um coeficiente de regressão progressivo para uma variável, significa risco maior e prognóstico pior para valores maiores. A partir de uma gama de tempos de sobrevida (incluindo os censurados) em uma amostra de indivíduos, conseguimos estimar a proporção destes indivíduos que iria sobreviver a um período de tempo sob as mesmas circunstâncias. Elimina-se a função de risco basal, considerando apenas a cada tempo  $t$ , a informação dos indivíduos sob risco.

O modelo de regressão de Cox utilizado foi o de STEPAIC. AIC é denominado Critério de Informação de Akaike. O objetivo desta estatística é verificar o poder de explicação do modelo estatístico, ou seja, verificar qual é o modelo mais parcimonioso (que melhor explica a distribuição da variável resposta. STEPAIC é uma rotina utilizada no R para combinar o modelo com todas as variáveis explicativas mais relevantes, com maior poder de explicação para o modelo. Os mesmos critérios de significância estatística utilizados para as análises univariadas foram considerados para as multivariadas e foram comparados RR (Hazard) com IC 95% e valor de p para entendermos o risco atribuível a cada fator identificado como de risco nas análises univariadas.

O modelo de Cox com o termo efeitos aleatórios no domicílio (modelo multinível) foi realizado pois a seleção da amostra por domicílio levava a uma dependência intra-domiciliar que precisava ser considerada nas análises pois poderia estar interferindo de forma a sub ou superestimarmos a relação entre os fatores de risco potencial e o desfecho infecção. Desta forma, a variabilidade que em nossa amostra conglomerada está subestimada poderia ser corrigida como se uma regressão de Cox fosse feita em cada domicílio. Porém, ele manteve as mesmas variáveis explicativas que o modelo de sobrevida simples (Cox), por isto, foi mantido o resultado do Cox simples.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS**

No ano de 2003, realizamos um censo na área do estudo em Pau da Lima, e identificamos 14.869 indivíduos residentes em 5.110, destes, 12.468 (85%) tinham idade igual ou superior a cinco anos e eram, portanto, elegíveis. Dos indivíduos elegíveis, 9.862 (78%) pessoas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, concordando em participar dos cinco anos de seguimento. Para o acompanhamento foi selecionada uma coorte de dois mil e três indivíduos, esta seleção foi feita por domicílios perfazendo um total de seiscentos e oitenta e quatro. Desta

coorte, mil quinhentos e oitenta e cinco indivíduos consentiram a participação no primeiro ano de acompanhamento (figura 15). Destes participantes do primeiro ano de seguimento, 42% eram homens e 59% dos indivíduos estavam na faixa etária de 15 a 44 anos.

Dos indivíduos 2.419 elegíveis para o recrutamento da coorte, 2.003 consentiram participação e 416 não consentiram. Dos indivíduos que consentiram participar durante o estabelecimento da coorte em 2003 (83%), 1.585 (79%) permitiram participação no seguimento em 2004 e, das 418 perdas de seguimento, 250 (12,5%) foram perdas por mudança de domicílio para fora da área do estudo (figura 15).

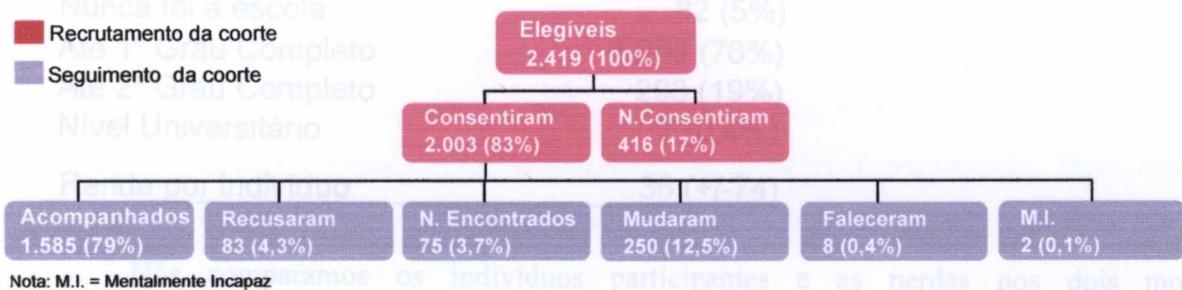


Figura 15 Fluxograma dos indivíduos desde o censo até o final do primeiro ano de seguimento da coorte. Salvador, Bahia, 2006.

A população que participou do estudo foi composta, portanto, por 1.585 indivíduos, 58% mulheres, 42% homens residentes no bairro de Pau da Lima, Salvador. A média de idade foi de 27 (+/-16) anos, 42% da população está dentro da faixa de 5-20 anos. 1.040 indivíduos tinham etnia parda de acordo com a observação do entrevistador e 1.203 (76%) possuíam até primeiro grau completo (tabela 6).

Dados demográficos	Estabelecimento da Coorte			Seguimento da Coorte		
	Consentiram n=2.003 n°/média (%/DP)	N. Consentiram n=416 n°/média (%/DP)	Valor de P	Acompanhados n=1.585 n°/média (%/DP)	Perdas n=418 n°/média (%/DP)	Valor de P
Sexo masculino	877 (44%)	234 (56%)	< 0,001	685 (42%)	208 (50%)	0,010
Média idade	27 (+/- 16)	26 (+/- 14)	0,300	27 (+/- 16)	26 (+/- 14)	1,000

Nota: N° = número de indivíduos, DP = desvio padrão, % = porcentagem

Tabela 6 Características da coorte que completou o seguimento. Salvador, Bahia, 2006.

Variáveis	Participantes n=1.585 nº/média (%/DP)
Média Idade	27 (+/- 16)
Sexo Masculino	669 (42%)
<b>Etnia Observada</b>	
Branco	89 (5%)
Pardo	1.040 (66%)
Negro	456 (29%)
<b>Escolaridade</b>	
Nunca foi à escola	82 (5%)
Até 1º Grau Completo	1.203 (76%)
Até 2º Grau Completo	293 (19%)
Nível Universitário	7 (0,4%)
Renda por indivíduo	36 (+/-74)

Nós comparamos os indivíduos participantes e as perdas nos dois momentos: estabelecimento ou recrutamento da coorte e seguimento da mesma, objetivando avaliar a presença de viés de seleção e perdas de seguimento, respectivamente. Observamos, durante o recrutamento uma percentagem menor de homens (44%) nos participantes em relação às perdas (61%), esta diferença foi estatisticamente significativa (tabela 7). No seguimento da coorte, por sua vez, percebemos que a percentagem de homens nos participantes decresceu quando comparada ao recrutamento (42%) e em relação às perdas de seguimento (50%), esta diferença também foi estatisticamente significativa (tabela 7).

Tabela 7 Comparação entre participantes e perdas no estabelecimento (recrutamento) e seguimento da coorte. Salvador, Bahia, 2006.

Dados demográficos	Estabelecimento da Coorte			Seguimento da Coorte		
	Consentiram =2.003 nº/média (%/DP)	N. Consentiram n= 416 nº/média (%/DP)	Valor de P	Acompanhados n=1.585 nº/média (%/DP)	Perdas n= 418 nº/média (%/DP)	Valor de P
Sexo Masculino	877 (44%)	254 (61%)	< 0,001	669 (42%)	208 (50%)	0,010
Média Idade	27 ( +/- 15)	26 ( +/- 14)	0,300	27 ( +/- 16)	26 ( +/- 14)	1,000

Nota: Nº = número de indivíduos, DP = desvio padrão, % = percentagem.

O maior número de mulheres se deve em parte à ausência dos homens no domicílio durante o dia por motivos ocupacionais, para reduzir esta diferença já esperada, realizamos visitas domiciliares aos sábados, domingos, feriados, à noite em alguns dias da semana, porém ainda houve uma diferença importante. Este viés de seleção tomou necessários ajustes por sexo durante as análises para cálculo das taxas de infecção. Estas análises também foram ajustadas para idade por este se constituir um fator de risco para infecção já conhecido, para possibilitar as análises ajustadas, estratificamos idade em sete faixas etárias com número de anos divididos da forma mais eqüitativa possível: 5 - 14; 15 - 24; 25-34; 35-44; 45-54; 55-64; acima de 64 anos de idade. Para as análises univariadas e multivariadas estratificamos a variável idade em seis partes pois as últimas faixas etárias eram compostas por poucos indivíduos.

Após plotarmos um histograma do tempo decorrido entre o recrutamento da coorte e o seguimento (figura 16), observamos uma distribuição não normal para esta variável com um mínimo de 140 dias, máximo de 657 e uma média de 311 dias de seguimento. Desta forma, como este tempo varia bastante, realizamos nossos cálculos de taxas de infecção e fatores de risco baseados na densidade de incidência, levando em conta, portanto, o tempo de contribuição de cada indivíduo para o estudo.

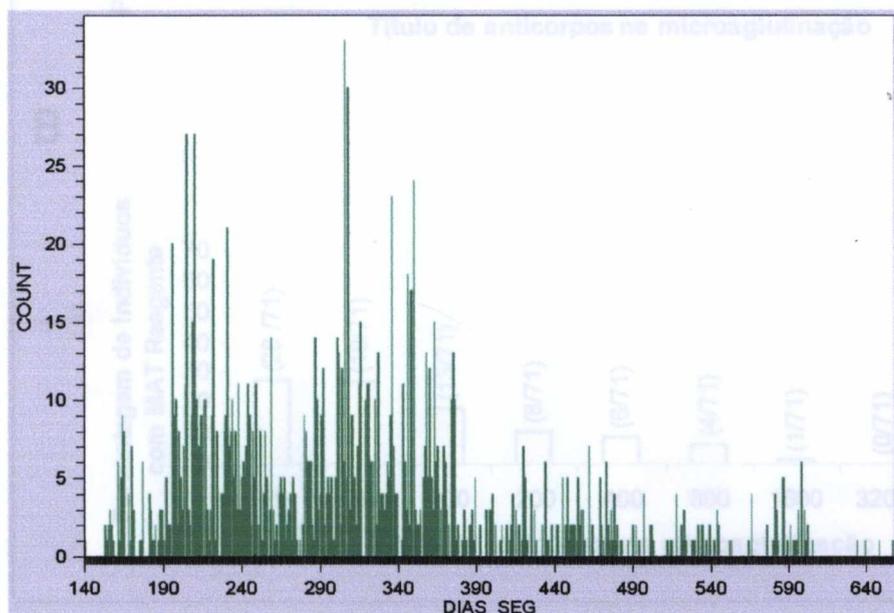


Figura 16 Histograma do tempo decorrido entre o recrutamento e o seguimento da coorte. Salvador, Bahia, 2006.

## 7.2 PREVALÊNCIA DO TÍTULO DE ANTICORPOS AGLUTINANTES E DISTRIBUIÇÃO DOS SOROGRUPOS PREVALENTES

Em relação à distribuição dos títulos de anticorpos na microaglutinação na avaliação sorológica, tanto nos indivíduos participantes do estudo quanto para as perdas de seguimento observamos um padrão com predomínio do título vinte e cinco seguido por um decréscimo do número de indivíduos com relação inversa ao aumento dos títulos (figura 17). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ao compararmos os estratos para participantes em relação às perdas de seguimento.

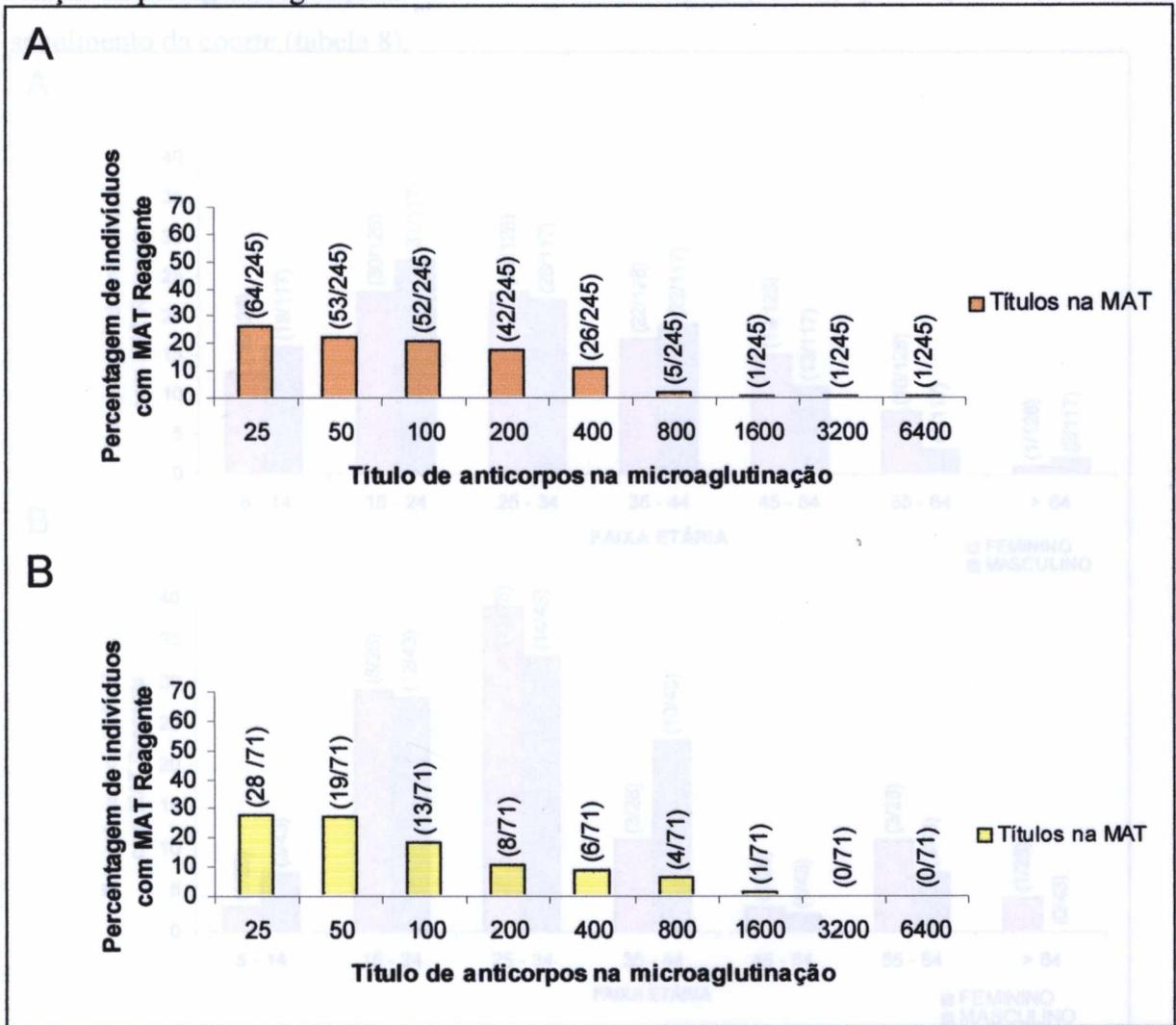


Figura 17 Prevalência dos máximos títulos de anticorpos aglutinantes na microaglutinação em 2003 para A- indivíduos participantes do primeiro acompanhamento (n=1.585) e B- perdas de seguimento (n=418). Salvador, Bahia, 2006.

Ao analisarmos a prevalência dos títulos de anticorpos aglutinantes, por faixa etária e sexo, observamos uma distribuição semelhante para os indivíduos que participaram do primeiro ano de seguimento e as perdas. Identificamos uma maior percentagem de homens com título igual ou superior a vinte e cinco nas faixas etárias de 15-24 e 35-44 e de mulheres com título igual ou superior a vinte e cinco nas faixas etárias de 25-34, 45-54 e 55-64. As diferenças aparentemente são encontradas nas faixas etárias de 15-24 e superior a 64 (figura 18) mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ao compararmos os estratos de faixa etária e sexo para participantes em relação às perdas de seguimento. O sorogrupo com maior prevalência foi o Icterohemorragiae, tanto para os dados de recrutamento (basais) quanto para o primeiro ano de seguimento da coorte (tabela 8).

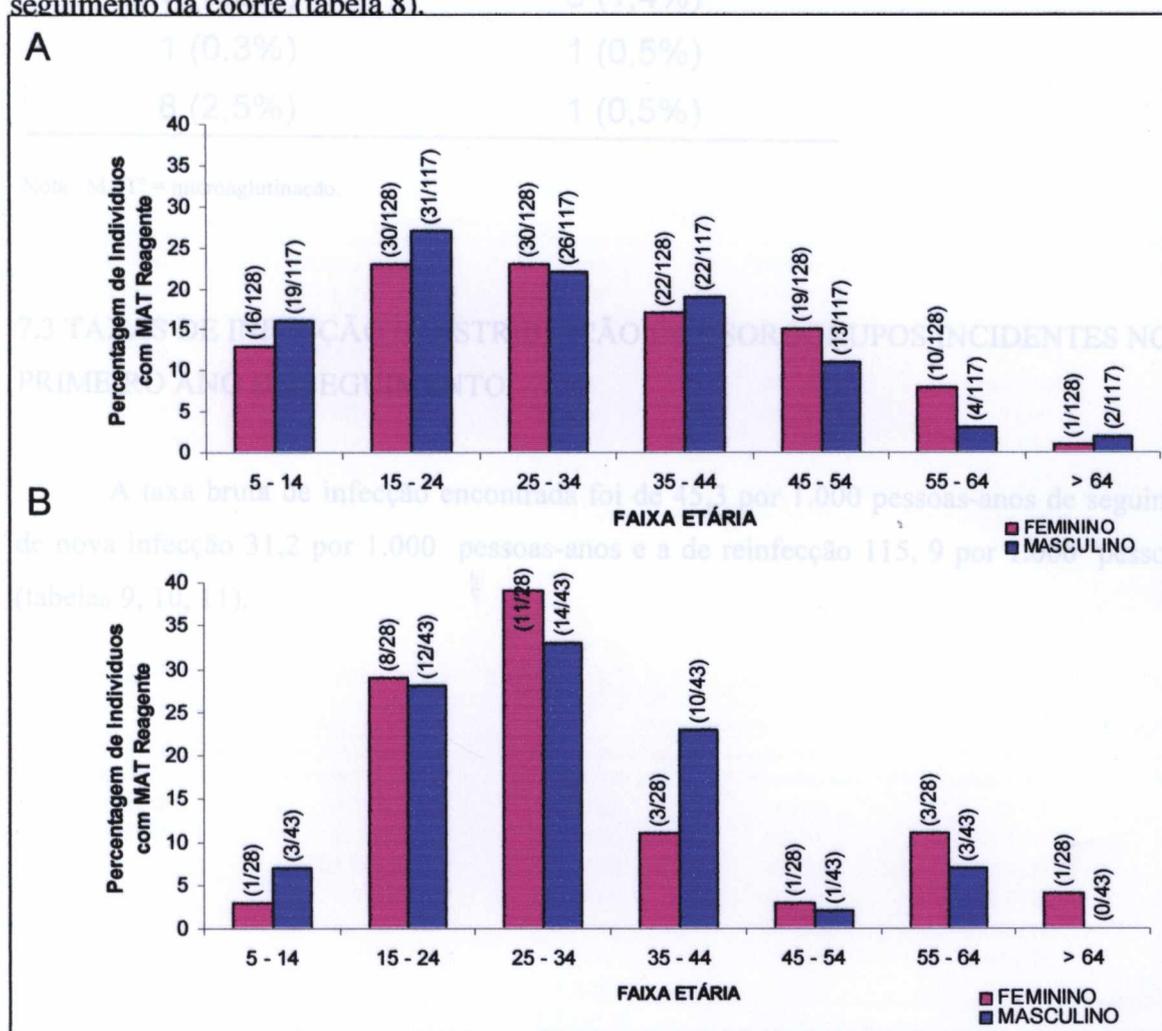


Figura 18 Prevalência dos máximos títulos de anticorpos aglutinantes na microaglutinação em 2003 por faixa etárias e sexo para A- indivíduos participantes do primeiro acompanhamento (n=1.585) e B- perdas de seguimento (n=418). Salvador, Bahia, 2006.

Tabela 8 Distribuição dos sorogrupos identificados na microaglutinação para prevalência nos dados basais e no primeiro ano de seguimento. Salvador, Bahia, 2006.

MAT Dados Basais (n= 315 com MAT>24)	MAT Seguimento (n= 216 com MAT>24)
282 (89,5%)	207 (95,8%)
10 (3,2%)	0 (0,0%)
14 (4,5%)	4 (1,8%)
0 (0,0%)	3 (1,4%)
1 (0,3%)	1 (0,5%)
8 (2,5%)	1 (0,5%)

Nota: MAT° = microaglutinação.

### 7.3 TAXAS DE INFECÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS SOROGRUPOS INCIDENTES NO PRIMEIRO ANO DE SEGUIMENTO

A taxa bruta de infecção encontrada foi de 45,3 por 1.000 pessoas-anos de seguimento, a de nova infecção 31,2 por 1.000 pessoas-anos e a de reinfecção 115,9 por 1.000 pessoas-anos (tabelas 9, 10, 11).

Tabela 9 Taxa bruta de infecção, estratificada por faixas etárias e sexo. Salvador, Bahia, 2006.

Faixa Etária	Taxa de infecção (n=1.585)					
	População total		Sexo Masculino		Sexo Feminino	
	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)
5 - 14	344,4 (412)	31,9 (11)	173,8 (201)	40,3 (7)	170,6 (211)	23,5 (4)
15 - 24	346,8 (404)	57,7 (20)	146,7 (177)	88,6 (13)	200,1 (227)	35,0 (7)
25 - 34	252,6 (289)	75,2 (19)	98,6 (114)	101,4 (10)	154,0 (175)	58,4 (9)
35 - 44	197,8 (237)	35,4 (7)	71,2 (85)	56,2 (4)	126,6 (152)	23,7 (3)
45 - 54	131,1 (156)	22,9 (3)	48,0 (58)	41,7 (2)	83,1 (98)	12,0 (1)
55 - 64	45,0 (53)	22,2 (1)	17,5 (21)	0,0 (0)	27,4 (32)	36,5 (1)
> 64	29,8 (34)	0,0 (0)	11,7 (13)	0,0 (0)	18,1 (21)	0,0 (0)
Total	1.348 (1.585)	45,3 (61)	567,6 (669)	63,4 (36)	780 (916)	32,1 (25)

Nota: N° = número

Tabela 10 Taxa bruta de nova infecção, estratificada por faixas etárias e sexo. Salvador, Bahia, 2006

Faixa Etária	Taxa de nova infecção (n=1.339)					
	População total		Sexo Masculino		Sexo Feminino	
	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)
5 - 14	309,5 (376)	32,3 (10)	153,7 (181)	45,5 (7)	155,8 (195)	19,3 (3)
15 - 24	287,6 (343)	41,7 (12)	116,6 (146)	77,2 (9)	171,0 (197)	17,5 (3)
25 - 34	203,0 (233)	39,4 (8)	75,2 (88)	53,2 (4)	127,8 (145)	31,3 (4)
35 - 44	159,8 (193)	25,0 (4)	51,2 (63)	39,1 (2)	108,6 (130)	18,4 (2)
45 - 54	103,5 (124)	9,7 (1)	38,2 (45)	0,0 (0)	65,4 (79)	15,3 (1)
55 - 64	31,9 (39)	0,0 (0)	14,1 (17)	0,0 (0)	17,8 (22)	0,0 (0)
> 64	27,8 (31)	0,0 (0)	10,7 (11)	0,0 (0)	17,1 (20)	0,0 (0)
Total	1.123 (1.339)	31,2 (35)	459,8 (551)	47,9 (22)	663,4 (788)	19,6 (13)

Nota: N° = número

Tabela 11 Taxa bruta de reinfeção, estratificada por faixas etárias e sexo. Salvador, Bahia, 2006.

Faixa Etária	Taxa de reinfeção (n=246)					
	População total		Sexo Masculino		Sexo Feminino	
	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	1.000 Pessoas-anos de Seguimento (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)
5 - 14	34,9 (36)	28,7 (1)	20,1 (20)	0,0 (0)	14,8 (16)	67,6 (1)
15 - 24	59,2 (61)	135,1 (8)	30,1 (31)	132,9 (4)	29,1 (30)	137,5 (4)
25 - 34	49,7 (56)	221,3 (11)	23,4 (26)	256,4 (6)	26,3 (30)	190,1 (5)
35 - 44	38,0 (44)	79,0 (3)	20,0 (22)	100,0 (2)	18,1 (22)	55,3 (1)
45 - 54	26,6 (32)	75,2 (2)	9,9 (13)	202,0 (2)	17,7 (19)	0,0 (0)
55 - 64	13,1 (14)	76,3 (1)	3,4 (4)	0,0 (0)	9,6 (10)	104,2 (1)
> 64	2,0 (3)	0,0 (0)	1,0 (2)	0,0 (0)	1,0 (1)	0,0 (0)
Total	224,4 (246)	115,9 (26)	107,8 (118)	129,9 (14)	116,6 (128)	102,9 (12)

Nota: N° = número

Tabela 12 Fatores de ponderação para análises ajustadas. Salvador, Bahia, 2006.  
ELEGIVEIS (12.648)

Faixa Etária	Sexo Feminino	Fator de ponderação	Sexo Masculino	Fator de ponderação	População Total	Fator de ponderação	Fator de ponderação
	População (n=6.559)	Intra para sexo feminino	População (n=6.089)	Intra para sexo masculino	População Total (n=12.648)	Extra para sexo feminino	Extra para sexo masculino
5 - 14	1.582	0,241195304	1.556	0,255542782	3.138	0,504142766	0,495857234
15 - 24	1.755	0,267571276	1.667	0,273772376	3.422	0,512857978	0,487142022
25 - 34	1.351	0,205976521	1.236	0,202988997	2.587	0,522226517	0,477773483
35 - 44	942	0,143619454	852	0,139924454	1.794	0,525083612	0,474916388
45 - 54	592	0,090257661	507	0,083264904	1.099	0,53867152	0,46132848
55-64	206	0,031407227	197	0,032353424	403	0,511166253	0,488833747
>64	131	0,019972557	74	0,012153063	205	0,63902439	0,36097561
Total	6.559		6.089		12.648	0,518580013	0,481419987

Após os ajustes por idade e sexo (tabela 13, 14, 15), pudemos então identificar modificações apenas nas taxas finais (infecção, nova infecção e reinfecção) para os sexos feminino, masculino e nas taxas finais para a população total. Comparando-se as taxas entre as faixas etárias e entre os dois gêneros, identificamos taxa de infecção mais que duas vezes maior para indivíduos do sexo masculino na faixa etária de 15-24 em relação aos indivíduos do sexo feminino na mesma faixa etária. Esta diferença foi estatisticamente significativa (tabela 13). Observamos também uma taxa de nova infecção quatro vezes maior para homens na faixa etária de 15-24 em relação às mulheres na mesma faixa etária. Esta diferença também foi estatisticamente significativa (tabela 14). Na figura 19 podemos ver a distribuição das taxas de infecção, nova infecção e reinfecção por faixa etária e sexo. O sorogrupo com maior incidência foi o Icterohemorrhagiae, tanto para infecção total quanto para nova infecção e reinfecção, nesta última tanto para mesmo sorogrupo quanto para outro sorogrupo (tabela 16). É importante ressaltar que dos vinte e seis indivíduos reinfectedados, vinte e três o foram com o mesmo sorogrupo (tabela 16).

Tabela 13 Taxa de infecção, estratificada por faixas etárias, sexo e ajustada para estas mesmas variáveis. Salvador, Bahia, 2006.

Faixa Etária	Taxa de infecção (n=1.585)			Valor de p
	População total	Sexo Masculino	Sexo Feminino	
	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	
5 - 14	31,8 (11)	40,3 (7)	23,5 (4)	0,37
15 - 24	61,1 (20)	88,6 (13)	35,0 (7)	0,04
25 - 34	79,0 (19)	101,4 (10)	58,4 (9)	0,21
35 - 44	39,1 (7)	56,2 (4)	23,7 (3)	0,43
45 - 54	25,7 (3)	41,7 (2)	12,0 (1)	0,63
55 - 64	18,7 (1)	0,0 (0)	36,5 (1)	---
> 64	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	---
Total	49,0 (61)	66,5 (36)	32,7 (25)	

\* Entre homens e mulheres

Nota: N° = número

Tabela 14 Taxa de nova infecção, estratificada por faixas etárias, sexo e ajustada para estas mesmas variáveis. Salvador, Bahia, 2006.

Faixa Etária	Taxa de nova infecção (n=1.339)			Valor de p
	População total	Sexo Masculino	Sexo Feminino	
	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (n°)	
5 - 14	32,3 (10)	45,5 (7)	19,3 (3)	0,33
15 - 24	46,6 (12)	77,2 (9)	17,5 (3)	0,03
25 - 34	41,8 (8)	53,2 (4)	31,3 (4)	0,68
35 - 44	28,2 (4)	39,1 (2)	18,4 (2)	0,81
45 - 54	8,2 (1)	0,0 (0)	15,3 (1)	---
55 - 64	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	---
> 64	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	---
Total	33,9 (35)	49,0 (22)	19,8 (13)	

\* Entre homens e mulheres

Nota: N° = número

Tabela 15 Taxa de reinfecção, estratificada por faixas etárias, sexo e ajustada para estas mesmas variáveis. Salvador, Bahia, 2006.

Faixa Etária	Taxa de reinfecção (n=246)			Valor de p*
	População total	Sexo Masculino	Sexo Feminino	
	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (nº)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (nº)	Taxa de infecção por 1.000 Pessoas-anos (nº)	
5 - 14	34,1 (1)	0,0 (0)	67,6 (1)	---
15 - 24	135,2 (8)	132,9 (4)	137,5 (4)	0,74
25 - 34	221,8 (11)	256,4 (6)	190,1 (5)	0,57
35 - 44	76,5 (3)	100,0 (2)	55,3 (1)	0,92
45 - 54	93,2 (2)	202,0 (2)	0,0 (0)	---
55 - 64	53,3 (1)	0,0 (0)	104,2 (1)	---
> 64	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	---
Total	111,1 (26)	119,2 (14)	103,4 (12)	

\* Entre homens e mulheres

Nota: N° = número

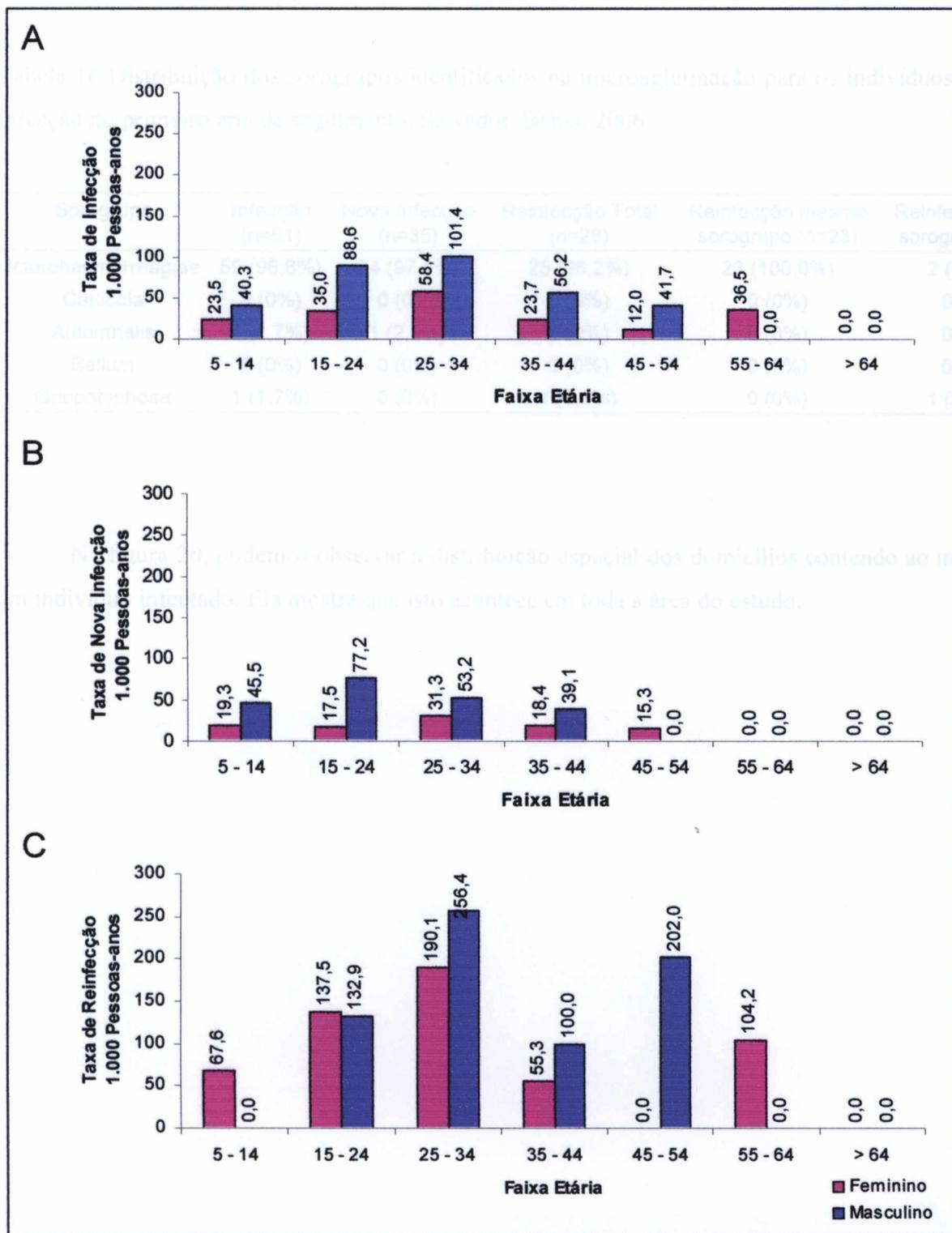


Figura 19 Taxas de A- infecção, B- nova infecção, C- reinfecção, estratificadas por faixa etária, sexo e ajustadas para estas mesmas variáveis. (n=1.585). Salvador, Bahia, 2006.

Tabela 16 Distribuição dos sorogrupos identificados na microaglutinação para os indivíduos com infecção no primeiro ano de seguimento. Salvador, Bahia, 2006.

Sorogrupo	Infecção (n=61)	Nova Infecção (n=35)	Reinfecção Total (n=26)	Reinfecção mesmo sorogrupo (n=23)	Reinfecção outro sorogrupo (n=3)
Icterohaemorrhagiae	59 (96,6%)	34 (97,1%)	25 (96,2%)	23 (100,0%)	2 (66,7%)
Canicola	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Automnalis	1 (1,7%)	1 (2,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ballum	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Grippotyphosa	1 (1,7%)	0 (0%)	1 (3,8%)	0 (0%)	1 (33,3%)

Na figura 20, podemos observar a distribuição espacial dos domicílios contendo ao menos um indivíduo infectado. Ela mostra que isto acontece em toda a área do estudo.

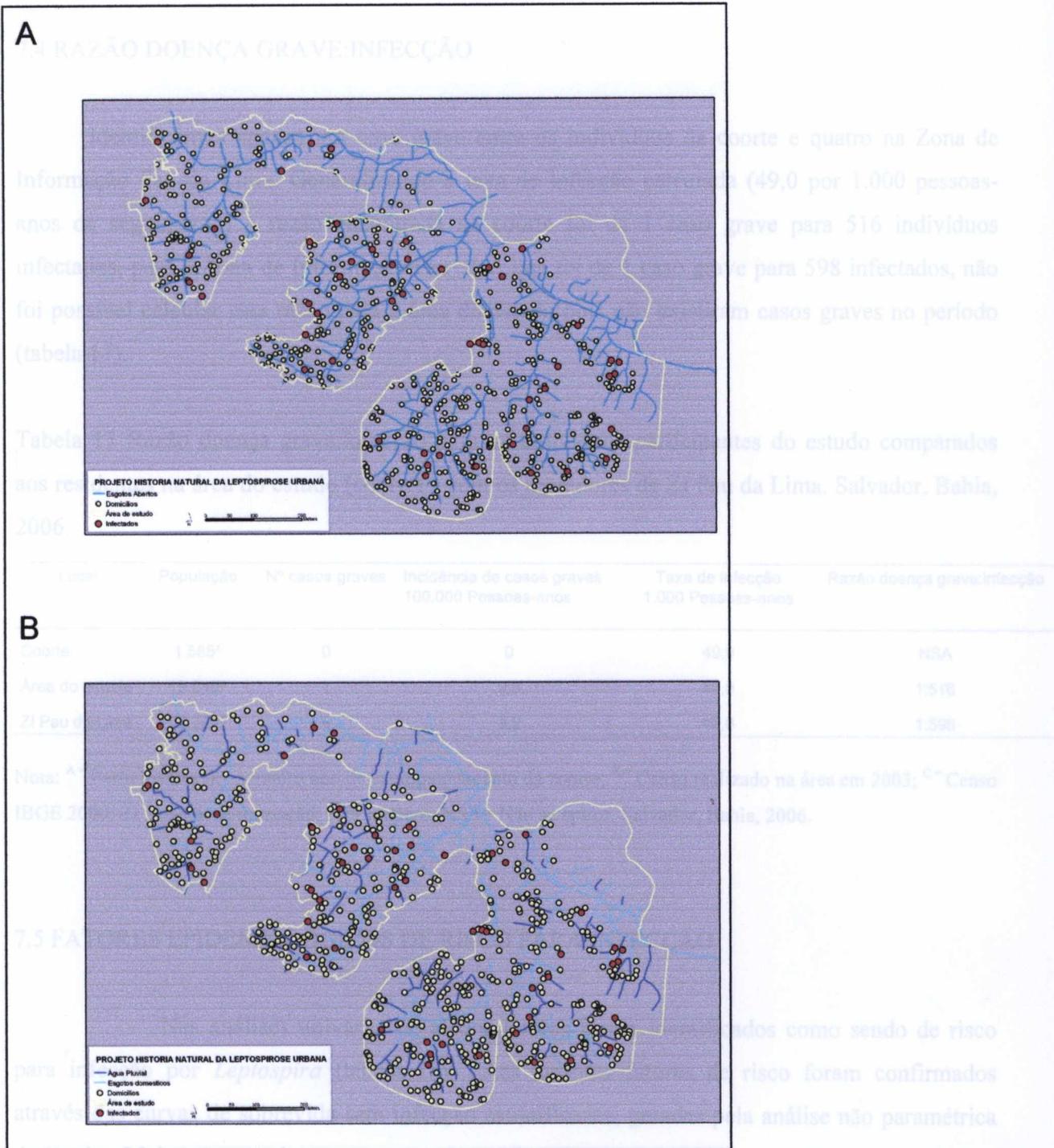


Figura 20 Localização dos domicílios georreferenciados na área de estudo contendo, pelo menos, um indivíduo infectado. A- Distribuição dos canais abertos e B- Distinção entre canais de água pluvial e água servida (esgoto doméstico). Salvador, Bahia, 2006.

## 7.4 RAZÃO DOENÇA GRAVE:INFECÇÃO

Identificamos apenas um caso grave entre os indivíduos da coorte e quatro na Zona de Informação Pau da Lima. Generalizando a taxa de infecção calculada (49,0 por 1.000 pessoas-anos de seguimento) a razão encontrada na coorte foi de 1 caso grave para 516 indivíduos infectados, para a Zona de Informação Pau da Lima foi de 1 caso grave para 598 infectados, não foi possível calcular esta razão para a área do estudo pois não existiram casos graves no período (tabela 17).

Tabela 17 Razão doença grave:infecção para os indivíduos participantes do estudo comparados aos residentes na área do estudo (coorte) e com os moradores da ZI Pau da Lima. Salvador, Bahia, 2006.

Local	População	Nº casos graves	Incidência de casos graves 100.000 Pessoas-anos	Taxa de infecção 1.000 Pessoas-anos	Razão doença grave:infecção
Coorte	1.585 <sup>A</sup>	0	0	49,0	NSA
Área do estudo	12.648 <sup>B</sup>	1	9,5	49,0	1:516
ZI Pau da Lima	58.353 <sup>C</sup>	4	8,2	49,0	1:598

Nota: <sup>A</sup>= Participantes do primeiro ano de acompanhamento da coorte; <sup>B</sup>= Censo realizado na área em 2003; <sup>C</sup>= Censo IBGE 2000; ZI Zona de Informação; N°= número, NSA= Não se aplica. Salvador, Bahia, 2006.

## 7.5 FATORES EPIDEMIOLÓGICOS DE RISCO PARA INFECÇÃO

Nas análises univariadas, alguns fatores foram identificados como sendo de risco para infecção por *Leptospira* (tabela 18). Estes mesmos fatores de risco foram confirmados através das curvas de sobrevida sem infecção estratificadas, geradas pela análise não paramétrica de Kaplan-Meier com as observações testadas utilizando-se o teste de logrank (figuras 21, 22, 23). No caso das variáveis alagamento da rua e faixa etária, houve uma tendência à significância e a variável residir em área sujeita a alagamento não foi significativa nas análises de Kaplan-Meier. Nas análises multivariadas, utilizamos a regressão de Cox sem/com modelo de efeitos aleatórios no domicílio como uma forma de ajuste dos dados para a dependência intra-domiciliar.

Encontramos como fatores de risco independentes: gênero masculino, adultos jovens (15-24 e 25-34 anos de idade comparadas aos indivíduos de 5-14 anos), não ser alfabetizado, contato com alagamento na rua, criar gato no domicílio (tabela 19).

Tabela 18 Fatores de risco para infecção por *Leptospira* identificados nas análises univariadas. Salvador, Bahia, 2006.

Variáveis		Número de Infectados	1.000 Pessoas-anos de Seguimento	Incidência 1.000 Pessoas-Anos	* RR (IC 95%)	Valor de p
<b><u>Demográficas</u></b>						
<b>A) Faixa etária</b>						
5-14		11	344,4	31,9	1 (referência)	
15-24		20	346,8	57,7	1,80 (0,86 - 3,76)	0,11
25-34		19	252,6	75,2	2,35 (1,12 - 4,94)	0,02
35-44		7	197,9	35,4	1,11 (0,43 - 2,85)	0,84
45-54		3	131,2	22,9	0,72 (0,20 - 2,57)	0,61
>54		1	74,8	13,4	0,42 (0,05 - 3,23)	0,39
<b>B) Sexo masculino</b>						
	Não	36	567,6	63,4	1,98 (1,19 - 3,29)	0,008
	Sim	25	780,0	32,1	1 (referência)	
<b>C) Alfabetizado</b>						
	Não	22	251,4	87,5	2,45 (1,45 - 4,15)	0,0005
	Sim	39	1062,5	36,7	1 (referência)	
<b><u>Leptospirose grave no passado</u></b>						
	Não	59	8,8	6681,8	1 (referência)	
	Sim	2	1338,7	1,5	5,16 (1,26 - 21,11)	0,01
<b><u>Exposições ambientais</u></b>						
<b>A) Lama</b>						
* Contato no peridomicílio	Não	28	839,2	33,4	1 (referência)	
	Sim	33	508,4	64,9	1,95 (1,18 - 3,22)	0,008
* Contato na rua	Não	24	783,8	30,6	1 (referência)	
	Sim	37	563,8	65,6	2,14 (1,28 - 3,58)	0,003
<b>B) Lixo</b>						
* Contato no peridomicílio	Não	40	1059,0	37,8	1 (referência)	
	Sim	21	288,6	72,8	1,92 (1,13 - 3,26)	0,01
* Contato na rua	Não	33	987,7	33,4	1 (referência)	
	Sim	28	359,9	77,8	2,33 (1,41 - 3,85)	0,0007
<b>C) Alagamento</b>						
* Contato no peridomicílio	Não	25	795,4	31,4	1 (referência)	
	Sim	36	552,2	65,2	2,07 (1,25 - 3,45)	0,004
* Contato na rua	Não	18	675,4	26,6	1 (referência)	
	Sim	43	672,2	64,0	2,40 (1,38 - 4,16)	0,001
* Alagamento da Rua	Não	31	882,3	35,1	1 (referência)	
	Sim	30	465,2	64,5	1,84 (1,11 - 3,03)	0,02
* Residir em área sujeita a alagamento (GIS)	Não	51	1224,6	41,6		
	Sim	10	123,0	81,3	1,67 ( 1.05 - 4.78 )	0.018
<b>D) Esgoto</b>						
* Contato no peridomicílio	Não	35	986,0	35,5	1 (referência)	
	Sim	26	361,6	71,9	2,02 (1,22 - 3,36)	0,005
* Contato na rua	Não	26	925,8	28,1	1 (referência)	
	Sim	35	421, 74	83,0	2,95 (1,78 - 4,91)	0,00001
* Desentupir esgoto da rua	Não	37	1046,9	35,3	1 (referência)	
	Sim	24	300,6	79,8	2,26 (1,35 - 3,77)	0,001
* Residir a até 10m de esgotos abertos (GIS)	Não	35	957,9	36,5		
	Sim	26	389,7	66,7	1,89 (1.09 - 3.27)	0,015
<b><u>Reservatórios</u></b>						
Criar gato em casa	Não	40	1115,4	35,9	1 (referência)	
	Sim	21	232,2	90,4	2,52 (1,49 - 4,28)	0,00004

RR= Razão de densidade de incidência (nº de infectados/pessoas-anos de seguimento)

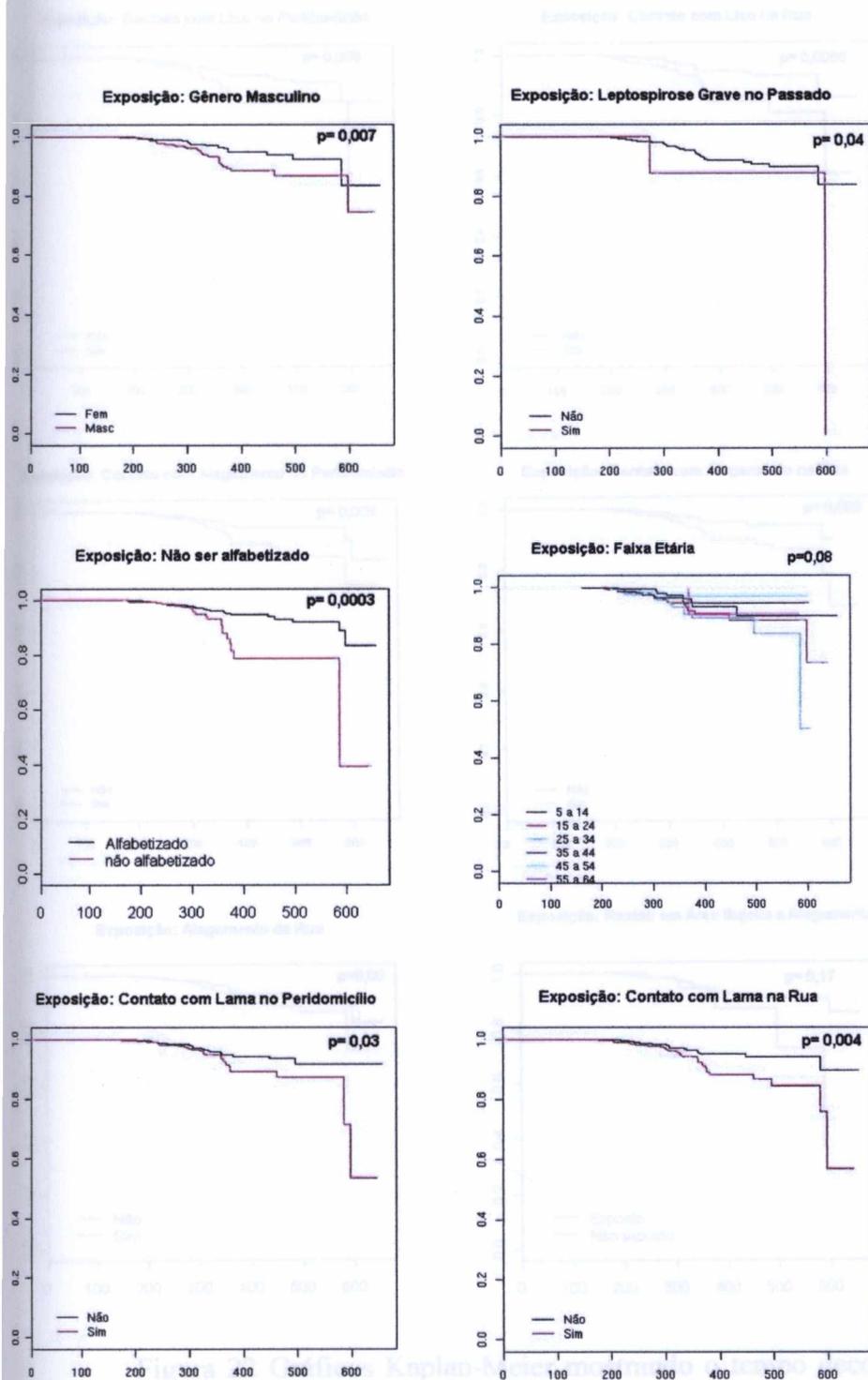


Figura 21 Gráficos Kaplan-Meier mostrando o tempo decorrido até infecção para as exposições: gênero masculino, leptospirose grave no passado, não ser alfabetizado, faixa etária, contato com lama no peridomicílio e na rua. Salvador, Bahia, 2006.

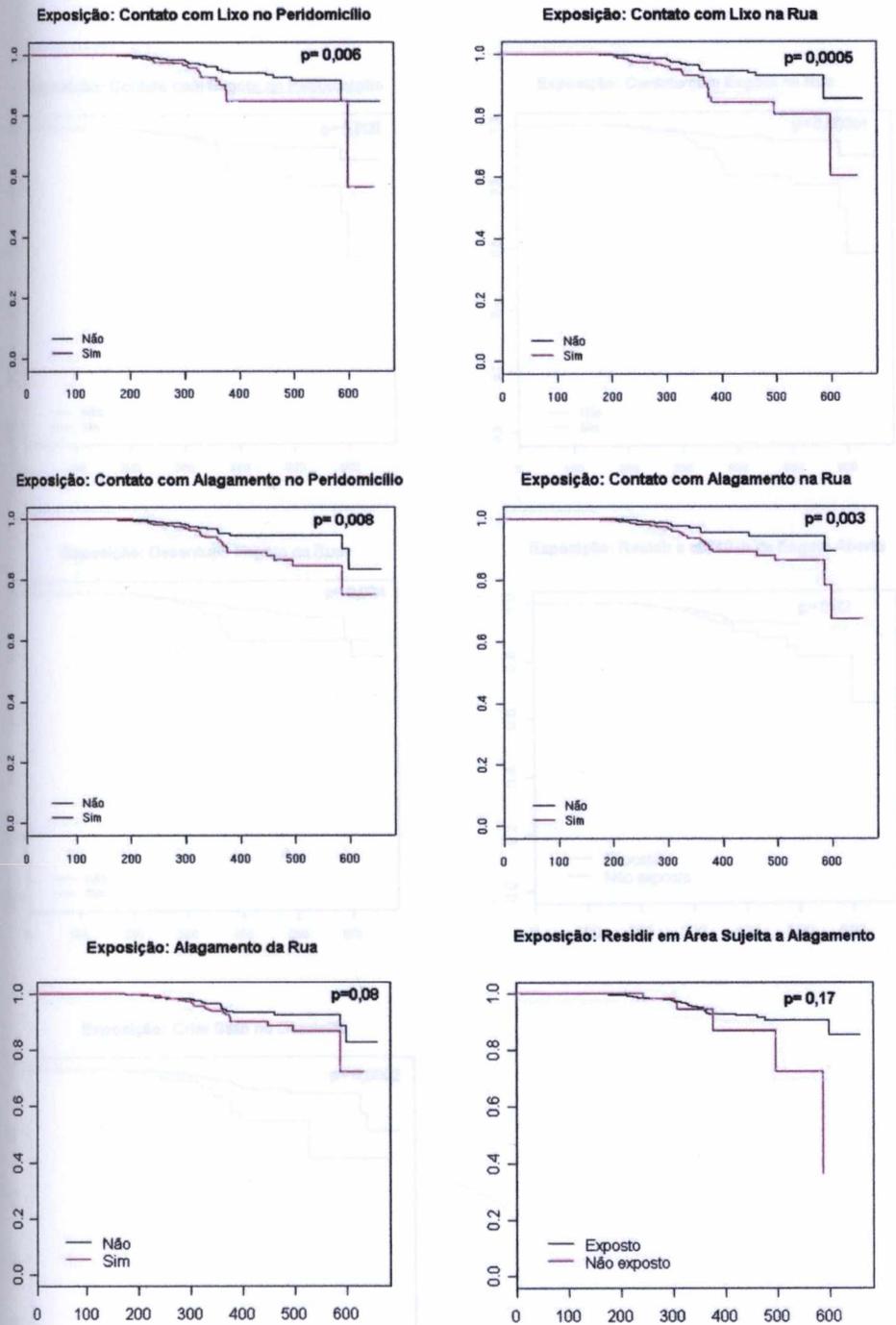


Figura 22 Gráficos Kaplan-Meier mostrando o tempo decorrido até infecção para as exposições contato com lixo e alagamento no peridomicílio e na rua, alagamento da rua, residir em área sujeita a alagamento. Salvador, Bahia, 2006.

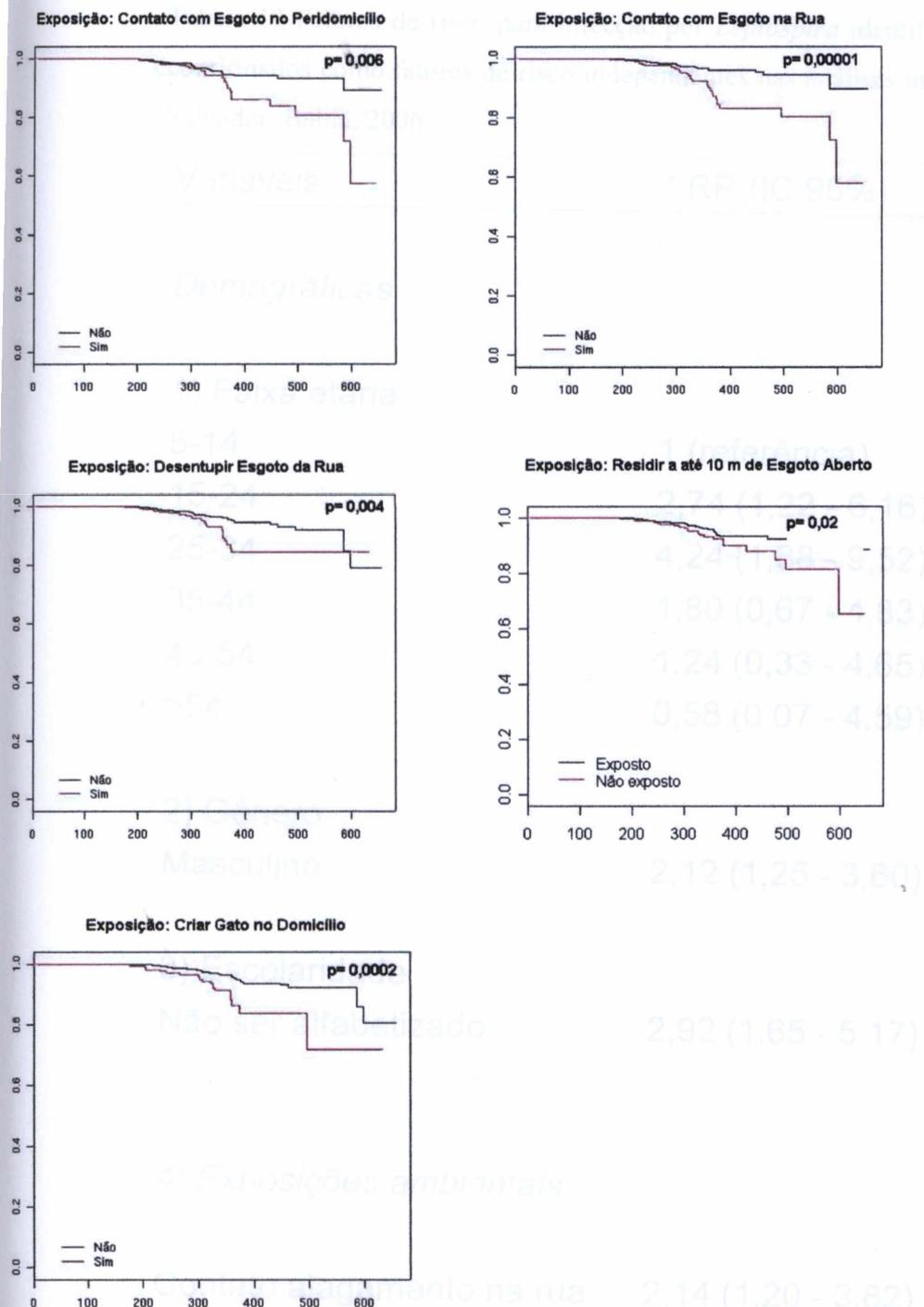


Figura 23 Gráficos Kaplan-Meier mostrando o tempo decorrido até infecção para as variáveis contato com esgoto no peridomicílio e na rua, desentupir esgoto da rua, residir a até 10m de esgoto aberto, criar gato no domicílio. Salvador, Bahia, 2006.

Tabela 19 Fatores de risco para infecção por *Leptospira* identificados nas análises univariadas e confirmados como fatores de risco independentes nas análises multivariadas com modelo de Cox. Salvador, Bahia, 2006.

Variáveis	* RR (IC 95%)	Valor de p
<i>Demográficas</i>		
1) Faixa etária		
5-14	1 (referência)	-----
15-24	2,74 (1,22 - 6,16)	0,014
25-34	4,24 (1,88 - 9,52)	0,00048
35-44	1,80 (0,67 - 4,83)	0,24
45-54	1,24 (0,33 - 4,65)	0,75
>54	0,58 (0,07 - 4,59)	0,61
2) Gênero		
Masculino	2,12 (1,25 - 3,60)	0,005
3) Escolaridade		
Não ser alfabetizado	2,92 (1,65 - 5,17)	0,025
4) <i>Exposições ambientais</i>		
Contato alagamento na rua	2,14 (1,20 - 3,82)	0,01
5) <i>Reservatórios</i>		
Criar gato em casa	2,51 (1,46 - 4,32)	0,0009

\* RR= Hazard Ratio

## 8 DISCUSSÃO

A leptospirose é considerada uma doença que volta a emergir no cenário urbano, relacionada ao crescimento populacional com o conseqüente surgimento de favelas<sup>6,16,17,19,24,36,43,52,59</sup>. Estas são locais desprovidos de infra-estrutura sanitária adequada, suscetíveis a inundações em períodos de chuvas e onde residem indivíduos de baixo poder aquisitivo. As medidas preventivas utilizadas não demonstram efetividade, pois o número de casos permanece elevado. Acredita-se que pequena percentagem dos indivíduos infectados parece evoluir para a forma grave da doença<sup>40</sup> e, nestes, a taxa de letalidade pode variar de 10 a 50%<sup>10,19,42, 59</sup>.

Diante da importância da doença, entender a sua história natural torna-se essencial para preveni-la de forma efetiva. Até o momento, não possuíamos dados prospectivos para taxa de infecção e, conseqüentemente, da razão doença grave:infecção. Este estudo longitudinal prospectivo nos possibilitou mensuração mais adequada das exposições e dos dados sorológicos para avaliação de desfecho. Por ser selecionada de uma coorte de base populacional, esta coorte nos permitirá, diante de ajustes que se fizeram necessários, identificar medidas de prevenção baseadas nos fatores de risco encontrados não só para esta como para outras comunidades com o mesmo perfil da que estamos estudando, inclusive considerando-se que ocupam regiões geográficas semelhantes (encostas, vales). Desta forma, no futuro, medidas de saúde pública que se mostrarem efetivas nesta população poderão ser implementadas e avaliadas em diferentes comunidades carentes.

### 8.1 TAXAS DE INFECÇÃO

Identificamos uma alta taxa de infecção de 49 infectados por 1.000 pessoas-anos de seguimento, alta se considerarmos que, generalizando esta taxa para a coorte de 9.862 indivíduos iríamos obter 483 indivíduos infectados por ano. Na literatura é afirmado que existe uma imunidade após reinfeção<sup>21</sup> porém, a elevada taxa de reinfeção encontrada (111,1 por 1.000 pessoas-anos de seguimento) nos faz questionar se a imunidade naturalmente adquirida tem longa

duração. Também nos faz entender que os grupos de risco estão sendo expostos anualmente, talvez às mesmas fontes e comportamentos de risco reforçando a idéia de que se implementarmos medidas de saúde pública removendo a fonte de infecção ou o contato com a mesma, provavelmente obteremos sucesso na redução do número de indivíduos infectados. As maiores taxas de infecção e nova infecção foram encontradas para indivíduos do gênero masculino na faixa etária de 15-24 anos, ou seja, adultos jovens, corroborando o encontrado na literatura para infecção grave<sup>3,43,52</sup>. Porém, identificamos que mulheres e crianças também são expostas mas não sabemos o motivo delas não evoluírem, na mesma proporção que os homens, para doença grave. Dentre os fatores que

determinam o desenvolvimento de formas graves da doença após a infecção, aqueles relacionados a fatores específicos do hospedeiro podem estar relacionados a esta questão porém, novos estudos são necessários para respondermos a esta pergunta. Após calcularmos a taxa de infecção nesta coorte, nos restava entender qual a percentagem destes indivíduos infectados evoluía para a forma grave da doença. O sorogrupo mais incidente foi o Icterohemorrhagiae. Estes dados confirmam o reservatório como rato e mostram concordância com o observado por outros estudos em nossa cidade<sup>36,55</sup>. Sorovares pertencentes a este sorogrupo são associadas, em alguns trabalhos, às apresentações mais graves da doença como Síndrome de Weil e a hemorragia pulmonar letal<sup>9,60</sup>.

## 8.2 RAZÃO DOENÇA GRAVE:INFECÇÃO

A razão doença grave:infecção, ou seja, quantos indivíduos evoluíram para a forma grave da doença entre aqueles que foram infectados, foi calculada com base na taxa de infecção e na incidência de doença grave na coorte. A razão encontrada na coorte foi de 1 caso grave para 516 indivíduos infectados, para a ZI Pau da Lima foi de 1 caso grave para 598 infectados, o que nos faz concluir que o número de formas assintomáticas ou oligossintomáticas é muito superior ao que esperávamos e as formas graves são realmente uma pequena fração do total de infecções (a ponta do iceberg). Esta percentagem de formas graves é, porém, elevada se considerarmos o seu impacto nesta comunidade e talvez tenda a crescer na dependência do índice pluviométrico, entre outros fatores ambientais. Se pensarmos no impacto deste número de indivíduos doentes para as suas

famílias, em termos de sustento da casa ou para o setor saúde com gastos em hospitalização, veremos que realmente trata-se de um custo elevado se comparado às medidas de prevenção focalizadas que podem ser implementadas com baixo custo e alto impacto na redução dos dados citados. A identificação das exposições de risco para estes indivíduos pode nortear o desenvolvimento destas intervenções.

### 8.3 FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO

Os fatores de risco identificados nas análises univariadas incluíram indivíduos do gênero masculino e adultos jovens já citados na literatura como grupos de risco para doença grave<sup>3,36,43,52</sup> e confirmam/complementam o grupo em que encontramos as maiores taxas de infecção. Outro fator encontrado foi a inexistência de nível de escolaridade (não ser alfabetizado) que é uma característica sócio-cultural e econômica comumente identificada em comunidades carentes. Também identificados como fatores de risco foram os contatos no peridomicílio e na rua com lama, lixo, alagamento, esgoto, alagamento da rua, desentupir esgoto da rua, residir em área sujeita a alagamento e residir a até dez metros de esgotos abertos que são exposições relacionadas às precárias condições de saneamento também comuns em favelas e descritas na literatura como associadas à aquisição da doença grave<sup>5,6,8,16,17,19,27,33,36,38,52,59</sup>. As duas últimas corroboram resultados encontrados em estudo retrospectivo (caso-controle) realizado por nossa equipe no ano de 2000<sup>55</sup>.

A presença de ratos não foi identificada como fator de risco talvez porque quase a totalidade dos indivíduos referiu ver ratos no peridomicílio, porém o sorogrupo identificado na infecção dos indivíduos (*Icterohaemorrhagiae*) confirmou este animal como reservatório. Uma questão interessante foi o fato de criar gato ser identificado como fator de risco, a princípio pensamos em uma possível explicação que, residindo em uma área com alta infestação de roedores, os indivíduos criavam gatos como uma tentativa de se protegerem e que, os indivíduos mais carentes mantinham os gatos, ao contrário daqueles com poder aquisitivo um pouco mais elevado que podiam custear a criação de um cão. Alguns trabalhos citam infecções por *Leptospira* em gatos (como hospedeiros incidentais) porém eles raramente mostram sintomatologia (talvez

por uma resistência natural adquirida), outros estudos identificaram alta prevalência de anticorpos aglutinantes no soro destes animais (especialmente nos sorovares icterohaemorrhagiae, pomona e autumnalis)<sup>1,39</sup>, criar gatos em casa como fator de risco associado à aquisição de leptospirose também já foi encontrado na literatura; em nosso estudo o sorogrupo predominante em quase totalidade dos indivíduos foi Icterohaemorrhagiae, acreditamos, portanto, na possibilidade de infecção dos gatos por serem predadores dos ratos já que na literatura não é citada uma comprovação do gato na cadeia de transmissão da doença.

As análises multivariadas de regressão de Cox simples e com efeitos aleatórios no domicílio identificaram as mesmas variáveis como fatores de risco para infecção por *Leptospira*. Alguns dos fatores de risco identificados ao final das análises confirmam o encontrado na literatura e em nossos estudos até o momento: As faixas etárias foram mantidas no modelo pelo acréscimo no risco para infecção com o aumento da idade já conhecido da literatura, destas, 15-24 e 25-34 apareceram como fatores de risco independentes e confirmam uma das faixas em que encontramos maior taxa de infecção (15-24) e a que foi encontrada como fator de risco nas análises univariadas; observamos que sexo masculino já conhecido como fator de risco importante para doença grave<sup>3,43,52</sup> também o é para infecção. Estes achados confirmam, portanto, os adultos jovens e os indivíduos do gênero masculino como grupos de risco tanto para doença grave quanto para infecção. Outro achado confirmado com as análises multivariadas foi o nível precário de escolaridade (não ser alfabetizado). Contato com alagamento já citado na literatura como fator de risco para leptospirose<sup>5,6,19,21,24,36,59</sup>, foi confirmado como fator de risco independente para infecção em nossas análises multivariadas. Tanto o contato com alagamento quanto a criação de gatos em casa parecem confirmar que fatores comportamentais e de risco no peridomicílio podem estar influenciando a aquisição da doença, não parece tratar-se de algo acidental na maior parte dos casos (fator preponderante), parece ser alguma atividade (ou grupo de atividades) rotineira e, portanto, passível de prevenção. Percebemos que a variável contato com alagamento na rua parece indicar que os contatos com ambiente contaminado realmente ocorrem com maior frequência nos períodos de chuvas como indicam relatos na literatura<sup>5, 6, 21, 36,38, 51</sup>.

Os achados deste estudo não incluíram fatores ocupacionais e identificaram o ambiente peridomiciliar como local onde há maior probabilidade de ocorrer a transmissão e onde devemos

focalizar futuras medidas de prevenção. Além de refletirem uma mudança no padrão da leptospirose, antes reconhecida como uma doença ocupacional, nossos dados refletem a realidade sócio-econômica que parece ser um dos fatores responsáveis por esta mudança. O desemprego e/ou trabalho informal abrangeram 499 (31%) dos indivíduos participantes do estudo sendo que 730 (40%) e 919 (57) % dos participantes estavam nas faixas etárias produtivas 18 a 40 anos de idade e 18 a 50 anos de idade, respectivamente. O desemprego aumenta o tempo de permanência do indivíduo no ambiente peridomiciliar, local onde parece haver maior probabilidade de contato com fontes contaminadas e conseqüente infecção. O trabalho informal, neste perfil de comunidade, nem sempre está desvinculado do ambiente peridomiciliar e é caracterizado pela falta de acesso aos equipamentos de proteção individual que são exigidos no trabalho formal, sem mencionarmos os inúmeros riscos que atividades em ambiente insalubre oferecem. Estes fatos acrescidos ao baixo poder aquisitivo e nível de escolaridade precário destes indivíduos fazem com que eles não apenas não possam adquirir estes equipamentos como nem dêem a relevância merecida ao uso dos mesmos.

#### 8.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este trabalho apresentou algumas limitações, e o reconhecimento destas nos levou a um aprimoramento no desenho do estudo e à realização de análises mais adequadas (ajustadas). A primeira das limitações foi o viés de seleção, o fato dos indivíduos do sexo masculino estarem fora de domicílios durante o dia por questões ocupacionais, dificultou a inclusão dos mesmos no estudo. Tentamos reduzir a possibilidade deste viés através de visitas noturnas, aos sábados, domingos e feriados. Porém, o número de mulheres (52%) ainda foi superior ao de homens para os elegíveis e 58% de mulheres para a amostra. Outro fator que pode ter colaborado para o maior número de indivíduos do sexo feminino na amostra foi a seleção por domicílios e não por indivíduos (limitação no desenho do estudo). Esta seleção foi realizada com o objetivo, alcançado, de facilitar o acompanhamento da coorte com elevado número de pessoas. Diante destes vieses, as análises foram ajustadas por faixa etária e sexo para cálculo das taxas de infecção e assim, pudemos estimar os valores dos coeficientes a depender das proporções das classes idade e sexo na amostra e na população. Observamos que os ajustes só modificaram as taxas finais para cada

sexo e população total, também realizamos análises ajustadas para dependência intra-domiciliar na identificação dos fatores de risco.

A perda de seguimento é uma característica inerente aos estudos de coorte, por se tratar de uma coorte a ser realizada na população localizada em área de risco, locais onde ocorrem inundações constantes durante as chuvas, o estudo esteve susceptível a apresentar perdas. Para tentar reduzir este numero diante das recusas tentamos identificar o real motivo e resolvê-lo, esclarecemos a população a respeito da importância do estudo e, em relação às mudanças de domicílio, procuramos localizá-las e segui-las, caso permanecessem na área do estudo. Percebemos uma perda maior de homens que mulheres fato que também corroborou com a necessidade de ajustes citados anteriormente.

Em termos da avaliação sorológica, os inquéritos anuais e a microaglutinação podem ter subestimado o número de infecções. Houve a possibilidade de não identificarmos os indivíduos infectados no momento da coleta de dados basais se este contato tivesse ocorrido há poucos dias atrás ou no mesmo dia da avaliação. Este evento seria extremamente raro pois a coleta do seguimento especialmente foi realizada em período não epidêmico. Considerando que o importante para este estudo é avaliar se houve contato com o patógeno entre as datas de coleta dos dados basais e a de seguimento anual, ressaltando que é impraticável realizar avaliações em menor espaço de tempo para dois mil indivíduos, eventos raros não seriam relevantes neste caso. Os títulos de anticorpos aglutinantes na microaglutinação podem ter decrescido no período entre a primeira e a segunda avaliações, mas para identificar as mudanças seriam necessárias avaliações mais periódicas em um ano para cada um dos participantes.

Uma limitação na estimativa da razão doença grave:infecção foi que identificamos poucos casos graves durante a vigilância da coorte e da Zona de Informação Pau da Lima, conseqüentemente, as estimativas podem não ser precisas, sendo necessário maior tempo de acompanhamento. Outro fato relevante foi que as exposições não foram avaliadas necessariamente na época de chuvas e as exposições de risco podem ser tempo-dependentes. Em termo da validade externa dos resultados, acreditamos que nossos estudos podem servir para comunidades com

mesmo perfil pois 30% da população de Salvador está submetida a condições semelhantes de pobreza.

## 8.5 PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

O impacto da leptospirose é de grande importância social e econômica, entre outros, por apresentar elevada incidência em determinadas áreas especialmente nos indivíduos em idade produtiva (20 a 40 anos), epidemias urbanas cíclicas com elevado custo hospitalar, e apesar de todas as medidas terapêuticas invasivas, apresenta alta letalidade; além dos custos relacionados às perdas na pecuária, morte de animais domésticos de estimação, controle de roedores (anti-ratização e desratização), ações de vigilância, custos com equipamentos de proteção individual, processamento de alimentos. Estes fatos nos fazem acreditar que a prevenção é a melhor maneira de reduzir todos estes gastos e transtornos. Diante das medidas de prevenção disponíveis, tais como, desratização, anti-ratização, pouca ênfase em uso de equipamentos de proteção individual e educação para saúde, percebemos que, a relação custo-benefício não as caracteriza como efetivas. Tornava-se necessário entender um pouco mais sobre a história natural da leptospirose urbana para sugerir intervenções de saúde pública direcionadas à realidade da comunidade estudada. Após termos identificado com este estudo os fatores de risco para infecção por *Leptospira*, esperamos continuar acompanhando esta coorte por mais quatro anos observando se estes fatores se repetem, compreendendo melhor a razão doença grave:infecção e, em um próximo passo, identificar atividades de risco relacionadas a estas exposições significativas que agora conhecemos. A partir da observação destas atividades e quais delas podem realmente ser prevenidas (não acidentais), estaremos aptos a sugerir e/ou implementar e avaliar medidas mais efetivas de prevenção, tais como:

- Requalificação e urbanização da área, a exemplo da construção de uma rede de esgotos ou, de forma alternativa, um sistema de fossa-sumidouro. Existem programas já executados pela CONDER (Companhia de Desenvolvimento Urbano do Estado da Bahia), órgão do Governo da Bahia, que poderiam ser melhor direcionados para a área do estudo. É o caso do programa viver melhor que tem com objetivo recuperar áreas degradadas, insalubres ou inadequadas para moradia através das ações de construção habitacional para famílias remanejadas, melhorias habitacionais,

incluindo-se unidades sanitárias, infra-estrutura: água, esgoto, energia, drenagem, pavimentação, contenções, obras complementares de urbanização e promoção social.

- barreiras físicas: \* contenções para evitar o alagamento dos domicílios são medidas possíveis de serem realizadas mas, é necessária a compreensão de como devem ser feitas;
- \* fornecimento de equipamentos de proteção individual aos grupos de risco identificados: roupas não permeáveis, luvas, botas, óculos protetores.
  
- quimioprofilaxia: até o momento utiliza-se doxiciclina 100mg de 12 em 12h por 5 a 7 dias, é indicada no caso de indivíduos potencialmente expostos à *Leptospira*. Por exemplo: pessoas que vivem em áreas endêmicas durante as estações chuvosas, profissionais da saúde ou outros profissionais cujo trabalho está ligado ao alto risco de infecção e viajantes que visitam áreas endêmicas<sup>55</sup>. É importante entender, no contexto do nosso estudo, quais os benefícios reais da quimioprofilaxia e se esta seria viável.
  
- educação em saúde, é a forma que parece mais efetiva em prevenção, torna-se importante mesmo para implementar outras medidas. Educação voltada à prevenção do risco e mudanças comportamentais, conscientização do papel de cada um para alcance de benefícios para todos.

A identificação de fatores de risco geográficos, sociais, culturais, climáticos, ocupacionais, entre outros, aparentemente deveria tomar mais fácil prevenir a leptospirose, porém a dificuldade em controlar ou modificar estes fatores, a complexidade da interação homem e meio ambiente, fatores desconhecidos ou altamente mutáveis contribuem para a persistência da alta prevalência da doença e das epidemias cíclicas durante o período de chuvas fortes. A terapêutica não mostra resultados, a busca pelo conhecimento e a prevenção ainda se mostram como as grandes armas para reduzir o número de casos<sup>24 36</sup>. As medidas de prevenção e combate à leptospirose devem ser estabelecidas de acordo com a realidade local, para isto é necessário identificar as áreas críticas (com maior incidência) e exposições ambientais de risco para infecção através do acompanhamento em tempo real dos indivíduos residentes nestas áreas e dos casos notificados e isto foi o que procuramos fazer com este estudo.

## 9 CONCLUSÕES

1- Uma proporção significativa desta população carente (5%) de Salvador é infectada anualmente. Se considerarmos que cerca de 30% da população de Salvador vive em condições de pobreza semelhantes à da população do nosso estudo, podemos estimar aproximadamente 32.000 indivíduos infectados por ano.

2- O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* foi identificado como o agente etiológico das infecções por *Leptospira*, existe, portanto, um único sorogrupo responsável pela transmissão da infecção. Este fato também confirma o rato como principal reservatório para a *Leptospira* em nosso meio.

3- A taxa de reinfecção estava elevada nesta comunidade (11%) e quando aconteceu a reinfecção foi principalmente com o mesmo sorogrupo. Isto nos faz entender que os grupos de risco estão sendo expostos anualmente, talvez às mesmas fontes e comportamentos de risco. Também nos faz questionar se a imunidade naturalmente adquirida pode não ter longa duração.

4- Homens e adultos jovens foram identificados como grupos de risco nas análises multivariadas, semelhante ao que ocorre na doença grave. Porém, encontramos que mulheres e crianças são expostas mas ainda desconhecemos o motivo destas não estarem evoluindo para a forma grave.

5- A razão doença grave:infecção foi de 1:516 na coorte. Assim concluímos que a carga da doença é bem maior que imaginávamos e as formas graves correspondem a uma pequena fração do total das infecções (ponta do iceberg). Porém, só identificamos um caso de leptospirose grave na coorte, os dados precisam ser confirmados por maior período de acompanhamento e da vigilância.

6- Idade (adultos jovens), sexo masculino, não ser alfabetizado, contato com alagamento na rua e criar gato no domicílio foram fatores independentes para infecção identificando prováveis grupos de risco. Os fatores de risco identificados por nosso estudo não incluíram variáveis ocupacionais, este estudo aponta para o ambiente peridomiciliar como local onde há maior probabilidade de ocorrer a transmissão. Percebemos portanto que, devemos focalizar nossa atenção, especialmente

durante a época de chuvas torrenciais e surtos epidêmicos, para o ambiente peridomiciliar e os grupos de risco identificados buscando identificar atividades de risco para, desta forma, traçarmos, implementarmos e avaliarmos intervenções de saúde pública que demonstrem maior efetividade na prevenção da leptospirose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; ANDRADE, J.S.L.; CLEMENTINO, I.J.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Valuation the level of antibodies anti-leptospira in cats from the city of Patos- PB. **Clín. Vet.**, **46**:48-54, 2003.
- 2 AOKI, T.; KOIZUMI, N.; WATANABE, H. A case of leptospirosis probably caused by drinking contaminated well-water after an earthquake. **Jpn. J. Infect. Dis.**, **54**:243-244, 2001.
- 3 AREAN, V.M., The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's Disease), **Am. J. Pathol.**, **40**:393–415, 1962. Review Plank and Dean 1274 *Microbes and Infection* 1265-1276, 2000.
- 4 AREAN, V.M. Studies on the pathogenesis of leptospirosis. II – A clinico-parthological evaluation of hepatic and renal function in experimental leptospiral infections. **Lab. Invest.**, **11**: 273-288, 1962.
- 5 BARCELLOS, C.; CHAGASTELLES SABROZA, P. Sócio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in Western Rio de Janeiro: a geographical approach. **Int. J. Environ. Health Res.**, **10**:301-313, 2000.
- 6 BARCELLOS, C.; SABROZA, P.C. The Place behind the case: leptospirosis risks and associated enviroment conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Públ.**, **59**:59-67, 2001.
- 7 BAROCCHI, M.A.; KO, A.I.; FERRER, S.R.; FARIA, M.T.; REIS, M.G.; RILEY, L.W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. **J. Clin. Microbiol.**, **39**:191-195, 2001.
- 8 BHARADWAJ, R.; BAL, A.M.; JOSHI, S.A.; KAGAL, A.; POL, S.S.; GARAD, G.; ARJUNWADKAR, V.; KATTI, R. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, **55**:194-196, 2002.
- 9 BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; ET AL. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, **3**:757–371, 2003.
- 10 BINDER, W.D.; MERMEL, L.A. Leptospirosis in an urban setting: Case report and rewiew of an emerging infectious disease. **J. Emerg. Med.**, **16**:851-856, 1998.
- 11 BOLAND, M.; SAYERS, G.; COLEMAN, T.; BERGIN, C.; SHEEHAN, N.; CREAMER, E.; O'CONNEL, M.; ONES, L.; ZOCHOWSKI, W. A cluster os leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. **Epidemiol. Infect.**, **132**: 95-200, 2004.
- 12 BOVET, P.; YERSIN, C.; MERIEN, F.; DAVIS, C.E.; PEROLAT, P. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean) **Int. J. Epidemiol.**, **28**:583-590, 1999.

- 13 CALDAS, E.M.; SAMPAIO, M.B.; COSTA, E.; MIRANDA, G. Estudo epidemiológico de um surto de leptospirose ocorrido na cidade do Salvador, Bahia em maio e junho de 1978. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **39**:85-94, 1979.
- 14 CDC. Centers of Disease Control and Prevention. United States of America. Department of Health & Human Services. Leptospirosis: case definitions for infectious conditions under public health surveillance. **MMWR, Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, **46**(RR-10):49, 1997.
- 15 CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Update: outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000—Borneo, Malaysia, 2000. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, **50**:21–24, 2001.
- 16 COSTA, E.; COSTA, Y.A.; LOPES, A.A.; SACRAMENTO, E.; BINA, J.C. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, **34**:1-12, 2001.
- 17 COVIC, A.; GOLDSMITH, D.J.A.; GUSBETH-TATOMIR, P.; SEICA, A.; COVIC, M. A Retrospective 5-year Study in Molodova of Acute Renal Failure Due to Leptospirosis: 58 Cases and a Review of the Literature. **Nephrol. Dial. Transplant**, **18**:1128-1134, 2003.
- 18 DAHER, E.; ZANETTA, D.M.; CAVALCANTE, M.B.; ABDULKADER, RC. Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **61**:630-634, 1999.
- 19 DOUGLIN, C. P.; JORDAN, C.; ROCK, R.; HURLEY, A.; LEVETT, P. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. **Emerg. Infect. Dis.**, **3**:78-80, 1997.
- 20 DE FIGUEIREDO, C.L.; MOURÃO, A.C.; OLIVEIRA, M.A.A.; ALVES, W.R.; OOTEMAN, M.C.; CHAMONE, C.B.; KOURY, M.C. Leptospirose Humana no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma Abordagem geográfica. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, **34**:331-338, 2001.
- 21 FAINE, S. *Leptospira and leptospirosis*. 2 ed. Melbourne: CRC Press, MedSci, 1999.
- 22 FAINE S. Factors affecting development of carrier state in leptospirosis. **Journal of Hygiene** **60** (4): 427-&,1962.
- 23 FARR, W.R. Leptospirosis. **Clin. Infect Dis.**, **21**:1-8, 1995.
- 24 FLANNERY, B.; PEREIRA, M.M.; VELLOSO, L.F.; CARVALHO, C.C.; CODES, L.G.; ORRICO, G.S.; DOURADO, C.M.R.; RILEY, L.W.; REIS, M.G.; KO, A.I. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **65**:657-663, 2001.
- 25 GALÉ, N.B.; ALEXANDER, A.D.; EVANS, L.B. ET AL. An outbreak of leptospirosis among U.S. army troops in the canal zone. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **15**:64-70, 1966.

- 26 GONÇALVES, A.J.; DE CARVALHO, J.E.; GUEDES E SILVA, J.B.; ROZEMBAUM, R.; VIEIRA, R. Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the causes of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomicopathological patterns. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **25**:261-270, 1992.
- 27 GORDIS, L. Epidemiology, 3. rd. edition. Philadelphia. WB Sanders co, 2004.
- 28 GORDILHO AS. Limites do Habitar: Segregação e Exclusão na Configuração Urbana Contemporânea de Salvador e Perspectivas no Final do Século XX EDUFBA, Salvador, 2000.
- 29 HAAKE, D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, **146**:1491-1504, 2000.
- 30 HAAKE, D.A.; DUNDOO, M.; CADER, R.; KUBAK, B.M.; HARTSKEERL, R.A.; SEJVAR, J.J.; ASHFORD, D.A. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin. Infect. Dis.**, **34**:40-43, 2002.
- 31 JAGADISHCHANDRA K, PRATHB AG, RAO SP. Clinical and epidemiological correlation of leptospirosis among patient attending KMCH, Manipal. **Indian Journal of Medical Sciences**, **57**: 101-104,2003.
- 32 JANSEN A, SCHONEBERG I, FRANK C, *et al.* Leptospirosis in Germany, 1962-2003. **Emerging Infectious Diseases**. **11**: I048-1 054
- 33 JOHNSON, M.A.S.; SMITH, H.; JOSEPH, P.; GILMAN, R.H.; BATISTA, C.T.; CAMPOS, K.J.; CÉSPEDES, M.; KLATSKY, P.; VIDAL, C.; TERRY, H.; CALDERON, M.M.; CORAL, C.; CABRERA, L.; PARMAR, O.S.; VINETZ, J.M. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. **Emer. Infect. Dis.**, **10**:1016-1021, 2004.
- 34 KARIV, R.; KLEMPFNER, R.; BARNEA, A.; SIDI, Y.; SCHWARTZ, E. The changing epidemiology of leptospirosis in Israel. **Emerg. Infect. Dis.**, **7**:990-992, 2001.
- 35 KATZ, A. R.; ANSDELL, V. E.; EFFLER, P. V.; MIDDLETON, C. R.; SASAKI, D. M. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. **Clin. Infect. Dis.**, **33**:1834-1841, 2001.
- 36 KO, A.I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C.M.; JOHNSON JUNIOR, W.D.; RILEY, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, **354**:820-825, 1999.
- 37 KOBAYASHI, Y. Clinical Observations and Treatment of Leptospirosis. **J. Infect. Chemother.**, **7**:59-68, 2001.
- 38 KUPEK, E.; FAVERSANI, M.C. DE S. S.; PHILIPPI, J.M. DE S. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. **Braz. J. Infect. Dis.**, **4**:131-134, 2000.

- 39 LAGONI, H.; CABRAL, K.G.; KRONFLY, C. S. Serological. Survey for leptospirosis in cats. **Clin. Vet.**, 17:24-26, 1998.
- 40 LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14:296–326, 2001.
- 41 MANILA, A. E. Leptospirosis in Philippine floods. Disponível em: [URL:http://www.bmj.com](http://www.bmj.com).
- 42 MAROTTO, P.C.; NASCIMENTO, C.M.; ELUF-NETO, J.; MAROTTO, M.S.; ANDRADE, L.; SZTAJNBOK, J.; SEGURO, A.C. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin. Infect. Dis.**, 29:1561-1563, 1999.
- 43 MEITES, E.; JAY, M.T.; DERESINDKI, S.; SHIEH, W.J.; ZAKI, S.R.; TOMPKINS, L.; SMITH, D.S. Reemerging leptospirosis, Califórnia. **Emerg. Infect. Dis.**, 10:406-412, 2004.
- 44 MORGAN, J.; BORNSTEI, S.L.; KARPATI, A.M. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin. Infect. Dis.**, 34:1593-1599, 2002.
- 45 NALLY, J.E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X.Y.; FISHBEIN, M.C.; PEREIRA, M.M.; DA SILVA, J.J.; BLANCO, D.R.; LOVETT, M.A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Pathol.**, 164:1115-1127, 2004.
- 46 NARDONE, A.; CAPEK, I.; BARANTON, G.; CAMPÈSE, C.; POSTIC, D.; VAILANT, V.; LIÈNARD, M.; DESENCLOS, J.C. Risk Factors for Leptospirosis in metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 1999-2000. **Brief Rep.**, 39:751-753, 2004.
- 47 NASCIMENTO ATLO; KO, A.I.; MARTINS, E.A.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; HO, P.L.; HAAKE, D.A. ET AL. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, 186:2164-2172, 2004.
- 48 NATARAJASEENIVASAN, K.; BOOPALAN, M.; SELVANAYAKI, K.; SURESH, S.R.; RATNAM, S. Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 55:170-173, 2002.
- 49 PEREIRA, M.M.; MATSUO, M.G.; BAUAB, A.R.; VASCONCELOS, S.A.; MORAES, Z.M.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, 38:450-452, 2000.
- 50 PERRA, A.; SERVAS, V.; TERRIER, G.; POSTIC, D.; BARANTON, G.; ANDRE-FONTAINE, G.; VAILLANT, V.; CAPEK, I. Clustered cases of leptospirosis in Rochefort, France, June 2001. **Eur. Surveill.**, 7:131-136, 2002.

- 51 PHRAISUWAN, P.; WHITNEY, E.A.S.; THARMAPHORNPILAS, P.; GUHARAT, S.; THONGKAMSAMUT, S.; ARESAGIG, S.; LIANGPHONGPHANTHU, J.; JUNTHIMA, K.; SOKAMPANG, A.; ASHFORD, D. A. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. **Emerg. Infect. Dis.**, **8**:1455-1459, 2002.
- 52 ROMERO, E.C.; BERNARDO, C.C.; YASUDA, P.H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **45**:245-248, 2003.
- 53 ROSNER, B. Fundamentals of Bioestatistics. Fourth edition. Duxbury press, 1995
- 54 SAMBASIVA, R.R.; NAVEEN, G.; SKA, P.B. Leptospirosis in India and rest of world. **Braz. J. Infect. Dis.**, **7**:1-22, 2003.
- 55 SARKAR, U.; NASCIMENTO, S.F.; MATOS, R.B.; MARTINS, R.; NUEVO, H.; KALOFANOS, I.; GRUNSTEIN, I.; FLANNER, Y. B.; DIAS, J.; RILEY, L.W.; REIS, M.G.; KO, A.I. A population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **AM. J. TROP. MED. HYG.**, **66**:605-610, 2002.
- 56 SASAKI, D.M.; PANG, L.; MINETTE, H.P.; WAKIDA, C.K.; FUJIMOTO, W.J.; MANEA, S.J.; ET AL. Active Surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **48**:35-43, 1993.
- 57 SILVA, H.R.; TAVARES-NETO, J.; BINA, J.C.; MEYER, R. Leptospire- infecção e forma subclínica em crianças em Salvador, Bahia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **46**:1, 2004.
- 58 TREVEJO, R.T.; RIGAU-PEREZ, J.G.; ASHFORD, D.A.; ET AL. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicarágua, 1995. **J. Infect. Dis.**, **178**:1457-1463, 1998.
- 59 VADO-SOLÍS, I.; CÁRDENAS-MARRUFO, M.F.; JIMÉNEZ-DELGADILLO, B.; ALZINA-LÓPEZ, A.; LAVIADA-MOLINA, H.; SUAREZ-SOLÍS, V.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J.E. Clinical-Epidemiological Study of Leptospirosis in Humans and Reservoirs in Yucatán, México. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, **44**: 1-14, 2002.
- 60 VINETZ, J.M. Leptospirosis. **Curr. Opin. infect. Dis.**, **14**: 527-538, 2001.
- 61 VINETZ, J.M.; GLASS, G.E.; FLEXNER, C.E.; MUELLER, P.; KASLOW, D.C., Sporadic urban leptospirosis, **Ann. Intern. Med.**, **125**:794-798, 1996.
- 62 WHO. World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO Recommended Surveillance Standards. 1999.
- 63 ZUERNER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. TECHNOLOGICAL ADVANCES IN THE MOLECULAR BIOLOGY OF LEPTOSPIRA. **J. MOL. MICROBIOL. BIOTECHNOL.**, **2**:455-462, 2000.

Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health  
New York Presbyterian Hospital - Weill Medical College of Cornell University  
Consent for Clinical Investigation

IRB APPROVED

Approved: 1-24-05

Expires: 5-16-05

Project Title: The Natural History of Leptospirosis in Salvador, Bahia.

Participant's Name: \_\_\_\_\_

Participant's House Number: \_\_\_\_\_ Participant Identification Number: \_\_\_\_\_

to be read to all participants and those legally responsible for the participation of minors: The information to follow will describe the research study and your role / the role of your child as a participant. The interviewer will respond to any questions that you or your child might have about the questionnaire or the research study. Please, listen with attention and feel free to ask any questions about the information to be given.

Research Study Proposal: We are performing a research study on leptospirosis, commonly known as "disease of the rats". We are inviting you to participate in this research study, supported and/or performed by the Oswaldo Cruz Foundation/Brazilian Ministry of Health, National Institutes of Health (USA) and the Weill Medical College of Cornell University (USA), because you live in an area where many people have been hospitalized with the severe form of the disease in the past five years. To better understand the impact of leptospirosis in your and other communities in Salvador, we would like to determine what proportion of the people in your neighborhood are at risk of being infected with leptospirosis over the next five years. In addition, we would also like to know what types of exposures cause people to become infected. Most who are infected develop a mild form of the disease with fever, headache and body pains. A small proportion, however, develop severe disease with problems such as kidney failure, liver failure and severe bleeding, requiring hospitalization. For this reason, we need to understand why only a fraction of those who contract leptospirosis develop this serious form of the disease. The information that you can provide will aid to identify environmental sources for transmission that can be addressed by public health control measures. Furthermore, this information may also aid in developing new interventions against leptospirosis such as vaccines. You may have a direct benefit from your participation in this research study.

Proceedings to be Followed: If you / your child decide, voluntarily, to participate in this research project after having read the terms of consent, an interviewer will ask questions about where you live and where you work, and about your activities at both locations over the past year. In addition, we will ask to collect a blood sample. A trained lab technician will draw 10 milliliters (one tablespoon) of blood. You may get a little pain, a bruise, or, much less likely, an infection at the site of the blood draw, but these risks are minimal because a trained professional will draw the blood. In the next five years, we plan to visit you / your child once a year for a total of five more visits during which we will perform the same interview and collect the same amount of blood. The testing of your blood samples will allow us to determine if you have been infected with leptospirosis during the period between yearly evaluations. We will provide the results of these tests for your personal records. If these tests determine whether you had a past infection and not active infection, a positive test result does not indicate that you need to be evaluated to receive treatment for leptospirosis.

Confidentiality: Your responses during the interview and the results from the blood exam will be confidential to only you / your child. Only the investigators of the research study group; the Ethical Committee for Research, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation; the Institutional Review Board (IRB) of New York Presbyterian Hospital (USA); the National Institutes of Health (USA), the National Institutes of Health and Infectious Diseases (USA); and the Office for Human Research Protection (USA) will have access to this information. You / your child will not be identified in any report or publication resulting from the research study.

Voluntary Participation: Your / your child's participation in this research study is voluntary. You / your child may refuse to participate or may discontinue participation at any time during the initial research study visit or any of the five follow-up visits, if you / your child so choose. In addition, the research study team may choose to

Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health  
New York Presbyterian Hospital - Weill Medical College of Cornell University  
Assent for Minors

Project Title: The Natural History of Leptospirosis in Salvador, Bahia.

Participant's name: \_\_\_\_\_

Participant's House Number: \_\_\_\_\_ Participant Identification Number: \_\_\_\_\_

To be read by all participants from the minors group: The following information is about a research study that is being done at Foundation Oswaldo Cruz. The interviewer will respond to any question that you have. Please listen carefully and ask about any doubts you might have.

We are asking for your help because we would like to know how many people in your neighborhood are at risk of contracting a disease called leptospirosis, commonly known as "disease of the rat". In addition, we want to know how people catch the disease and why some with the disease become more sick than others and need hospitalization. This information may help us prevent other people from getting leptospirosis in the future. To do this, we would like to ask some questions about where you live, your activities, and your habits over the last year.

In addition, we would like to test your blood to determine if you have had contact with the bacteria that causes leptospirosis. You may have some pain or a bruise, and possibly, but very unlikely, a local infection where the blood was taken. However, the risk will be minimized because a specialized professional will draw the blood. If you and your parents want you to participate, we will ask you further questions. In addition, we plan to return once a year over the next five years to ask questions and draw a sample of blood. We can only do this if you and your parents agree.

Consent: I heard and understood the terms of consent. All of my questions were answered. I voluntarily agree to participate.

\_\_\_\_\_  
Signature of Research Study Participant

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Time

 Thumbprint of research study participant

\_\_\_\_\_  
Signature of Witness

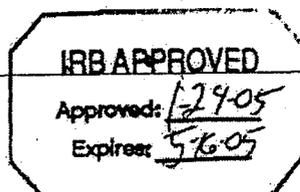
\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Time

\_\_\_\_\_  
Signature of Interviewer

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Time



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde  
Hospital Presbiteriano de Nova Iorque - Colégio de Medicina de Weill na Universidade de Cornell  
Consentimento para Investigação Clínica

IRB APPROVED

Approved: 1-24-05

Expires: 5-16-05

Título do Projeto: História Natural da Leptospirose em Salvador. Bahia

Nome do Participante: \_\_\_\_\_

No. da casa do participante: \_\_\_\_\_

No. de identificação do participante: \_\_\_\_\_

Para ser lido a todos os participantes e responsáveis legais pelos participantes menores de idade: As informações, a seguir, descreverão o estudo de pesquisas e o seu papel /de seu filho como participante. O entrevistador responderá quaisquer perguntas que você/seu filho possa ter sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e sinta-se à vontade para perguntar qualquer coisa sobre as informações fornecidas.

**Propósito do Estudo de Pesquisas:** Estamos realizando um estudo de pesquisas sobre leptospirose, comumente conhecida como "doença do rato". Nós estamos convidando você a participar de um estudo, que está sendo financiado e/ou realizado na Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde, Instituto Nacional da Saúde dos EUA (NIH-EUA), e Colégio de Medicina de Weill na Universidade de Cornell, porque você mora em um local onde muitas pessoas foram hospitalizadas com a forma grave dessa doença nos últimos 5 anos. Para compreender melhor o impacto da leptospirose na sua comunidade e em outras comunidades de Salvador, gostaríamos de determinar qual proporção de pessoas em sua vizinhança estão em risco de serem infectadas com leptospirose nos próximos 5 anos. Além disso, gostaríamos de saber que tipos de exposição levam as pessoas a tomarem-se infectadas. A maioria das pessoas que se infectam, desenvolvem uma forma leve da doença com febre, dor de cabeça e dores no corpo. Uma pequena proporção, entretanto, desenvolve a forma grave da doença com problemas como falência renal e hepática e hemorragia grave, necessitando de hospitalização. Por isso, precisamos compreender porque apenas uma fração daqueles que contraem leptospirose desenvolve a forma grave da doença. A informação que você pode fornecer irá ajudar na identificação de fontes ambientais de transmissão, que podem ser abordadas com medidas de controle de saúde pública. Além disso, essa informação auxiliará no desenvolvimento de novas intervenções contra leptospirose, tais como vacinas. Talvez, você não seja beneficiado diretamente pela sua participação nesse estudo.

**Procedimentos a serem seguidos:** Se você seu filho decidir, voluntariamente, participar desta pesquisa, após ter lido os termos do consentimento, o entrevistador fará perguntas a respeito de onde você/seu filho mora e onde você trabalha e sobre suas atividades em ambos os locais durante o último ano. Além disso, precisamos coletar uma amostra de sangue sua/seu filho. Um técnico de laboratório treinado tirará 10 mililitros (1 colher de sobremesa) de sangue. Você pode sentir pouca dor, pode aparecer uma mancha roxa, ou mais raramente, uma infecção pode aparecer no local onde o sangue foi coletado, mas este risco será reduzido ao mínimo porque um profissional treinado vai coletar o sangue. São necessários três a quatro meses para completar os testes na amostra de sangue. Durante os próximos cinco anos, planejamos visitar você/seu filho uma vez por ano, no total 5 visitas, a fim de fazer a mesma entrevista e coletar a mesma quantidade de sangue. A análise laboratorial de suas amostras de sangue indicará se você foi infectado com leptospirose durante o período entre as avaliações anuais. Providenciaremos os resultados dessas análises para suas fichas pessoais. Pois que as avaliações determinam se tivesse uma infecção preta e não uma infecção ativa, um resultado positivo não indica que você precisa ser avaliado receber tratamento para leptospirose.

**Confidencialidade:** Suas respostas durante a entrevista e os resultados dos exames de sangue serão confidenciais. Apenas você seu filho, os investigadores do grupo de estudo, os Comitês de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde e do Hospital Presbiteriano de Nova Iorque (EUA); o Instituto Nacional de Saúde dos EUA; o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos EUA; e o Escritório de Proteção a Pesquisas com Seres Humanos (EUA) terão acesso

Estas informações. Você/seu filho não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante do estudo.

**Participação Voluntária:** Sua participação ou a de seu filho neste estudo é voluntária. Você/seu filho pode recusar-se a participar ou pode descontinuar a participação a qualquer momento durante a visita inicial ou qualquer das visitas seguintes do estudo, se você/seu filho assim decidir. Também, o equipe de estudo pode optar terminar sua participação durante ou no fim do estudo e você/seu filho sera avisado no caso dessa ocorrência. Durante a entrevista, o entrevistador pode perguntar questões que você/seu filho acha que não são próprias e não quiser responder. Se quiser, você tem o direito de recusar responder-las. Se você/seu filho recusar-se participar de todo ou de parte deste estudo os cuidados médicos presentes ou futuros não serão afetados ou prejudicará sua relações presentes ou futuras com a Fundação Oswaldo Cruz ou outras instituições de saúde na cidade de Salvador. Você/seu filho não será responsável por nenhuma despesa, incluindo as análises laboratoriais de suas amostras de sangue, associada com este estudo. Você/seu filho não receberá compensação financeira para sua participação no estudo. Você/seu filho receberá uma cópia deste termo de consentimento.

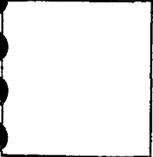
**Grupo de Contato:** Se você/seu filho tiver quaisquer questões futuras sobre sua participação ou a de seu filho, este estudo, ou sobre seus direitos ou os de seu filho como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com Dr. Ítalo Sherlock, Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 356-4320 ou com o Comitê de Direitos Humanos em Pesquisas do Hospital Presbiteriano de Nova Iorque nos Estados Unidos (tel: 001-212-821-0577).

Consentimento: Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram devidamente respondidas. Sendo assim, eu voluntariamente, concordo em participar do estudo:

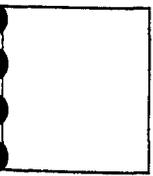
\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante do estudo

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

  
Impressão Digital do Participante do Estudo

Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo que o paciente do qual sou responsável legal, participe deste estudo:

  
Impressão Digital dos Pais ou Responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura dos Pais ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

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

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

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

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

ESTUDO PROSPECTIVO DA HISTORIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA-L16  
L16IND.QES

I. IDENTIFICACAO			
1.No Domicilio	{CASANO16}	####	
2.Individuo	{SOROA16}	#	1=CONSENTIU 2=RECUSOU 3=NAO ENCONTRADO 4=MUDOU-SE 5=FALECEU 6=MENTALMENTE INCAPAZ 7=EXCLUIDO 9=NS
3.Data entrevista	{DATA16}	<dd/mm/yyyy>	
II. DADOS DEMOGRAFICOS			
1.Data nascimento	{DATNAS}	<dd/mm/yyyy>	
2.Idade	{AGE16}	###	999=NS 0=Menor 12 meses
3.Sexo	{SEX16}	#	0=F, 1=M
4.Nome {NOME}			
5.Zona	{Z}	##	99=NS
6.Setor	{S}	#	9=NS
7.Tempo moradia anos	{MC16}	##	00=Menos de 1 ano, 99=NS
7.1.Tempo moradia meses	{MCM16}	##	00=Menos de 1 mes 88=Mas de 12 meses 99=NS
8.No Pessoas morando	{PESS16}	##	
9.Pode ler frase padrao?	{FRASE16}	#	0=Nao 1=Indeterminado 2=Sim 8=Menor de 7 anos
10. Serie de estudo	{SERIE16}	#	5=Nao estudo 4=1o grau incompleto 3=1o grau completo 2=2o grau incompleto 1=2o grau completo 0=Universidade 9=NS
11.Raca	{RACA16}	#	0=Branco 1=Pardo 2=Negro 3=Outra 9=NS
12.Renda			
12.1 Renda pessoal	{REND16}	####	REAIS
12.2 Renda total	{TREND16}	####	REAIS
III. HISTORIA DE DOENCA PREVIA			
1.Febre alta ultimo ano?	{FEBA16}	#	0=Nao, 1=Sim,

1.2 Teve atendimento medico?	{PAP016}	#	
Se sim,			
1.3 Local do atendimento	{LOCAL}:		
1.4 Quantas vezes	{QVPO16}	##	
1.5 Diagnostico:	{FBDX16}		
<hr/>			
2. Leptospirose no pasado?	{ANTES16}	#	0=Nao, 1=Sim, 9=NS
Se sim,			
2.1 Ano?:	{ANTESQ16}	####	
2.2 Hospitalizado?	{ANTHO16}	#	
2.3 Nome hospital:	{ANTNH16}		
<hr/>			
3. Alguem na casa com leptospirosis?	{CAANT16}	#	0=Nao, 1=Sim, 9=NS
Se sim,			
3.1 Ano:	{CAANTQ16}	####	
IV. OCUPACAO			
1. Trabalha ou trabalho ultimo ano?	{TRAB16}	#	0=Nao, 1=Sim, 8=NSA
Se sim,			
1.1 Trabalho formal ou informal?	{TRFORMAL16}	#	1=Formal 2=Informal 3=Ambos 8=NSA
Se nao,			
1.2 Classifique:	{SEMTRAB16}	#	1=Estudante 2=Dona de casa 3=Desempregado 4=Aposentado 8=NSA
2. Se trabalha ou trabalhou ultimo ano, profissao:			
2.1. Trabalha com esgoto	{PRESG16}	#	0=Nao, 1=Sim, 8=NSA
2.2. Pedreiro	{PEDR16}	#	
2.3. Vendedor ambulante	{VAMB16}	#	
2.4. Gari	{GARI16}	#	
2.5. Mecanico, chapista ou maquinas	{MECAN16}	#	
2.6. Outras profissoes	{PROUTR16}	#	
3. Tempo de trabalho ultimo ano:			
3.1. Se mais que um mes, meses?	{QMESES16}	##	0=Menos de 1 mes 88=NSA 99=NS
3.2. Se menos que um mes, semanas?	{QSEM16}	#	0=Menos de 1 semana 8=NSA 9=NS
4. Horas dia trabalha ou trabalhou?	{TH16}	##	horas
5. Dias por semana trabalha ou trabalhou?	{TD16}	##	dias
6. Trabalha em Pau da Lima?	{TRBAI16}	#	0=Nao, 1=Sim, 8=NSA

V. EXPOSICOES

Teve contato

1. Com lama

1.1 Peridomicilio? {CLAMD16} # 0=Nao, 1=Sim  
8=NSA, 9=NS

1.2 No trabalho? {CLAMT16} #

1.3 Na rua? {CLAMR16} #

2.2 No trabalho?	{CLXT16}	#
2.3 Na rua?	{CLXR16}	#
3.Com agua de alagamento na epoca de chuva		
3.1 Peridomicilio?	{CAALAD16}	#
3.2 No trabalho?	{CAALAT16}	#
3.3 Na rua	{CAALAR16}	#
4.Com agua de esgoto		
4.1 Peridomicilio?	{CAESGD16}	#
4.2 No trabalho?	{CAESGT16}	#
4.3 Na rua	{CAESGR16}	#
5.Com agua nao potavel		
5.1 Peridomicilio?	{CAALAD16}	#
5.2 No trabalho?	{CAALAT16}	#
5.3 Na rua?	{CAALAR16}	#
6.Normalmente, sua rua alaga?	{ALARUA16}	#
7.Normalmente, sua casa alaga?	{ALACA16}	#
8.Na epoca de chuva desentope o esgoto da rua?	{ESGRUA16}	#

VI. RESERVATORIOS

1.Cachorro em casa?	{CACH16}	#	0=Nao, 1=Sim 8=NSA, 9=NS
2.Gato em casa?	{GAT16}	#	
3.Cria galinhas?	{GALC16}	#	
4.Ve ratos			
4.1 Peridomicilio?	{RATD16}	#	
4.2 No trabalho?	{RATT16}	#	
5.No ratos que viu de uma vez			
5.1 Peridomicilio?	{RD16}	##	
5.2 No trabalho?	{RT16}	##	
6. Ve ratos durante dia			
6.1 Peridomicilio?	{QRATD16}	#	
6.2 No trabalho?	{QRATT16}	#	

VII. Pressao Arterial

Sistolica	{PA1S}	###	888=Menor 18 anos
Diastolica	{PA1D}	###	999=NFF

VIII. RENDA POR INDIVIDUO

1IND16	####
2IND16	####
3IND16	####
4IND16	####
5IND16	####
6IND16	####
7IND16	####
8IND16	####
9IND16	####
10IND16	####
11IND16	####
12IND16	####
13IND16	####





IV - História de Leptospirose (0= não, 1=sim, 8=não se aplica, 9= não sabe)

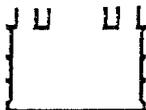
1. O Sr(a) já teve leptospirose ou a "doença do rato"?            {ANTES17}        
 Se Sim: 1.1      Ano:            {ANTESQ17}   
 1.2 O Sr(a) foi hospitalizado?            {ANTHO17}        
 1.3 Nome do hospital: \_\_\_\_\_      {ANTNH17} \_\_\_\_\_
2. Alguém em sua casa teve leptospirose antes?            {CAANT17}        
 Se Sim: 2.1 Quem? \_\_\_\_\_  
 2.2 Ano:            {CAANTQ17}

V - História de dengue III - (0= não, 1=sim, 8=não se aplica, 9= não sabe)

1. O Sr(a) já teve dengue ?            {DEN17}        
 1.1. Se Sim: Quantas vezes:            {XDEN17}

Episódio	Ano	Foi ao médico	Em que local?	Qual o diagnóstico?	
A	_____	S N	_____	_____	{ADEN17A} <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> {ADEN17B} <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> {ADEN17C} <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> {DENMED17A} <input type="checkbox"/> {DENMED17B} <input type="checkbox"/> {DENMED17C} <input type="checkbox"/>
B	_____	S N	_____	_____	
C	_____	S N	_____	_____	{LOCDEN17A} <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> {LOCDEN17B} <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> {LOCDEN17C} <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> {DXDEN17A} <input type="checkbox"/> {DXDEN17B} <input type="checkbox"/> {DXDEN17C} <input type="checkbox"/>

2. O Sr(a) foi vacinado contra febre amarela?            {VAC17}        
 2.1. Se sim, em que ano?            {AVAC17}   
 2.2. Visto cartão de vacina?            {FA17}



FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

## PARECER Nº 06/2002

---

Protocolo : 89

Projeto de Pesquisa: "História Natural da Leptospirose Humana"

Pesquisador Responsável : Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Instituição ou Departamento: CPqGM/Fiocruz/LPBM

### Considerações:

Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas às pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador , Bahia, 11 de abril de 2002

Dr. Ítalo A. Sherlock  
Coordenador do  
CEP-CPqGM/FIOCRUZ



houver benefício real em incentivar ou estimular mudanças de costumes ou comportamentos, o protocolo de pesquisa deve incluir, sempre que possível, disposições para comunicar tal benefício às pessoas e/ou comunidades;

o) comunicar às autoridades sanitárias os resultados da pesquisa, sempre que os mesmos puderem contribuir para a melhoria das condições de saúde da coletividade, preservando, porém, a imagem e assegurando que os sujeitos da pesquisa não sejam estigmatizados ou percam a auto-estima;

p) assegurar aos sujeitos da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa;

q) assegurar aos sujeitos da pesquisa as condições de acompanhamento, tratamento ou de orientação, conforme o caso, nas pesquisas de rastreamento; demonstrar a preponderância de benefícios sobre riscos e custos.

Os questionamentos foram respondidos sendo o estudo aprovado

O pesquisador do projeto ora apresentado, também prestou esclarecimentos relativos às pendências identificadas no parecer citado, desatacando-se:

✓ haverá benefícios para a população e o serviço de saúde pública em face da disponibilização dos dados coletados e os resultados sorológicos;

✓ as informações coletadas são necessárias para desenhar e implementar medidas de intervenção na comunidade ( educação para a saúde e redução de fontes de exposição ambiental mediante a melhora da infra-estrutura sanitária;

✓ os indivíduos sintomáticos detectados serão para os postos de saúde e os exames sorológicos ( alguns disponíveis na FIOCRUZ ) serão realizados,

✓ a quimioprofilaxia seria complicada em face ao período de exposição da população ( 6-8 meses/ano);

✓ ressalta, por fim que as medidas educacionais serão as mais importantes como objetivo alvo para os pesquisadores que irão conduzir o estudo.

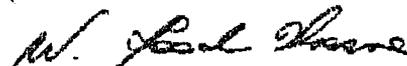
O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

As informações enviadas atendem, de modo geral, aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 e 292/99 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Entretanto, recomenda-se o CEP local avalie o conteúdo e a frequência das ações educacionais junto à comunidade estudada, sem as quais o projeto perde muito do seu sentido.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a recomendação explicitada no parágrafo acima

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 24 de abril de 2003



WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Jan and Sanford I. Weill  
Medical College

Institutional Review Board  
Mail: 1300 York Avenue, Box 5  
New York, NY 10021  
Office: 425 East 61st Street, DV-301  
New York, NY 10021

Phone: 212 821-0577, 0518  
Fax: 212 821-0580, 0660  
E-mail: irb@med.cornell.edu

Date: May 10, 2005

To: Albert Ko, M.D.

From: David A. Behrman, D.M.D., Chairman 

Re: Continuing Review - Protocol # 0402-247

Your protocol entitled "Natural History Of Urban Leptospirosis.", which was up for continuing review at the May 9, 2005 meeting of The Committee on Human Rights in Research (IRB #1) was approved by the Board for a period of 12 months (expiring May 8, 2006).

We enclose your consent form stamped accordingly.

Investigators must notify the NYPH/WMC IRB in writing within 5 working days of the occurrence of all SERIOUS and/or UNEXPECTED adverse events (AE's) in NYPH-WMC research subjects, whether or not the events are considered study related. In addition there may be reporting requirements of the study sponsor and/or regulatory agencies. The reporting requirements of the different bodies may differ both with regard to what events must be reported and the required timing of reports. You must acquaint yourself and abide by all reporting requirements applicable to this study. Provide the IRB with copies of all adverse event reports, which you submit, to the sponsor or to a regulatory agency.

The IRB office is in receipt of your HIPAA form(s). You will be receiving a disposition letter from the IRB Research Privacy Coordinator in the near future.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia

## **História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.**

### **Protocolo de Coleta de Sangue**

**Objetivo:** Disponibilizar o material necessário a uma coleta de sangue segura, minimizando os riscos de danos aos participantes.

Será realizada **APENAS** se o indivíduo referir febre por mais de dois dias, exceto para as cem coletas randomizadas.

**Responsáveis pela execução:** Ana Carla, Analéa e Ridalva

#### **Material Necessário:**

- \* caixa para coleta com dispositivo de segurança,
- \* galeria para tubos de coleta,
- \* garrote,
- \* bolas de algodão,
- \* álcool a 70%,
- \* tubos descartáveis para coleta sem E.D.T.A.,
- \* adaptador para agulha,
- \* agulhas descartáveis 21G para vacutainer,
- \* butterfly descartável número 23,
- \* seringas descartáveis de 10ml,
- \* agulhas 25x8,
- \* caneta para escrita em tubos,
- \* recipiente apropriado para descarte de material pérfuro-cortante.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

### Procedimento:

- solicitar que o indivíduo fique em posição confortável, preferencialmente sentado;
- explicar o procedimento, esclarecendo dúvidas;
- calçar luvas descartáveis;
- preparar a seringa ou vacutainer identificando os mesmos com etiquetas elaboradas de acordo com a seguinte padronização preestabelecida: código do estudo (L20), número do domicílio seguido de número do participante, zona e setor. Exemplo: L20-1503-01, Z=13, S=01 onde, L20 =código do estudo, 1503= número do domicílio, 01= número do participante, zona =13 e setor =01.
- para crianças menores de oito anos utilizar, preferencialmente, scalp ("butterfly");
- identificar veia a ser puncionada;
- garrotear o braço, tendo cuidado para não lesar o local;
- realizar antissepsia no local da punção;
- retirar capa da agulha;
- retrair a veia quatro centímetros antes do local da punção;
- puncionar a veia com agulha inicialmente a quarenta e cinco graus e depois paralela à pele, o bisel deve estar voltado para cima;
- retirar o garrote assim que o sangue começar a fluir,
- reposicionar cuidadosamente a agulha se o sangue estiver fluindo de forma lenta, caso não obtenha sucesso, retirar apenas com parte do tubo preenchida;
- coletar 10ml de sangue; é aceitável uma coleta mínima de 7ml (sangue) sendo 5ml (soro) para adultos e 4ml (sangue) sendo 2ml (soro) para crianças;
- não conseguindo-se coletar a quantidade satisfatória citada, deve-se tentar nova punção. Se esta também não for satisfatória, deve-se agendar retorno para outra punção;
- após punção com sucesso, solicitar que o paciente abra a mão do membro puncionado, se estiver fechada;



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

- retirar a agulha;
- pressionar levemente o local puncionado com algodão;
- solicitar que o indivíduo mantenha o algodão até que o local pare de apresentar sangramento;
- no caso da seringa, depositar o sangue coletado em tubo vacutainer;
- desprezar seringas e agulhas em recipiente com paredes rígidas; As agulhas devem ser introduzidas em recipiente próprio para descarte e NUNCA encapadas. As luvas e algodão devem ser descartads em saco para lixo hospitalar e desprezados na FIOCRUZ(LPBM);
- desprezar bolas de algodão em saco plástico para lixo hospitalar;
- guardar os tubos em galeria apropriada;
- retirar luvas;
- desprezar luvas e seus invólucros em saco plástico para lixo hospitalar;
- fechar caixa de coleta;
- explicar à família que primeiro serão coletadas amostras de toda a comunidade para então serem distribuídos os resultados.

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh e revisado por Albert Icksang Ko

## PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO E RECEPÇÃO DAS AMOSTRAS

Código: FIOCRUZ / GLP 026		Versão: 2	
Criado por:	<i>Balbino Lino dos Santos</i>	Modificado por:	
Data de criação:	Fevereiro, 05/2004	Última modificação:	
Aprovação e controle de qualidade: <b>Albert I. Ko</b>			

### I. Palavras chave:

Processamento  
Recepção  
amostras

### II. Propósito:

Centrifugar, aliquotar e armazenar as amostras de pacientes de Pau da Lima, e recepcionar estas amostras no LPBM – CPqGM, após seu processamento.

### III. Materiais:

- Luvas
- Amostras de soros
- Lista de etiquetas para eppendorfs
- Racks de tubos para armazenamento das amostras
- eppendorfs
- Freezer -20°C

### IV. Equipamentos:

- Centrífuga de alta rotação.

### V. Descrição das atividades 1 – Processamento

#### Confecção de etiquetas e identificação de Tubos Matrix e eppendorfs:

- Após a conferência das amostras recepcionadas no laboratório, a xerox da ficha de identificação dos pacientes que acompanha as amostras deverá ser enviada para o setor de epidemiologia, onde será feita a confecção e impressão das etiquetas. As etiquetas impressas serão enviadas ao laboratório, onde serão conferidas junto à ficha de identificação dos pacientes, para posteriormente usa-las na identificação dos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

- Identificar com as etiquetas de congelamento impressas 05 tubos Matrix® e 02 eppendorfs pequenos.

#### **Processamento dos Soros:**

- Centrifugar Amostras 1500rpm / 10 minutos.

- Organizar tubos, após centrifugados, em rack apropriada.

- Aliquotar soros, seguindo a ordem de organização dos tubos.

- Após aliquotagem, os soros aliquotados e os coágulos serão armazenados em freezer, segundo a descrição de congelamento abaixo.

## **VI. Descrição das atividades 2 – Congelamento de amostras**

- As amostras de soro aliquotadas nos tubos Matrix® de 1,4mL deverão ser organizadas em caixas de congelamento Matrix® específicas para os tubos, seguindo ordem de IDNO e data de coleta da lista de identificação de pacientes, e posteriormente armazenadas em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras de soro aliquotadas em tubos de 0,6mL deverão ser organizadas em caixas de congelamento, seguindo ordem de IDNO e data de coleta, e posteriormente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$  da seguinte forma:

a) 05 de 1,4mL p/ estocagem no Freezer à  $(-20^{\circ}\text{C})$ .

b) 01 de 0,6mL em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$  p/ realização de Testes Sorológicos (MAT e ELISA).

c) 01 de 0,6mL em freezer à  $-70^{\circ}\text{C}$  p/ realização de Testes de Biologia Molecular (PCR).

- Após completar a caixa de congelamento dos tubos Matrix e dos eppendorfs, fazer mapa das caixas em fichas específicas e arquivar.

- As fichas de identificação de pacientes deverá ter os campos correspondentes a data, horário de recepção e processamento, congelamento das amostras, nº da caixa, nº de alíquotas e nº do freezer na qual a amostra foi armazenada, preenchidos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia

**PROVA DE MICROAGLUTINACAO (MAT) PARA DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSE**  
**TITULAÇÃO**

Código: FIOCRUZ / GLP 0108		Versão: 1	
Criado por:	<i>Adriano Queiroz</i>	Modificado por:	
Data de criação:	Fevereiro, 20 / 2004	Última modificação:	
Aprovação e controle de qualidade: <b>Albert I. Ko</b>			

**0. Palavras chave:**

Microaglutinação  
*Leptospira*

**I. Raciocínio:**

O teste de Microaglutinação (MAT), é o teste sorológico básico para diagnóstico e classificação. Neste método, misturam-se iguais volumes de, diluições seriadas do soro e cultura de leptospiros, em microplacas ou em tubos de vidro. A mistura do soro e do antígeno reage por um período de uma hora e meia a 4 horas, em temperatura ambiente. Tipicamente a mistura pode ser incubada em estufa bacteriológica BOD a uma temperatura de 28 a 30°C. O resultado é obtido ao se estimar a proporção de Leptospiras aglutinadas com relação a de Leptospiras livres depois do período de incubação, o grau de aglutinação e o título final da aglutinação, "cut-off", são determinados por exame das amostras em microscópio de campo escuro. A leitura do teste é subjetivo e é feito pela determinação do número Leptospiras livres não aglutinadas. A idade e a densidade dos antígenos são outras variáveis que podem afetar a reprodutibilidade dos resultados. Antígenos derivados de culturas velhas e ou com altas concentrações de leptospiros, reduz a sensibilidade, o qual pode ser otimizado com antígenos com baixa densidade de leptospiros.

É recomendado que as culturas tenham entre 4 e 14 dias de repique em meio líquido, ter sido incubada entre 28 e 30°C e ter densidade de  $1-2 \times 10^8$  Leptospiras / ml. Os antígenos devem também estar livre de contaminantes e "conglomerados", resultado de auto-aglutinação entre as Leptospiras. A densidade é determinada por comparação a uma escala de McFarland, que tem turvações equivalentes as diluições a que as culturas devem ser submetidas para que a cultura tenha uma concentração referente a 0,5 da escala de McFarland.

A bateria a ser usada deve conter uma variedade de sorovares que é esperado estar presente no local de origem do soro. Cepas isoladas no local devem ser incluídas na bateria. Caso não seja conhecido o(s) sorovar(es) mais prevalente(s), é recomendado que seja usado uma bateria com os sorovares que são recomendados pela OMS. Não mais que um sorovar representante de cada sorogrupo precisa ser incluído.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia

Nesta etapa (titulação), todos os soros que foram positivos na triagem (soros que tiveram 2 ou 3 cruces de aglutinação), serão titulados, com o objetivo de determinar qual o título máximo de anticorpos contra *Leptospira* o soro apresenta. Em síntese, o soro será diluído de forma seriada e na razão de 2, 1:100, 1:200, 1:400, (...) 1:51200, e misturado com iguais volumes dos antígenos contra os quais eles foram positivos na triagem. As diluições são consideradas positivas enquanto tiverem duas cruces de aglutinação.

Em geral, sangue para sorologia deve ser colhido tão logo que possível. Uma segunda amostra deve ser colhida 3-4 semanas após a infecção, já que os testes podem ser negativos nas fases iniciais da doença. O caso suspeito será confirmado de acordo com os critérios:

**Critério 1** – Título único igual ou superior a 1:800

**Critério 2** – Havendo soros pareados, se tiver soro-conversão ou aumento do título de 4x entre o soro agudo e o soro convalescente.

O diagnóstico laboratorial deverá ser sempre acompanhado da clínica do paciente, juntos pode-se interpretar com mais segurança se o paciente está ou não com Leptospirose.

## II. Propósito:

Titular todos os soros que foram positivos na triagem, diluindo-os na razão de 2 a partir da diluição inicial de 1:100 até 1:51.200.

## III. Materiais:

- Luvas
- Laminas de vidro novas e lavadas
- Lâminulas de vidro novas
- Pipetas Pasteur de vidro novas de 25cm, lavadas e autoclavadas.
- Pipetas sorológicas descartáveis de 5 ou 10ml
- Pipetas automáticas P100, P200 e P1000
- Pipeta automática multi-canal
- Ponteiras amarelas estéreis com capacidade 20 a 200ul
- Ponteiras azuis estéreis com capacidade 200 a 1000ul
- Canaletas para pipetas multi-canal.
- Câmara de Petroff-Housser
- Tubos de vidro sem rosca de 12ml para diluir o soro e a cultura.
- Filtros Swinnex
- Membrana Millipore de 0,22 $\mu$ m e 25 mm de diâmetro
- Seringa de 10ml para filtrar os soros previamente diluídos
- Microplacas de ELISA de 96 poços com fundo chato.
- Alça de platina adaptada para fazer pequenas bolinhas na hora da leitura da microaglutinação
- Álcool a 70% para assepsia
- Hipoclorito de sódio a 5% para descarte dos materiais contaminados

## IV. Reagentes:

- Meio líquido EMJH de *Leptospira*
- PBS 1x



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

- Uma bateria de culturas da OMS selecionadas como antígenos
- Soros testes

#### V. Equipamentos:

- Microscópio de campo escuro adaptado com objetiva de 10x, 20x, 40x
- Fluxo laminar para manipulação das culturas e distribuição dos meios
- Estufa bacteriológica BOD de 28°C a 30°C para incubação das culturas e da microplaca.
- Microcentrífuga de alta rotação.

#### VI. Recomendações acerca de materiais, reagentes e equipamentos

- **A manipulação das culturas e das soluções previamente estéreis devem ser feitas de forma asséptica no fluxo laminar para evitar o risco de contaminações.**

#### VII. Descrição das atividades 1 – Preparo dos soros

1. Selecionar os soros a serem testados que são os positivos na triagem.
2. Deixar descongelar naturalmente
3. Centrifugar em 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C
4. Identificar os tubos com os números dos pacientes
5. Colocar 1,96 ml de PBS 1x (1ml com pipeta de 10ml e 0,96 ml com pipeta automática P1000)
6. Colocar 40  $\mu$ l do soro com pipeta automática P100, dando uma diluição inicial de 1:50.
7. Filtrar os soros contaminados (turvos) em swinnex com membrana Millipore de 0,22  $\mu$ m de poro e 25m de diâmetro, a fim de eliminar detritos e contaminantes que possam interferir na leitura da aglutinação. Essa diluição deve ser usada no mesmo dia em que foi preparada.

#### VIII. Recomendações à cerca do procedimento 1

- A filtração dos soros só se faz necessária se o soro estiver visivelmente contaminado, ou seja, bem turvo.
- A filtração é procedida acoplando o swinnex já com o filtro, na seringa de 10 ml, e passando o soro já diluído pelo sistema acima descrito.

#### IX. Descrição das atividades 2 – Distribuição dos soros na placa

1. Fazer a identificação das placas de microaglutinação (placas Falcon, 96 poços, fundo chato, com tampa), indicando verticalmente os números dos soros em análise e número correspondente ao antígeno aglutinados na triagem (Anexo 1).
2. Na primeira fileira vertical da placa colocar 100  $\mu$ l (0,10 ml) da diluição inicial 1:50 do respectivo soro;
3. Colocar 50 $\mu$ l de PBS nos 10 poços seguidos da placa com auxílio de uma pipeta multicanal;
4. Ainda com a pipeta multicanal, transferir 50  $\mu$ l da diluição inicial do soro de 1:50 pra os poços seguintes, homogeneizando 5 vezes vagarosamente para não formar espuma, até atingir a diluição final de 1:51.200, desprezando os 50  $\mu$ l finais;



## X. Recomendações à cerca do procedimento 2

- Com relação ao item 4, a diluição é feita de forma seriada, ou seja, com a mesma pipeta deve-se transferir 50 µl do soro anterior para o PBS da placa e homogeneizar, seguindo desta mesma forma para os poços seguintes.

## XI. Descrição das atividades 3 – Distribuição dos antígenos na placa

**Nota:** O preparo do antígeno está descrito no protocolo **GLP 0106**

1. Colocar cada um dos antígenos previamente diluídos (ver protocolo GLP 0106) em canaletas para pipetas multicanal, previamente identificadas.
2. Com a pipeta multicanal, adicionar horizontalmente a todas as diluições, 50 µl do antígeno a ser testado (anexo 1).
3. Agitar as placas com movimentos circulares por aproximadamente 15 segundos.
4. Incubar por 2 horas em estufa bacteriológica BOD à temperatura de 28 a 30°C.

## XII. Descrição das atividades 4 - Leitura do teste

1. Com alça bacteriológica apropriada, colher uma alçada de todas as diluições dos soros testados para cada antígeno e colocar em uma lâmina limpa.
2. Analisar ao microscópio de campo escuro, condensador a seco, objetiva de 10X, até qual título ocorre a presença de aglutinação de 50% das Leptospiras (2++), e anotar na tabela, a mesma utilizada na triagem (anexo 2).
3. Após a leitura desprezar imediatamente as placas e as lâminas em solução de Hipoclorito de sódio.

## XIII. Recomendações à cerca do procedimento 4

- O resultado é anotado em tabelas específicas (modelo de tabela – anexo 2);
- Nesta etapa é conveniente que duas pessoas trabalhem, uma na preparação das amostras na lâmina e outra na leitura a fim de acelerar esta fase do processo, para que não haja grande diferença de tempo entre a primeira e a última amostra (o tempo de leitura não deve ultrapassar uma hora).
- Controles da reação:

**Controle positivo:** deve-se incluir um soro positivo (pool de soros positivos), de preferência para mais de um sorovar, em todas as reações e o mesmo de ser processado da mesma forma que as amostras.

**Controle negativo interno ou “sem soro”:** para cada cepa de Leptospira, utiliza-se 50 µl de PBS + 50 µl do antígeno.

**Controle negativo:** deve-se incluir um soro negativo, em todas as reações e o mesmo de ser processado da mesma forma que as amostras.



**XIII. Responsáveis**

Técnicos que cuidam e dão manutenção às culturas de *Leptospiras*.

**XIV. Anexos**

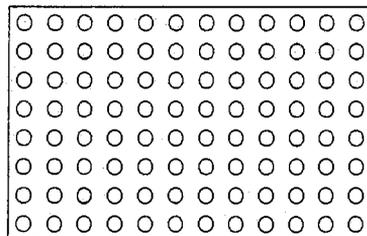
Anexo	Nome	Código
1	Figura ilustrativa da disposição e distribuição dos soros e dos antígenos na placa de microaglutinação	Não se aplica
2	Tabela modelo para anotação dos resultados da leitura	Não se aplica

**XV. Referências**

Nome	Código
Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control	WHO, ISBN 92 4 154589 5 P. 1, 15, 51.
Faine, S. 1982. Guidelines for the Control of Leptospirosis.	WHO offset publication no. 67. Geneva, Switzerland.
Levett Paul N. Leptospirosis.	Clinical Microbiology Reviews. Apr. 2001. p. 296-326.

**Anexo 1**

1 2 3 4 5



→ Disposição dos antígenos 50 µl

↑  
Disposição dos soros 100 µl





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

### PROVA DE MICROAGULUTINACAO (MAT) PARA SOROPREVALÊNCIA

Código: FIOCRUZ / GLP 0109		Versão: 1	
Criado por:	<i>Adriano Queiroz</i>	Modificado por:	
Data de criação:	Fevereiro, 26 / 2004	Última modificação:	
Aprovação e controle de qualidade: Albert I. Ko			

#### 0. Palavras chave:

Microaglutinação

*Leptospira*

Soroprevalência

#### I. Raciocínio:

O teste de Microaglutinação (MAT), é o teste sorológico básico para diagnóstico e classificação. Neste método, misturam-se iguais volumes de, diluições seriadas do soro e cultura de leptospiros, em microplacas ou em tubos de vidro. A mistura do soro e do antígeno reage por um período de uma hora e meia a 4 horas, em temperatura ambiente. Tipicamente a mistura pode ser incubada em estufa bacteriológica BOD a uma temperatura de 28 a 30°C. O resultado é obtido ao se estimar a proporção de Leptospiros aglutinadas com relação a de Leptospiros livres depois do período de incubação, o grau de aglutinação e o título final da aglutinação, "cut-off", são determinados por exame das amostras em microscópio de campo escuro. A leitura do teste é subjetivo e é feito pela determinação do número Leptospiros livres não aglutinadas. A idade e a densidade dos antígenos são outras variáveis que podem afetar a reprodutibilidade dos resultados. Antígenos derivados de culturas velhas e ou com altas concentrações de leptospiros, reduz a sensibilidade, o qual pode ser otimizado com antígenos com baixa densidade de leptospiros.

É recomendado que a culturas tenham entre 4 e 14 dias de repique em meio líquido, ter sido incubada entre 28 e 30°C e ter densidade de  $1-2 \times 10^8$  Leptospiros / ml. Os antígenos devem também estar livres de contaminantes e "conglomerados", resultado de auto-aglutinação entre as Leptospiros. A densidade é determinada por comparação a uma escala de McFarland, que tem turvações equivalentes as diluições a que as culturas devem ser submetidas para ter uma densidade referente a 0,5 da escala de McFarland.

A bateria a ser usada deve conter uma variedade de sorovares que é esperado estar presente no local de origem do soro. Cepas isoladas no local devem ser incluídas na bateria. Caso não seja conhecido o(s) sorovar(es) mais prevalente(s), é recomendado que seja usado uma bateria com os sorovares que são recomendados pela OMS. Não mais que um sorovar representante de cada sorogrupo precisa ser incluído.

Em estudos da comunidade as pessoas cujos soros são coletados não são casos clínicos, sendo portanto pessoas saudáveis. Em estudos de soroprevalência, a MAT serve de instrumento para detectar exposições recentes, casos incidentes, ou exposições antigas, casos prevalentes, de pessoas que, embora nunca tenham tido Leptospirose, podem ter sido exposta ao agente etiológico da doença, levando-a a desenvolver anticorpos, na maioria das vezes, com títulos inferiores a 1:100.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

A leitura se dá baseado na quantidade de Leptospiras livres em comparação com as que estão aglutinadas, que por sua vez é estimada em cruces, sendo: +++ quando 100% das leptospiras estão aglutinadas; ++ quando 50% das leptospiras estão aglutinadas; + quando menos que 50% das leptospiras estão aglutinadas. Serão considerados as aglutinações iguais ou superiores a ++.

## II. Propósito:

Fazer uma triagem inicial dos soros coletados na comunidade, testando de início os títulos 1:25, 1:50 e 1:100.

## III. Materiais:

- Luvas
- Laminas de vidro novas e lavadas
- Lamínulas de vidro novas
- Pipetas Pasteur de vidro novas de 25cm, lavadas e autoclavadas.
- Pipetas sorológicas descartáveis de 5 ou 10ml
- Pipetas automáticas P100, P200 e P1000
- Pipeta automática multi-canal
- Ponteiras amarelas estéreis com capacidade 20 a 200ul
- Ponteiras azuis estéreis com capacidade 200 a 1000ul
- Canaletas para pipetas multi-canal.
- Câmara de Petroff-Housser
- Tubos de vidro sem rosca de 12ml para diluir o soro e a cultura.
- Filtros Swinnex
- Membrana Millipore de 0,22 $\mu$ m e 25 mm de diâmetro
- Seringa de 10ml para filtrar os soros previamente diluídos
- Microplacas de ELISA de 96 poços com fundo chato.
- Alça de platina adaptada para fazer pequenas bolinhas na hora da leitura da microaglutinação
- Álcool a 70% para assepsia
- Hipoclorito de sódio a 5% para descarte dos materiais contaminados

## IV. Reagentes:

- Meio líquido EMJH de *Leptospira*
- PBS 1x
- Uma bateria de culturas da OMS selecionadas como antígenos
- Soros testes

## V. Equipamentos:

- Microscópio de campo escuro adaptado com objetiva de 10x, 20x, 40x
- Fluxo laminar para manipulação das culturas e distribuição dos meios
- Estufa bacteriológica BOD de 28°C a 30°C para incubação das culturas e da microplaca.
- Microcentrífuga de alta rotação.

## VI. Recomendações acerca de materiais, reagentes e equipamentos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

- A manipulação das culturas e das soluções previamente estéreis devem ser feitas de forma asséptica no fluxo laminar para evitar o risco de contaminações.

#### VII. Descrição das atividades 1 – Preparo dos soros

8. Selecionar os soros a serem testados que são os positivos na triagem.
9. Deixar descongelar naturalmente
10. Centrifugar em 12000 rpm por 10 minutos a 4°C
11. Identificar os tubos com os números dos pacientes
12. Colocar 1,84 ml de PBS 1x (1ml com pipeta de 10ml e 0,84 ml com pipeta automática P1000)
13. Colocar 160  $\mu$ l do soro com pipeta automática P100, dando uma diluição inicial de 1:12,5.
14. Filtrar os soros contaminados (turvos) em swinnex com membrana Millipore de 0,22  $\mu$ m de poro e 25m de diâmetro, afim de eliminar detritos e contaminantes que possam interferir na leitura da aglutinação. Essa diluição deve ser usada no mesmo dia em que foi preparada.

#### VIII. Recomendações à cerca do procedimento 1

- A filtração dos soros só se faz necessária se o soro estiver visivelmente contaminado, ou seja, bem turvo.
- A filtração é procedida acoplado o swinnex já com o filtro, na seringa de 10 ml, e passando o soro já diluído pelo sistema acima descrito.

#### IX. Descrição das atividades 2 – Distribuição dos soros na placa

5. Fazer a identificação das placas de microaglutinação (placas Falcon, 96 poços, fundo chato, com tampa), indicando horizontalmente os números dos soros em análise (4 soros por placa), e verticalmente o número correspondente ao antígeno a ser testado (Anexo 1).
6. Na primeira fileira vertical de cada "coluna" de 3 da placa, colocar 100  $\mu$ l (0,10 ml) da diluição inicial 1:12,5 do respectivo soro;
7. Colocar 50 $\mu$ l de PBS nos 2 poços seguidos de cada "coluna" com auxílio de uma pipeta multicanal;
8. Ainda com a pipeta multicanal, transferir 50  $\mu$ l da diluição inicial do soro de 1:12,5 para os 2 poços seguintes, homogeneizando 5 vezes vagarosamente para não formar espuma, até atingir a diluição final de 1:50, desprezando os 50  $\mu$ l finais;

#### X. Recomendações à cerca do procedimento 2

- Com relação ao item 4, a diluição é feita de forma seriada, ou seja, com a mesma pipeta deve-se transferir 50  $\mu$ l do soro anterior para o PBS da placa e homogeneizar, seguindo desta mesma forma para os poços seguintes.
- Para cada placa serão testados 4 soros, sendo que cada soro vai utilizar três fileiras verticais da placa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia

## XI. Descrição das atividades 3 – Distribuição dos antígenos na placa

Nota: O preparo do antígeno está descrito no protocolo **GLP 0106**

5. Colocar cada um dos antígenos previamente diluídos (ver protocolo GLP 0106) em canaletas para pipetas multicanal, previamente identificadas.
6. Com a pipeta multicanal, adicionar horizontalmente a todas as diluições, 50  $\mu$ l do antígeno a ser testado (anexo 1).
7. Agitar as placas com movimentos circulares por aproximadamente 15 segundos.
8. Incubar por 2 horas em estufa bacteriológica BOD à temperatura de 28 a 30°C.

## XII. Descrição das atividades 4 - Leitura do teste

4. Com alça bacteriológica apropriada, colher uma alçada de todas as diluições dos soros testados para cada antígeno e colocar em uma lâmina limpa.
5. Analisar ao microscópio de campo escuro, condensador a seco, objetiva de 10X, até qual título ocorre a presença de aglutinação de 50% das Leptospiras (2++), e anotar na tabela (Anexo 2)
6. Após a leitura desprezar imediatamente as placas e as lâminas em solução de Hipoclorito de sódio.
7. Os soros que apresentarem títulos de 1:100 devem ser titulados seguindo a descrição do protocolo **GLP 0108**.

## XIII. Recomendações à cerca do procedimento 4

- O resultado é anotado em tabelas específicas (modelo de tabela – anexo 2);
- Nesta etapa é conveniente que duas pessoas trabalhem, uma na preparação das amostras na lâmina e outra na leitura a fim de acelerar esta fase do processo, para que não haja grande diferença de tempo entre a primeira e a última amostra (o tempo de leitura não deve ultrapassar uma hora).

### • Controles da reação:

**Controle positivo:** deve-se incluir um soro positivo (pool de soros positivos), de preferência para mais de um sorovar, em todas as reações e o mesmo de ser processado da mesma forma que as amostras.

**Controle negativo interno ou “sem soro”:** para cada cepa de Leptospira, utiliza-se 50  $\mu$ l de PBS + 50  $\mu$ l do antígeno.

**Controle negativo:** deve-se incluir um soro negativo, em todas as reações e o mesmo de ser processado da mesma forma que as amostras.

## XIII. Responsáveis

Técnicos que cuidam e dão manutenção às culturas de *Leptospiras*.

## XIV. Anexos



Ministério da Saúde

Fiocruz  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Projeto:** História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

Anexo	Nome	Código
1	Figura ilustrativa da disposição e distribuição dos soros e dos antígenos na placa de microaglutinação	Não se aplica
2	Tabela modelo para anotação dos resultados da leitura	Não se aplica

### XV. Referências

Nome	Código
Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control	WHO, ISBN 92 4 154589 5 P. 1, 15, 51.
Faine, S. 1982. Guidelines for the Control of Leptospirosis.	WHO offset publication no. 67. Geneva, Switzerland.
Levett Paul N. Leptospirosis.	Clinical Microbiology Reviews. Apr. 2001. p. 296-326.

### Anexo 1

