



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

**TRANSMISSÃO PERI-DOMICILIAR E FATORES DE
RISCO PARA AQUISIÇÃO DE LEPTOSPIROSE DURANTE
EPIDEMIAS URBANAS EM SALVADOR, BAHIA**

ELVES ANDERSON PIRES MACIEL

Salvador - Bahia - Brasil

2003

5.22(813.8)



002222

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

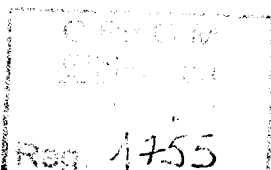
Transmissão Peri-domiciliar e Fatores de Risco para Aquisição de
Leptospirose Durante Epidemias Urbanas em Salvador, Bahia.

Mestrando: ELVES ANDERSON PIRES MACIEL

Professor Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Patologia
Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil
2003



Ficha Catalográfica*

M138r Maciel, Elves Anderson Pires
Transmissão Peri – domiciliar e fatores de risco para aquisição de leptospirose durante epidemias urbanas em Salvador, Bahia. / Elves Anderson Pires Maciel. _ Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2003. 85p.: 07ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal da Bahia, 2003.

1. Leptospirose. 2. Transmissão peri-domiciliar. 3. Epidemias urbanas. I. Título.

CDU 616.986.7: 616-036.22

*Elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ, Salvador-Bahia


16 13.7 - 13.7 (13,7)
13.7

TRANSMISSÃO PERI-DOMICILIAR E FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE
LEPTOSPIROSE DURANTE EPIDEMIAS URBANAS EM SALVADOR, BAHIA


ELVES ANDERSON PIRES MACIEL

FOLHA DE APROVAÇÃO

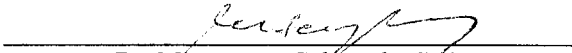
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Tavares Neto
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Edson Duarte Moreira Jr.
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

ÍNDICE

I – Lista de Ilustrações	vii
II – Resumo	viii
III - Abstract	ix
IV – Revisão da Literatura	1
4.1-Aspectos Históricos	1
4.2-Bacteriologia e Biologia	2
4.3-Patologia e Patogênese	6
4.4- Características Clínicas	10
4.5- Epidemiologia	15
V - Objetivos	21
5.1-Objetivo Geral	21
5.2-Objetivos Específicos	21
VI - Racional e Relevância	22
VII – Resultados	24
VIIa - Artigo	24
VIIb – Resultados Adicionais	39

VIII - Discussão	43
IX – Conclusões	46
X - Referências Bibliográficas	47
XI – Anexo I. Termo de Consentimento	68
10.1- Termo de consentimento para adultos	68
10.2- Termo de consentimento para menores	70
XII-Anexo II. Questionário	71
XIII- Anexo III. Instruções para autores do Journal of Infectious Diseases	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Microscopia de varredura de *L. interrogans* 4
- Figura 2.** Modelo esquemático dos aspectos microscópicos da *L. interrogans* 4
- Figura 3.** Distribuição mensal de casos graves de leptospirose identificados durante a vigilância hospitalar, em Salvador, e média mensal de chuvas, entre março de 1996 e março de 2001. 18
- Figura 4.** Prevalência de infecção prévia por leptospira, por grupo de estudo, agrupados por título recíproco no MAT utilizado como ponto de corte, para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia. 39
- Figura 5.** Prevalência de infecção prévia por leptospira, estratificada por sexo e faixa etária, para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia. 40
- Tabela 1.** Fatores sócio-demaográficos e exposições peri-domiciliares como fatores de risco potenciais para infecção prévia por leptospira (título recíproco no MAT ≥ 25) para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia. 41
- Tabela 2.** Exposições ocupacionais como fatores de risco potenciais para infecção prévia por leptospira (título recíproco no MAT ≥ 25) para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia. 42

AGRADECIMENTOS

- A Dra. Isadora Siqueira, esposa e companheira científica/profissional.
- Aos Orientadores Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Dr. Albert Icksang Ko pelo desenvolvimento científico e intelectual proporcionado.
- Ao Dr. Brendan Flannery pelas críticas e sugestões para as análises do artigo.
- Aos colegas e à coordenação do curso de Mestrado em Patologia do CPqGM-FIOCRUZ, e, em especial a Sra. Rosália Oliveira.
- A Dra. Marilda Gonçalves, pesquisadora do LPBM-CPqGM-FIOCRUZ, pela amizade constante e a orientação durante minha iniciação científica neste centro.
- A bibliotecária Advane de Araújo Boa Morte pela elaboração da ficha catalográfica.
- Ao Sr. Amaro Nunes, motorista do CPqGM-Ficruz, pela amizade e por me levar até os participantes deste estudo, na maioria das moradores de locais de difícil acesso.
- A médica veterinária Simone Nascimento e a estudante de iniciação científica Ana Luiza Carvalho pela colaboração em todas as fases deste projeto.
- A Fapesb, pela concessão de bolsa de mestrado no ano de 2002.

II. RESUMO

TRANSMISSÃO PERI-DOMICILIAR E FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE LEPTOSPIROSE DURANTE EPIDEMIAS URBANAS EM SALVADOR, BAHIA. ELVES ANDERSON PIRES MACIEL. INTRODUÇÃO - A leptospirose é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Estima-se que apenas 10% dos casos clínicos evoluam para formas graves. Tradicionalmente, a leptospirose é considerada uma doença esporádica associada com fatores de risco profissionais e atividades recreacionais, porém, no Brasil, epidemias urbanas anuais tem emergido. Nesse cenário, fatores de risco para leptospirose, associados ao trabalho e ao ambiente peri-domiciliar foram identificados. OBJETIVOS - 1-Avaliar a exposição prévia a leptospirose patogênicas, no nível comunitário, e investigar fatores de risco para infecção prévia por leptospira; 2-Determinar a existência de transmissão peri-domiciliar da leptospirose, no cenário das epidemias urbanas. MÉTODOS: Um estudo de caso-controle comparando a taxa de infecção prévia por leptospira (título recíproco no MAT ≥ 25) entre contactantes domiciliares de casos graves de leptospirose e indivíduos vizinhos controle. RESULTADOS - Foi observada uma elevada prevalência de infecção prévia na população deste estudo, 10%. Além disso, mulheres e crianças na comunidade são expostos a leptospirose, diferindo dos casos graves, em que mais de 80% são homens adultos, não sendo conhecidos os fatores determinantes desta discrepância. A comparação da taxa de infecção prévia por leptospira (título recíproco no MAT ≥ 25) nos contactantes domiciliares de um caso índice de leptospirose grave e contactantes domiciliares de indivíduos controle sadios mostrou que entre 63 contactantes domiciliares de 20 casos índice e 182 indivíduos controle vizinhos, de 52 domicílios, 27% (17) e 4% (7) apresentaram evidência sorológica para uma infecção por *Leptospira* (OR ajustado 8.38, 95% CI 2,68-26,25). CONCLUSÕES - Foi observada uma elevada prevalência (7,5%) de infecção prévia por leptospira na população estudada. Mulheres e crianças são expostos igualmente, na comunidade. Fatores de risco ocupacionais e associados ao ambiente peri-domiciliar foram identificados. Contactantes de casos índice tiveram mais que 5 vezes o risco de uma infecção prévia do que seus vizinhos controle, indicando a importância da transmissão no ambiente peri-domiciliar.

Palavras-chave: Leptospirose; Transmissão peri-domiciliar; Epidemias Urbanas.

III. ABSTRACT

PERI-DOMICILIARY TRANSMISSION AND RISK FACTORS FOR LEPTOSPIROSIS ACQUISITION DURING URBAN EPIDEMICS IN SALVADOR, BAHIA ELVES ANDERSON PIRES MACIEL INTRODUCTION - Leptospirosis is caused by eight species of pathogenic espirochetes of the genus *Leptospira*. Only 10% of clinical leptospirosis evolves to sever forms, leading to underestimate of the impact of disease. Leptospirosis is considered traditionally a sporadic disease associated with occupational and recreational risk factors and settings, however, in Brazil, annual urban epidemics have emerged. In this setting, work as well peri-domiciliary related risk factors for leptospirosis were identified. **OBJECTIVES** – 1-Evaluate previous exposition to pathogenic *Leptospiras* in community, and investigate risk factor for previous leptospira infection; 2-Determine the occurrence of peri-domiciliary transmission of leptospirosis, in the setting of urban epidemics. **METHODS**: A case-control study comparing the rate of previous leptospira infection (MAT reciprocal title ≥ 25) in household contacts of severe leptospirosis index cases and neighborhood control individuals. **RESULTS** – Was observed a high seroprevalence of 10% for previous infection in the community. In addition, women e children in the community are exposed, differing of severe leptospirosis, for which more than 80% are adult men, not been identified the determinants of this discrepancy. The comparison of the rate of previous infection for leptospira (MAT reciprocal title ≥ 25) in household contacts of severe leptospirosis index cases and household contacts of healthy control individuals, showed that, among 63 household contacts of 20 index cases and 182 neighborhood control individuals from 52 households, 27% (17) and 4% (7) had serological evidence for a prior leptospira infection (adjusted OR 8.03, 95% CI 2.44-26.39). **CONCLUSIONS** – Was observer a high (7.5%) prevalence of previous leptospira infection in study population. Women and children are exposed equally in community. Occupational and peri-domiciliary risk factors were identified. Index control contacts had a risk to previous infection 5 times more high than yours neighborhood controls, indicating the significance of transmission in peri-domiciliray environment.

Key-words: Leptospirosis; Peri-domiciliary transmission; Urban epidemics.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Aspectos Históricos

As primeiras descrições de síndromes febris ictéricas compatíveis com leptospirose estão presentes nos relatos de Hipócrates, no entanto apenas no ano de 1886, a síndrome de icterícia associada a falência renal e fenômenos hemorrágicos foi reconhecida como uma entidade clínica distinta por Adolf Weil (Faine *et al.*, 1999).

A identificação do agente causal só ocorreu vários anos após a descrição da doença, provavelmente devido a necessidade de meios de cultura específicos e ao crescimento lento das espiroquetas, fazendo com que estas figurem entre as últimas formas bacterianas a serem reconhecidas como patógenos (Faine *et al.*, 1999). Apenas em 1907, usando a técnica de Levaditi, que havia recentemente sido descrita para coloração de espiroquetas em tecido, Stimson identificou o que ele denominou de *Spirochaeta interrogans*, devido às extremidades em forma de gancho, no rim de paciente que se acreditava ter falecido por febre amarela (Stimson, 1907). Esse engano fez com que Inada *et al.* fossem por muitos anos reconhecidos como os descobridores do agente causal da doença de Weil, pois mostraram a capacidade patogênica para “guinea pig” do organismo que isolaram em 1914 e denominaram “*Epirochaeta icterohaemorrhagiae*” (Faine *et al.*, 1999; Kobayashi, 2001).

O mesmo grupo de pesquisa japonês, liderado por Inada, identificou o papel do rato como reservatório da *Leptospira*. Essa descoberta permitiu, nos anos posteriores, a compreensão dos princípios epidemiológicos da transmissão, além da identificação de vários reservatórios animais, tanto domésticos quanto silvestres, e finalmente o entendimento da leptospirose como uma zoonose de ampla distribuição (Faine *et al.*, 1999).

O mesmo grupo de pesquisa japonês foi o primeiro a cultivar com sucesso leptospiras e a cepa isolada em 1914 de paciente com doença de Weil foi designada Ictero No. I (ATCC 43782), sendo atualmente a cepa de referência do gênero *Leptospira* (Kobayashi, 2001).

Por fim, um fato importante foi a passagem do Dr. Nogushi pela Bahia na década de 20 (Fróes, 1924), onde veio para comprovar a etiologia da febre amarela pela *Leptospira icteroides*, a qual tinha isolado em pacientes supostamente com febre amarela (*Typhus amarill*) em Guayaquil, Equador. Provavelmente, devido à apresentações clínica semelhante e com as limitadas ferramentas diagnósticas disponíveis à época, casos de doença de Weil foram confundidos com febre amarela, explicando o engano cometido (Faine *et al.*, 1999). No entanto, o Dr. Nogushi fez excelentes descrições dos aspectos microscópicos da *Leptospira*, os quais são válidos até os dias atuais (Faine *et al.*, 1999).

4.2. Bacteriologia e Biologia

A família Leptospiraceae pertence à ordem Spirochaetales e, atualmente, é dividida em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneria* (Faine *et al.*, 1999). Tradicionalmente, o gênero *Leptospira* tem sido classificado em duas espécies, *L. interrogans* e *L. biflexa*, contendo as cepas patogênicas e saprófitas, respectivamente (Faine, 1982). A diferenciação fenotípica é baseada na capacidade da *L. biflexa* crescer a 13°C e na presença de 8-azaguanina (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Além disso, a *L. interrogans* é classificada em mais de 200 sorovares com base nas diferenças antigênicas do lipopolissacarídeo (LPS), e, esses por sua vez, são agrupados em 24 sorogrupos de acordo com as semelhanças antigênicas compartilhadas pelos sorovares (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Nesse sistema de classificação, a unidade taxonômica básica é o

sorovar, o qual, de acordo com a revisão de 2002 para nomenclatura dos sorovares de *Leptospira* pelo “Committee on the Taxonomy of *Leptospira* of the International Union of Microbiological Societies”, deve ser escrito não italicizado e com a primeira letra maiúscula, por exemplo: *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (International Leptospirosis Society). Essa classificação tem sido útil para fins epidemiológicos, uma vez que determinados sorovares parecem adaptados a determinados reservatórios, por exemplo, *L. interrogans* serovar copenhageni infecta preferencialmente ratos, enquanto *L. interrogans* serovar canicola, os cães. (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999; Plank & Dean, 2000; Levett, 2001; Vinetz, 2001).

Inicialmente proposta por Yasuda *et al.* (1987), a classificação genotípica baseada na hibridização do DNA (ácido desoxirribonucléico) propõe atualmente a existência de 17 genomoespécies de *Leptospira* (Brenner *et al.*, 1999; Levett, 2001; Vinetz, 2001). Em adição, um estudo da estrutura genética do gênero *Leptospira*, usando “multilocus enzyme electrophoresis” (MEE), confirmou a classificação genotípica discriminando entre espécies patogênicas e saprofíticas, além de individualizar um terceiro grupo de espécies fenotipicamente intermediárias (*L. inadai* e *L. fainei*) (Letocart *et al.*, 1999). Porém, não existe uma correlação estrita entre as espécies definidas geneticamente e os sorovares ou sorogrupos, podendo um mesmo sorovar ou sorogrupo pertencer a espécies distintas (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Por causa da deficiência de concordância com a classificação fenotípica, já amplamente utilizada, e por estar disponível atualmente apenas em laboratórios de pesquisa, a classificação genotípica, apesar de taxonomicamente sólida, ainda não assumiu importância para clínicos e epidemiologistas (Faine *et al.*, 1999; Plank & Dean, 2000; Levett, 2001; Vinetz, 2001). No entanto, novas metodologias de tipagem molecular, como exemplificado pela identificação de 11 genomoespécies e 16 sorogrupos

de *Leptospira* com um ensaio de PCR (reação em cadeia da polimerase) baseado em um único “primer” dirigido para um novo elemento repetitivo identificado em *L. interrogans* sorovar Copenhageni (iRep) (Barocchi *et al.*, 2001), estão sendo desenvolvidas e eventualmente podem tornar-se padrão em laboratórios de referência (Vinetz, 2001).

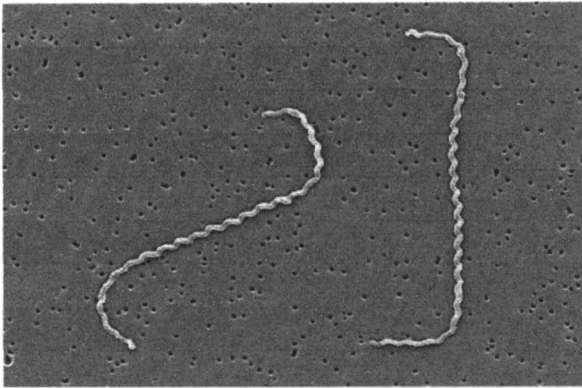


Figura 1. Microscopia de varredura de *L. interrogans* (fonte: CDC, Atlanta, USA)

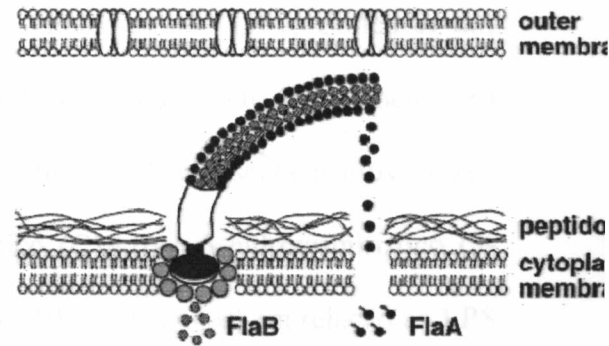


Figura 2. Modelo esquemático dos aspectos microscópicos da superfície de *Leptospira* (fonte: (Charon & Goldstein, 2002)

Morfologicamente, as leptospiros são altamente espiraladas, com extremidades em forma de gancho, possuindo diâmetro de 0,1 μm e comprimento de 6-20 μm (Figura 1). A ultra-estrutura é composta por uma membrana plasmática, uma parede celular composta de peptidoglicano justaposta à membrana plasmática, de maneira semelhante às bactérias Gram-positivas e diferindo das Gram-negativas, e, mais externamente, uma membrana externa (figura 2) (Zuerner *et al.*, 2000; Charon & Goldstein, 2002). Entre a membrana externa e a parede celular, existe um espaço periplasmático, onde localizam-se os dois flagelos da bactéria, os quais tornam-na extremamente móvel. A estrutura do flagelo é similar àquela de outras bactérias Gram-negativas, cada um tendo origem em uma das extremidades da

bactéria e dirigindo-se em direção ao centro da mesma por aproximadamente 0,18 nm (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Charon & Goldstein, 2002).

Na membrana externa da bactéria, localizam-se o lipopolissacarídeo (LPS), o qual não é encontrado em outras espiroquetas como *Treponema pallidum* (Fraser *et al.*, 1998) e *Borrelia burgdorferi* (Fraser *et al.*, 1997), e várias proteínas da membrana externa (OMPs), que presumivelmente têm importância na virulência (Faine *et al.*, 1999; Cullen *et al.*, 2002). O LPS da leptospira apresenta um componente KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctônico) similar ao de bactérias Gram-negativas, enquanto o lipídeo A apresenta ácidos graxos pentadecanóicos em substituição aos ácidos mirístico (C14:0) e 3-hidroxi-mirístico (3-OH-C14:0), o que poderia explicar a baixa toxicidade (10 vezes menor) em relação ao LPS de outros Gram-negativos (Faine *et al.*, 1999; Zuerner *et al.*, 2000; Werts *et al.*, 2001). No entanto, o LPS é o principal componente antigênico da superfície da leptospira (Faine *et al.*, 1999). Entre as OMPs caracterizadas até o momento, estão a OMPL1, provavelmente uma porina, e várias lipoproteínas (LipL32, LipL41, etc.) (Haake *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2002). A combinação de OMPL1 e LipL41 mostraram imunoproteção sinérgica no modelo experimental do hamster (Haake *et al.*, 1999).

Do ponto de vista metabólico, as leptospiros são organismos aeróbios ou microaerófilos, que crescem bem entre 28 a 30°C. Como fonte energética utilizam apenas a β oxidação dos ácidos graxos, o que explica a necessidade de meios contendo lipídios para o seu crescimento em cultura (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

O genoma da leptospira possui aproximadamente 5.000 kb, apresentando dois cromossomas, um com 4.400 kb e outro com 350 kb (Zuerner, 1991). Até o momento, a impossibilidade de manipular geneticamente leptospiros patogênicos, uma vez que não são

conhecidos mecanismos de transferência horizontal de material genético, tem dificultado o estudo dos mecanismos patogênicos e a identificação de fatores de virulência (Zuerner *et al.*, 2000; Cabello *et al.*, 2001). Porém, o sequenciamento completo do genoma da *Leptospira interrogans* sorovar Lai pelos chineses (Ren *et al.*, 2003), abre novas perspectivas para o estudo da biologia da leptospira.

4.3. Patologia e Patogênese

A patogênese da leptospirose não é bem conhecida, apesar do bom entendimento das alterações patológicas determinadas pela leptospirose no homem e em animais experimentais.

Inicialmente, as leptospirosas penetram as barreiras epiteliais do hospedeiro, principalmente pele lesada e mucosa, e via vasos linfáticos atingem a corrente sanguínea, de onde disseminam rapidamente para vários órgãos e tecidos. Inicialmente, as leptospirosas são encontradas no pulmão, depois no fígado e baço, locais onde se multiplicam de maneira exponencial (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Após caírem na corrente sanguínea, leptospirosas patogênicas, diferindo das não patogênicas, são capazes de escapar da destruição mediada pelos mecanismos imunes inatos do hospedeiro (Faine, 1964; Marangoni *et al.*, 2000). Após esses estágios iniciais da infecção, as leptospirosas patogênicas sobrevivem nos túbulos renais aderidas às células epiteliais tubulares, local onde estão protegidas dos ataques do sistema imune do hospedeiro, sendo essa capacidade da bactéria essencial para que possa ser disseminada no ambiente pelos animais reservatórios (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Os mecanismos que permitem a leptospira aderir e atravessar o epitélio não são conhecidos, porém, presume-se que sua motilidade e forma facilitem a invasão dos tecidos (Charon & Goldstein, 2002). Em modelos *in vitro*, leptospiros patogênicas são capazes de aderir e invadir células epiteliais, endoteliais e fagocíticas (Thomas & Higbie, 1990; Merien *et al.*, 1997), sendo um dos possíveis mediadores da adesão uma proteína de 36 kDa presente na membrana externa, a qual tem capacidade de ligar-se a fibronectina presente na superfície da célula hospedeira (Merien *et al.*, 2000). Utilizando o modelo de monocamada polarizada de células epiteliais MDCK, demonstrou-se a translocação dessa barreira epitelial, provavelmente por via transcelular, tanto por leptospiros não patogênicas quanto por patogênicas, no entanto, em maior proporção e de maneira mais rápida pelas últimas, sugerindo que a capacidade de atravessar rapidamente epitélios seja um fator de virulência (Barocchi *et al.*, 2002).

Como é um patógeno eminentemente extra-celular, a resposta imunológica mais importante é presumivelmente a humoral (Adler & Faine, 1977, 1978), sendo mecanismos efetores a lise mediada por complemento e a fagocitose facilitada por opsonização (Faine *et al.*, 1999). No entanto, um papel da imunidade celular não pode ser afastado, como sugerem outros autores (Naiman *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2002; Naiman *et al.*, 2002; De Fost *et al.*, 2003).

A alteração patológica básica da leptospirose é uma vasculite generalizada. Nos rins, pulmões e músculo esquelético, os vasos capilares apresentam alterações, como necrose de células endoteliais e alargamento de junções íntimas entre as células, as quais podem levar a aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de plasma, ou até células (De Brito *et al.*, 1979). Adicionalmente, vasos sanguíneos maiores, inclusive a aorta, apresentam alterações inflamatórias, tanto experimentalmente como em casos

necropsiados (De Brito *et al.*, 1987). Além disso, disfunção endotelial, sem expressão estrutural, pode ter conseqüências patológicas (Behrendt & Ganz, 2002), sendo um mecanismo patogênico inexplorado na leptospirose, porém plausível.

O fígado apresenta o clássico quadro histológico da leptospirose, caracterizado por destrabeculação de hepatócitos, com presença de discreto infiltrado mononuclear no espaço portal, sem necrose proeminente de hepatócitos (Arean, 1962; De Brito *et al.*, 1967; De Brito *et al.*, 1970). Também são observados corpúsculos de Councilman, e tem sido demonstrado a ocorrência de apoptose de hepatócitos na leptospirose experimental (Merien *et al.*, 1998).

Nos rins observa-se, principalmente, nefrite intersticial e necrose tubular aguda. A nefrite é focal e caracterizada por infiltrado de linfócitos, histiócitos, eosinófilos e raros plamócitos, com edema, dilatação e congestão endotelial. A necrose tubular aguda é mais proeminente nos túbulos proximais. Os glomérulos apresentam alterações discretas (Arean, 1962; De Brito *et al.*, 1966; Brito *et al.*, 1967).

Nos pulmões predominam congestão e hemorragia, com pouco infiltrado inflamatório. A hemorragia está presente no interstício e nos alvéolos, podendo ocorrer presença de membrana hialina (Arean, 1962; Silva *et al.*, 2002). Na microscopia eletrônica, as principais alterações estão presentes nas células endoteliais septais, que se apresentam edemaciadas e com aumento de vesículas pinocíticas, porém sem comprometimento das junções endoteliais (Nicodemo *et al.*, 1997).

Outros órgãos afetados de maneira importante são: o coração, em que se observa miocardite intersticial com infiltrado linfomonocitário focal; os músculos esqueléticos, em que se encontra necrose hialina de miócitos individuais com infiltrado histiocitário circunjacente (Arean, 1962; Levett, 2001).

Um fato que, de longa data, tem chamado a atenção de pesquisadores é relativa benignidade das alterações patológicas ou a presença em número reduzido de leptospiras nos tecidos, quando comparados com as alterações funcionais observadas. Isso tem levado a supor que toxinas da bactéria, ou produtos inflamatórios do hospedeiro sejam os principais responsáveis pelas alterações patológicas na leptospirose (Brito, 1968). Tem se demonstrado que o peptidoglican e a glicolipoproteína (GLP) da leptospira são capazes de induzir produção de TNF α (fator de necrose tumoral) *in vitro* (Cinco *et al.*, 1996; Diamant *et al.*, 2002). Além disso, níveis elevados de TNF α implicam em pior prognóstico na leptospirose humana (Tajiki & Salomao, 1996), indicando essa citocina como possível mediadora da patogênese da doença.

Uma outra evidência para tal hipótese, é que a GLP de leptospira, mais especificamente sua fração de ácidos graxos insaturados (Burth *et al.*, 1997), tem a capacidade de inibir a Na⁺, K⁺-ATPase, não só das células tubulares renais (Younes-Ibrahim *et al.*, 1995), como também de outros tecidos, como cérebro e músculo (Younes-Ibrahim *et al.*, 1997). Assim esse mecanismo pode contribuir para a perda de potássio pelos rins, bem como pelas arritmias cardíacas.

Finalmente, um estudo experimental demonstrou que a fração protéica de membrana externa de leptospiras patogênicas ativa o fator de transcrição NF- κ B, que por sua vez aumenta a expressão de iNOS (óxido nítrico sintetase induzível), MCP (proteína quimiotáctica para monócitos) e TNF α (Yang *et al.*, 2000), sugerindo algum papel na nefrite intersticial, característica do envolvimento renal na leptospirose. Mais recentemente, o mesmo grupo identificou LipL32 como a principal OMP envolvida na ativação da cascata inflamatória na nefrite intersticial da leptospirose (Yang *et al.*, 2002).

4.4. Características Clínicas.

Na espécie humana, a maioria das infecções evolui de forma leve ou assintomática, não sendo muitas vezes reconhecidas clinicamente (Ashford *et al.*, 2000). Uma menor proporção dos expostos, porém constituindo a maioria dos casos diagnosticados, apresenta doença de início abrupto caracterizada por febre, como único sintoma ou acompanhado por cefaléia e mialgia (Berman *et al.*, 1973; Levett, 2001). Entre os casos clínicos, assume-se que apenas 5 a 10% evoluem para a forma grave (Berman *et al.*, 1973), caracterizada por icterícia acompanhada de disfunção renal, fenômenos hemorrágicos, alterações cardíacas, hemodinâmicas, pulmonares e do nível da consciência (Edwards & Domm, 1960; Farr, 1995; Ko *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2001). A letalidade para as formas graves varia entre 5% e 40% (Levett, 2001), podendo ultrapassar 50% nos casos com síndrome de hemorragia pulmonar/síndrome da angustia respiratória aguda (SARA) (Marotto *et al.*, 1999).

O período de incubação para leptospirose é habitualmente de 7 a 12 dias, podendo variar entre 2 e 28 dias (Faine *et al.*, 1999). Comumente, o início da doença é abrupto, com febre, calafrios, cefaléia e mialgia acentuada, sendo mais intensa nas panturrilhas, às vezes impedindo a deambulação. Após essa fase inicial, de aproximadamente 3 a 7 dias, denominada fase septicêmica, uma vez que leptospiras podem ser isoladas do sangue e líquido, o paciente pode apresentar melhora clínica por 1 a 3 dias, para então iniciar a segunda fase da doença, a fase imune, em que aparecem anticorpos da classe IgM, não sendo mais possível isolar leptospiras do sangue. A fase imune dura de 4 a 30 dias, e a sintomatologia é semelhante a da fase septicêmica, porém mais branda. Neste período, é freqüente ocorrência de meningite linfomonocitária (Sperber & Schleupner, 1989). Após a

1ª semana de doença, freqüentemente, as leptospiras podem ser isoladas apenas da urina (Farr, 1995; Levett, 2001; Vinetz, 2001).

Classicamente, as formas clínicas da leptospirose tem sido diferenciadas pela presença de ictérica, considerando-se as formas ictéricas da doença como as formas graves e com potencial para letalidade (Edwards & Domm, 1960; Farr, 1995). No entanto, novas apresentações clínicas, como a síndrome de hemorragia pulmonar grave associada a leptospirose, podem surgir em pacientes sem icterícia (Goncalves *et al.*, 1992; Kuriakose *et al.*, 1997; Trevejo *et al.*, 1998).

A síndrome de meningite asséptica, característica da fase imune da leptospirose anictérica, apresenta-se como cefaléia e febre, e às vezes, alteração do estado mental (Sperber & Schleupner, 1989). A maioria (90%) dos pacientes apresenta alterações líquóricas, no entanto, apenas 50% são sintomáticos (Edwards & Domm, 1960). Por outro lado, no Brasil, estudos têm revelado que entre 7% e 39% de casos de meningite asséptica são causados por leptospira (Romero *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2002).

Diferindo da evolução descrita para leptospirose anictérica, pacientes com síndrome de Weil, após a fase inicial septicêmica, também presente na forma anictérica, evoluem com comprometimento hepático, renal e manifestações hemorrágicas, geralmente sem período de melhora interveniente (Farr, 1995; Levett, 2001).

A alteração hepática é evidenciada, sobretudo, pelo aumento dos níveis de bilirrubina (principalmente a fração conjugada), sem comprometimento marcante da função de síntese do fígado, observando-se leve elevação dos níveis das aminotransferases (geralmente menor que 500 U/L), e sem sinais de insuficiência hepatocelular (Edwards & Domm, 1960; Farr, 1995). A elevação dos níveis séricos da creatinofosfoquinase (CPK)

pode ajudar no diagnóstico diferencial entre leptospirose icterica de pacientes e hepatite aguda (Johnson *et al.*, 1975).

A insuficiência renal, diferindo da insuficiência renal aguda (IRA) de outras etiologias, apresenta-se principalmente na forma poliúrica e normocalêmica ou hipocalêmica (Abdulkader, 1997), provavelmente devido a uma disfunção tubular com baixa absorção do ion sódio no túbulo proximal e, conseqüente, perda de água e potássio no néfron distal, acompanhando passivamente o sódio (Seguro *et al.*, 1990; Abdulkader *et al.*, 1996). A oligúria, provavelmente é decorrente de hipovolemia, uma vez que responde a reposição volêmica e/ou administração de diuréticos em proporção significativa dos casos (Seguro *et al.*, 1990; Abdulkader, 1997). No entanto, a presença de oligúria está associada a pior prognóstico (Abdulkader, 1997; Levett, 2001). Classicamente, a diálise peritoneal tem sido o tratamento de escolha para a IRA na leptospirose (Edwards *et al.*, 1990), no entanto, ensaio clínico realizado recentemente no Vietnam, comparando diálise peritoneal *versus* hemofiltração, em 70 pacientes com IRA associada com infecções diversas, incluindo 8 casos de leptospirose, demonstrou a superioridade da última, diminuindo a letalidade, além de sugerir relação custo-benefício favorável (Phu *et al.*, 2002).

Sinais e sintomas pulmonares são observados com freqüência nos casos de leptospirose, variando entre 20 e 70%, sendo a maioria consideradas leves (O'neil *et al.*, 1991). No entanto, a síndrome de hemorragia pulmonar severa/síndrome da angustia respiratória aguda (SARA) chamou a atenção mundial pelo recente surto ocorrido na Nicarágua, sendo a principal manifestação clínica dos casos identificados, não estando associada a icterícia ou insuficiência renal (Trevejo *et al.*, 1998). Tal “mudança de padrão clínico” já havia sido detectada em epidemias ocorridas no Rio de Janeiro no final da década de 80 (De Carvalho *et al.*, 1992; Goncalves *et al.*, 1992). Os fatores que determinam

a evolução para hemorragia pulmonar/SARA não são conhecidos, existindo apenas um estudo que demonstrou associação independente entre tabagismo (mais do que 20 cigarros por dia) e a ocorrência de comprometimento pulmonar na leptospirose (Martinez Garcia *et al.*, 2000), talvez porque substâncias contidas no tabaco possam causar lesão da membrana alvéolo-capilar (Donaghy & Rees, 1983). Apesar do uso de ventilação mecânica invasiva, a letalidade na síndrome situa-se acima de 50% (Marotto *et al.*, 1999), sendo sugerido que o uso da abordagem ventilatória “protetora”, com pequenos volumes correntes e alta pressão expiratória final (PEEP) possa ser benéfica (Amato *et al.*, 1998; Bethlem & Carvalho, 2000).

Em consequência às mudanças dos padrões clínico-epidemiológicos e à maior disponibilidade e eficácia de métodos dialíticos, as complicações pulmonares, cardíacas e hemorrágicas estão se tornando as causas mais freqüentes de óbito na leptospirose, em substituição à insuficiência renal, mais freqüente no passado (Daher *et al.*, 1999; Marotto *et al.*, 1999; Yersin *et al.*, 2000).

O hemograma típico da leptospirose é representado por leucocitose, neutrofilia e desvio a esquerda, associados a anemia e plaquetopenia. No entanto, mais da metade dos pacientes em uma série, apresentavam contagem de leucócitos normal na admissão hospitalar, mantendo-se contudo a neutrofilia com desvio a esquerda na maioria dos casos (Nicodemo *et al.*, 1989). Os fatores de coagulação apresentam níveis séricos normais, exceto pela eventual diminuição do tempo de protrombina, não sendo observada síndrome de coagulação intravascular disseminada (Edwards *et al.*, 1986; Nicodemo *et al.*, 1990).

Leptospiras são sensíveis a vários antibióticos *in vitro* (Oie *et al.*, 1983), no entanto o papel da antibioticoterapia no tratamento da leptospirose humana não está definido (Guidugli *et al.*, 2000). A terapia com doxiciclina no início (primeiros 4 dias) da doença é

eficaz, encurtando o curso clínico (Mcclain *et al.*, 1984). Também a doxiciclina foi eficaz como profilático, diminuindo a ocorrência de infecções sintomáticas, quando utilizada por curto período, numa dosagem de 200mg por semana (Takafuji *et al.*, 1984; Sehgal *et al.*, 2000). Em um estudo conduzido em São Paulo, o uso de doxiciclina em dose única de 200mg após exposição de alto risco, diminuiu o número de casos sintomáticos, apesar de não ter atingido significância estatística, provavelmente pelo pequeno tamanho da amostra (Gonzalez *et al.*, 1998).

Por outro lado, a terapêutica específica nas fases avançadas da doença é controversa. Um ensaio clínico randomizado, comparando a eficácia de penicilina *versus* placebo, demonstrou menor duração da febre, normalização mais rápida dos níveis de creatinina sérica e menor tempo de hospitalização (Watt *et al.*, 1988), enquanto outro ensaio clínico não demonstrou um benefício clínico em pacientes na fase avançada (icterícia em 95,5% dos pacientes) da doença (Edwards *et al.*, 1988). Os dois estudos demonstraram prevenção da leptospirúria, no entanto os dois estudos não mostraram diminuição de letalidade, uma vez que o número de óbitos foi pequeno, não ocorrendo nenhum óbito no estudo de Watt (1988). Uma possível complicação da antibioticoterapia na leptospirose é a reação de Jarisch-Herxheimer (Vaughan *et al.*, 1994), caracterizada por deterioração clínica e quadro semelhante ao choque séptico, minutos a horas após o início da antibioticoterapia, sendo desencadeada provavelmente pela liberação de antígenos de leptospiros destruídas pela terapia, e mediada por TNF α (Friedland & Warrell, 1991; Emmanouilides *et al.*, 1994). Considerando a baixa frequência da reação de Jarisch-Herxheimer, o custo relativamente baixo do tratamento com penicilina e o potencial benefício, parece razoável administrar terapia com penicilina a todos os pacientes suspeitos de leptospirose grave.

O diagnóstico é dificultado pela apresentação clínica inespecífica da leptospirose nas fases iniciais, quando o uso de antibióticos teria maior efeito, sendo necessária confirmação laboratorial. No entanto, o teste padrão-ouro disponível, o MAT, necessita de amostras pareadas e, devido a dificuldades inerentes ao teste, só é realizado em laboratórios de referência (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999). Novos testes, como o ELISA IgM, baseado em antígeno bruto (Cumberland *et al.*, 1999) ou antígenos recombinantes (Flannery *et al.*, 2001) são mais sensíveis do que o MAT, mas ainda em nível insuficiente para ajudar nas decisões clínicas. Outros métodos diagnósticos, baseados na detecção de DNA de leptospira, como por exemplo o PCR, podem tornar-se positivos em fases mais precoces da doença, mas ainda não são disponíveis na prática clínica, estando limitados a laboratórios de pesquisa (Merien *et al.*, 1992; Merien *et al.*, 1995).

4.5. Epidemiologia.

A leptospirose é considerada a zoonose de mais ampla distribuição mundial, por causa da habilidade do patógeno em induzir o estado de portador-sadio em várias espécies de animais silvestres e domésticos (Levett, 2001). A transmissão pode ocorrer por contato direto com sangue, tecidos, órgãos ou urina de animais infectados ou, mais freqüentemente, por via indireta, através do contato com água ou solo contaminado com urina dos animais portadores-sadios. A importância de determinada espécie animal como reservatório varia de acordo com o padrão epidemiológico de transmissão, no entanto, o rato é considerado globalmente o reservatório mais importante (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999).

Os hospedeiros podem ser divididos em de manutenção e incidentais. Os hospedeiros de manutenção são aqueles capazes de carrear cronicamente leptospiras nos

túbulos renais, como por exemplo, *Rattus* sp. O homem é considerado hospedeiro incidental, uma vez que pode adquirir a infecção de vários outros hospedeiros, mas não se torna portador crônico, apesar de relatos esporádicos de transmissão inter-humana. Como mencionado previamente, o conhecimento dos sorovares prevalentes em determinada região é importante para a identificação dos reservatórios e, em consequência, a compreensão da epidemiologia da doença em dada região (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999). Habitualmente, os ratos são hospedeiros de manutenção para os sorogrupos Ballum e Icterohaemorrhagiae, e camundongos apenas para o Ballum. Em relação aos animais domésticos: bovinos albergam os sorovares Hardjo, Pomona e Grippotyphosa; porcos, carregam Tarassovi ou Bratislava; ovinos, Hardjo e Pomona; e cães, o sorovar Canicola (Levett, 2001).

Pela exposição a estes reservatórios ou ambiente contaminado pelos mesmos, várias categorias ocupacionais são reconhecidas como expostas a maior risco de infecção pela leptospira. Por exemplo, o contato direto com animais infectados constitui a maior fonte de infecção para fazendeiros, veterinários e açougueiros. Enquanto, o contato indireto é importante para trabalhadores da limpeza urbana, mineiros, soldados e plantadores de arroz (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Três padrões epidemiológicos foram definidos por Faine *et al.* (1999). O primeiro é aquele de climas temperados, onde a infecção ocorre por contato direto com animais infectados, em criações de porcos e gado. O segundo, de regiões tropicais, em que os principais reservatórios são os roedores, animais de criação e o cão, sendo a exposição humana decorrente da ampla contaminação ambiental, principalmente nas estações chuvosas. O terceiro acontece no ambiente urbano, sendo a infecção por leptospira

adquirida através de contato indireto, em ambiente contaminado por roedores, e determinada pela falta de infra-estrutura urbana.

Nos países desenvolvidos, a doença ocorre de forma esporádica e no ambiente rural, sendo adquirida principalmente no ambiente ocupacional (Ciceroni *et al.*, 2000; Holk *et al.*, 2000; Thornley *et al.*, 2002). Em países asiáticos, como Índia, Tailândia e China, tem predominado epidemias rurais associadas a períodos de alta intensidade pluviométrica (Kuriakose *et al.*, 1997; Tangkanakul *et al.*, 2000; Chaudhry *et al.*, 2002), com mais de 14.000 casos notificados no ano 2000 na Tailândia (Phraisuwan *et al.*, 2002).

Além disso, surtos associados com desastres naturais, como o ocorrido na Nicarágua em 1995, em seguida chuvas torrenciais e alagamentos, em que mais de 2000 casos de doença febril aguda foram avaliados, com 15 mortes atribuídas à síndrome de hemorragia pulmonar severa (Trevejo *et al.*, 1998), e surtos associados a esportes aquáticos, como triatlon, tem chamado a atenção mundial como novas formas de ocorrência da leptospirose (Haake *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2002).

No Brasil, os primeiros registros da leptospirose datam das décadas de 10 a 40, em São Paulo, Porto Alegre e Paraná (Correa, 1975). Subseqüentemente, surtos urbanos vêm sendo relatados nas grandes cidades brasileiras (Azevedo & Corrêa, 1968; Correa, 1975; Andrade & Brandao, 1987; Kupek *et al.*, 2000).

Na Bahia, os primeiros casos foram observados na década de 20, quando o Dr. Nogushi, tentando demonstrar a causa da febre amarela, isolou leptospiras do sangue de pacientes com síndrome de Weil, diagnosticados erroneamente como casos de febre amarela (Fróes, 1924). Nos anos 50, Andrade & Oliveira (1954) descreveram um caso fatal de síndrome de Weil, e demonstraram a presença de leptospiras em 20% dos *R. norvegicus* capturados na cidade de Salvador, sugerindo, já naquela época que a leptospirose fosse uma

doença sub-diagnosticada em nosso meio. Apenas na década de 70, os estudos conduzidos por Caldas e cols. (1978; 1979) demonstraram a ocorrência epidêmica da leptospirose em Salvador, descrevendo a apresentação clínica e sugerindo um papel adicional do cão como potencial reservatório.

Atualmente, em Salvador, as epidemias vêm se apresentando de forma sazonal, em surtos repetidos a cada ano, durante os períodos de maior intensidade pluviométrica, principalmente nos meses de abril a agosto (Figura 3), sendo responsáveis por cerca de 300 casos internados anualmente no Hospital Couto Maia (centro de referência para doenças infecciosas do Estado da Bahia).

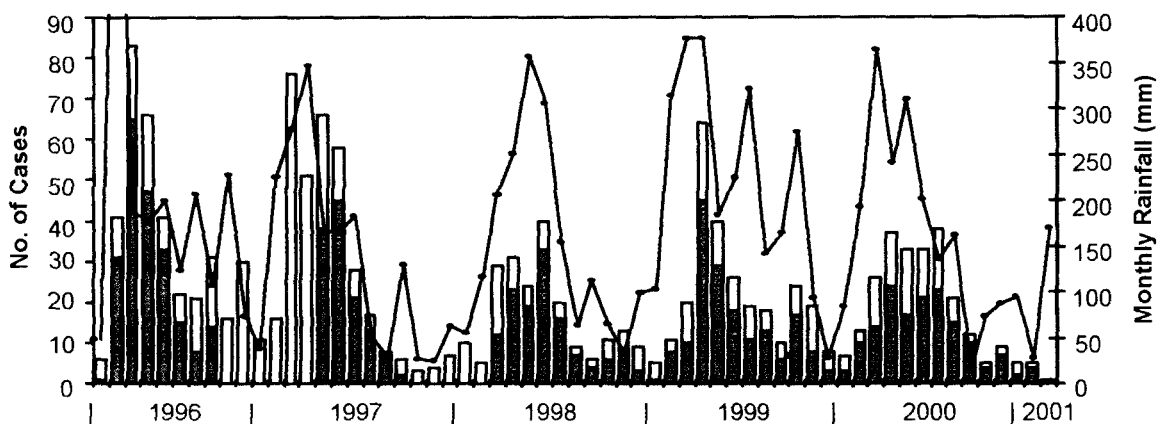


Figura 3. Distribuição mensal de casos graves de leptospirose identificados durante a vigilância hospitalar, em Salvador, e média mensal de chuvas, entre março de 1996 e março de 2001.

Em 1996, estudo de vigilância ativa no Hospital Couto Maia revelou que houve predominância do sexo masculino (80%) e de pessoas adultas (média de idade $35,9 \pm 15,2$ anos). A incidência de casos graves foi de 12,5 casos/100.000 habitantes e a média de dias de hospitalização foi de 10 dias, sendo a taxa de letalidade de 15%, ocorrendo 50% dos óbitos nas primeiras 48 horas de internação (Ko *et al.*, 1999).

Em Salvador, o agente etiológico responsável pelas epidemias urbanas foi a *L. interrogans* sorovar Copenhageni, uma vez que em 90% (173/190) dos casos confirmados laboratorialmente ou prováveis, os maiores títulos no MAT foram contra o sorogrupo icterohaemorrhagiae. Além disso, entre 15 isolados de *Leptospira* em cultura, 13 foram do sorogrupo icterohaemorrhagiae e 1 sorogrupo canicola, enquanto 1 não pode ter o sorogrupo determinado. Todos os isolados do sorogrupo icterohaemorrhagiae foram tipados como sorovar Copenhageni (Ko *et al.*, 1999).

Como o rato doméstico é um reservatório habitual de leptospirosas no ambiente urbano (Pereira & Andrade, 1988; Vinetz *et al.*, 1996), durante a epidemia de 1998 em Salvador, foi desenvolvido estudo para avaliar a taxa de portadores-sadios, entre ratos capturados dentro de um raio de 10 metros do peri-domicílio de indivíduos identificados como casos de leptospirose grave. Entre os 142 *Rattus norvegicus* capturados, 114 (80%) apresentaram cultura de urina ou rim positiva para *L. icterohaemorrhagiae* (Faria, 2000.). Todos os isolados foram do sorovar Copenhageni. Além disso, todos os isolados dos ratos apresentaram um único padrão de “fingerprint” no PCR, o qual foi idêntico ao padrão dos isolados dos pacientes com leptospirose severa (Ferrer, 2000), indicando que os ratos foram o reservatório da transmissão para humanos de um grupo clonal de cepas do sorovar Copenhageni na cidade do Salvador.

Em estudo caso-controle, conduzido subsequente durante a epidemia de 1998, identificou-se: a) moradia em proximidade a esgoto a céu aberto (“Odds ratio” pareado [OR] = 5,15, intervalo de confiança 95% [CI] = 1,80-14,74); b) observação de ratos no peri-domicílio (OR = 4,49, 95% CI = 1,57-12,83), c) observação de grupos de cinco ou mais ratos (OR = 3,90, 95% CI = 1,35-11,27) e d) exposição a ambiente contaminado no

local de trabalho (OR = 3,71, 95% CI = 1,35-10,17), como fatores de risco independentes para a aquisição de leptospirose (Sarkar *et al.*, 2002).

Esses dados sugerem que o ambiente peri-domiciliar, contaminado pela urina dos ratos infectados, seja um local importante para a transmissão da leptospirose durante as epidemias urbanas.

V. OBJETIVOS

5.1. Geral

1. Pesquisar exposição prévia a leptospirosas patogênicas, em nível comunitário, e investigar possíveis fatores de risco associados à infecção prévia por leptospira.

5.2. Específicos

1. Avaliar a prevalência de exposição a leptospirosas patogênicas em um estudo de soroprevalência nos domicílios selecionados de bairros da cidade de Salvador com alta incidência de casos de leptospirose grave;
2. Estimar o risco de transmissão peri-domiciliar da leptospirose, pela comparação taxa de infecção prévia nos contactantes dos casos índices de leptospirose grave em relação aos membros dos domicílios controles vizinhos; e
3. Determinar, através de análise tipo caso-controle, fatores associados com infecção prévia por leptospirosas patogênicas.

VI. RACIONAL E RELEVÂNCIA

Em estudo de vigilância hospitalar, conduzido em Salvador durante a epidemia de 1996, a incidência de casos graves de leptospirose foi de 12,5 casos/100.000 e taxa de letalidade foi de 15%, ocorrendo 50% dos óbitos nas primeiras 48 horas de internação (Ko *et al.*, 1999). Estes dados mostram que, devido à rapidez da ocorrência dos óbitos após a internação, qualquer medida terapêutica teria pouco impacto na mortalidade, indicando que as intervenções precisam ser focalizadas em prevenção.

Apesar do maior impacto da leptospirose ser decorrente das formas graves, as quais estão associadas a letalidade e morbidade elevadas (Ko *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2001), estima-se que apenas 10 a 15% dos casos clínicos evoluam para formas graves (Berman *et al.*, 1973; Faine *et al.*, 1999). Além disso, dados de soroprevalência provenientes de diversos países apontam para uma proporção ainda maior de infecções assintomáticas e sub-clínicas (Everard *et al.*, 1985; Everard *et al.*, 1990; Childs *et al.*, 1992; Faine *et al.*, 1999; Ashford *et al.*, 2000; Levett, 2001; Laras *et al.*, 2002). Portanto, o impacto da leptospirose urbana, detectado através da vigilância hospitalar para casos graves, deve estar sendo sub-estimado.

Em contraposição aos padrões epidemiológicos tradicionais da leptospirose, considerada zoonose do ambiente rural e aquisição ocupacional (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001), no Brasil, a doença caracteriza-se pela ocorrência de epidemias nas grandes cidades, durante períodos chuvosos (Caldas *et al.*, 1978; Caldas & Sampaio, 1979; Andrade & Brandao, 1987; Gonzalez *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1999; Kupek, 2000; Barcellos & Sabroza, 2001). Nesse ambiente de epidemias urbanas, um estudo tipo caso-controle, realizado em Salvador, demonstrou associação independente entre presença de roedores e de esgotos

abertos no ambiente peri-domiciliar e o risco de aquisição de leptospirose (Sarkar *et al.*, 2002), apontando este ambiente como um dos locais de transmissão da leptospirose no ambiente urbano. Por isso, torna-se prioritária a determinação da importância do ambiente peri-domiciliar na transmissão da doença, para que possam ser identificadas medidas preventivas e para qual ambiente tais medidas devem ser dirigidas.

VII. RESULTADOS

VII.a. ARTIGO

Household Transmission of Leptospirosis During Urban Epidemics in Brazil. Elves A. P. Maciel, Ana Luiza F. Carvalho, Rosan Barbosa, Simone F. Nascimento, Mitermayer G. dos Reis, Albert I. Ko. (Artigo em preparação, a ser submetido ao Journal of Infectious Diseases [*vide* normas de publicação no anexo III])

Household Transmission of Leptospirosis During Urban Epidemics in Brazil.

Running title: Household transmission of leptospirosis.

Elves A. P. Maciel¹, Ana Luiza F. Carvalho¹, Rosan Barbosa¹, Simone F. Nascimento¹,
Mitermayer G. dos Reis¹, Albert I. Ko^{1,2}.

¹Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil and ²Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA

FOOTNOTES

1 This manuscript has been presented in part during the 3rd Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society in Barbados, October 28-30, 2002.

2 Informed consent was obtained from patients or their guardians and the guidelines of the Brazilian Ministry of Health, the New York Presbyterian Hospital and the US Department of Health and Human Services were followed in the conduct of the research with human subjects.

3 This work was supported by funding from the Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health (0250.250.102); the Brazilian National Research Council (52.1229/98-7 and 350.052/95-6, 300.861/96-6 and FINEP 4196086200); the Fogarty International Center; NIH, USA (Public Health Service Grants AI-01605, TW-00905 and TW-00919).

4 First author: Dr. Elves Maciel; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; Fundação Oswaldo Cruz/MS, Rua Waldemar Falcão, 121; Salvador, Bahia 40295-001; Brazil. Telephone: (55 71) 356-4320 ext 285. Fax: (55 71) 356-2155. e-mail: emaciel@cpqgm.fiocruz.br.

5 Reprints or correspondence: Dr. Albert Ko; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; Fundação Oswaldo Cruz/MS, Rua Waldemar Falcão, 121; Salvador, Bahia 40295-001; Brazil. Telephone: (55 71) 356-4320 ext 243. Fax: (55 71) 356-2155. e-mail: aik2001@med.cornell.edu.

Abstract

Leptospirosis is traditionally considered a sporadic disease associated with occupational and recreational risk factors and settings, however, in Brazil, annual urban epidemics have emerged. In this setting, work as well as peri-domiciliary related risk factors for leptospirosis acquisition were identified. To test the hypothesis of peri-domiciliary transmission, we conducted a case-control study comparing the rate of previous *Leptospira* infection (MAT reciprocal title ≥ 25) in household contacts of severe leptospirosis index cases and neighborhood control individuals. Among 63 household

contacts of 20 index cases and 182 neighborhood control subjects from 52 households, 27% (17) and 4% (7) had serological evidence for a prior *Leptospira* infection (adjusted OR 8.38, 95% CI 2.68-26.25). Contacts of index cases had more than 8 times the risk of a prior infection than their neighborhood controls, indicating the importance of the transmission in the peri-domiciliary setting.

Keywords: leptospirosis, epidemics, household transmission, epidemiology.

Introduction

Leptospirosis, a disease caused by pathogenic spirochetes of genus *Leptospira*, is considered the most widespread zoonosis in the world due to the pathogen's ability to induce a carrier state in a wide range of wild and domestic animals [1]. Transmission to humans occurs by direct contact with infected animals or, more frequently, by contact with environment contaminated with their urine. Leptospirosis has been traditionally a rural-based disease, associated with occupational activities [2]. However, recent outbreaks associated with recreational and sport activities [3] and natural disasters [4], demonstrate the potential of leptospirosis to cause disease in new settings. The epidemiological pattern of rodent-borne urban leptospirosis, has been considered less important [2], and occurs as a sporadic disease in US homeless population [5], or associated with emergencies, such as earthquakes and war, in developing countries [2].

Urban epidemics of leptospirosis, transmitted by rats in a setting of urban poverty and infrastructural deficiencies, has emerged [6, 7]. In Brazil alone, more than 10,000 cases of leptospirosis with a case fatality rate of 10% are reported annually to Ministry of

Health [8]. These epidemics are associated with severe clinical forms of leptospirosis, for which the case fatality rate is higher than 10%. In addition, new clinical syndromes, such as the leptospirosis associated severe pulmonary hemorrhage has emerged during these epidemics [4, 6, 9].

In the city of Salvador, Brazil, urban epidemics of severe leptospirosis occurs annually during periods of heavy rainfall [7]. A case-control study, conducted in 1998 epidemic, identified residence in proximity to an open sewer (matched odds ratio [OR] = 5.15, 95% confidence interval [CI] = 1.80-14.74), peri-domiciliary sighting of rats (OR = 4.49, 95% CI = 1.57-12.83), sighting groups of five or more rats (OR = 3.90, 95% CI = 1.35-11.27), and workplace exposure to contaminated environmental sources (OR = 3.71, 95% CI = 1.35-10.17), as independent risk factors for acquiring leptospirosis [10], suggesting that the peri-domiciliary environment contaminated by urine of rats is a important site of transmission. To investigate the occurrence of transmission in peri-domiciliary setting, we developed a case control study comparing the rate of previous *Leptospira* infection in household contacts of severe leptospirosis index cases and neighborhood control individuals.

Methods

Outbreak investigation

An outbreak of leptospirosis was identified in 2001 in Salvador, the third largest city in Brazil with over 2 million inhabitants, during the rainy season between April and November. Identification of severe cases of leptospirosis was performed as described by Sarkar et al [10]. Briefly, patients admitted with physical and laboratory findings

characteristics of severe leptospirosis were identified through ongoing active surveillance at the state infectious disease reference hospital in Salvador. Serum samples, collected in acute and convalescent-phase, were tested by whole leptospira IgM enzyme-linked immunosorbent assay (IgM ELISA) [11] and MAT [12].

Identification of index cases and control subjects

A case-control study was conducted between April and November, 2001. During this period, individuals meeting the surveillance definition of leptospirosis, greater than 12 years of age, and that had a positive anti-leptospiral IgM ELISA reaction in one or more serum samples were identified as cases. Cases were located using residential addresses. One or two control individuals matched for sex and age as each case were selected, who had not had a febrile illness in the past month, had not received a diagnosis of leptospirosis in the past year, and were not pregnant. Following the interview of the case, the field team surveyed households a distance of 5 domiciles from the case household and at every household thereafter until an appropriate age and sex-matched control subject could be identified. The second control subject was located in a similar manner, starting 5 domiciles from the household of the first control subject. The first control subjects were located an average of 8 houses domiciles (35 meters) from the case residence and the second control residence was an average of 16 domiciles (76 meters) from the case residence

Selection of contacts

Cases and control subjects participating in the case-control investigation were selected for the peri-domiciliary transmission analysis. The inhabitants of index case households were defined as **index case contacts**, and inhabitants of control subjects households as **index**

control contacts. Another group of inhabitants of households located in the neighborhood of an index case were defined as **unmatched control neighbors.** To identify this individuals, the field team surveyed households a distance of 5 domiciles from the case household, in a direction opposite to the direction of controls subjects domiciles, and at every household thereafter, until at least one unmatched control neighbor accepted to participate in study. The second group of unmatched control neighbors were located in a similar manner, starting 5 domiciles from the household of the first unmatched control neighbors. All individuals with 5 years old or more and living in one of households of the selected groups were invited to participate in the study, and for testing in MAT for detection of previous leptospiral infection. Children less than 5 years old were not include because there was none case of severe leptospirosis identified in this age group in a previous study [7].

Serologic analysis

A microagglutination test (MAT) containing pathogenic reference serovars: Canicola, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, and Saxkoebing, and a non-pathogenic *Leptospira biflexa* serovar patoc were used to detect previous leptospiral infection. The use of this reduced battery had a 100% concordance with that of the WHO-recommended 18 serogroup battery [12] in Salvador [10]. Serum dilutions of 1:25, 1:50 and 1:100 were screened, and, if agglutination was observed at a reciprocal titer of 100, sera were titrated to determine the highest agglutination titer.

Statistical analysis

Data were described by use of proportions with 95% confidence intervals and medians with range values. To compare categorical variables, and numerical variables, the χ^2 or Fisher's exact test and the non-parametric tests of Mann-Whitney or Kruskal-Wallis were used, respectively. In a case-control analysis, the risk of peri-domiciliary transmission of leptospirosis was assessed by calculating the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) for the proportion of previous leptospiral infection between index case contacts and control contact subjects (index control contacts plus unmatched control neighbors). Because of household sampling method, the ORs and the 95%CI were adjusted using the CSAMPLE program of the Epi Info (Version 6.04, CDC, Atlanta). Household was entered as a cluster (primary sample unit), the households in the same neighborhood were considered as a stratum, and the weight of each cluster (household) in the sample was the number of inhabitants included in the study.

Results

Outbreak investigation

In Salvador, 121 (89%) of 136 cases identified during 2001 surveillance occurred between March and October. During 2001, the mean monthly rainfall was 149 mm, with 85% (1526 of 1792 mm) of precipitation occurring between March and October. There were 108 hospitalized cases of leptospirosis that met the surveillance criteria between April and November, 2001. Of these cases, 9 (8%) died during hospitalization and 62 (65%)

participated in the case-control study. Thirty-seven cases (26%) could not be located following hospital discharge.

Contact characteristics

Twenty-five index cases, confirmed by MAT, between April and July, 2001 from 30 index cases included in case-control study during the same period (65 cases identified in surveillance), were selected for the peri-domiciliary transmission study. Twenty-eight controls subjects were identified.

Twenty-five index cases, 28 index control subjects and 31 unmatched control neighbors domiciles were identified. In total, 406 inhabitants from 84 households (4.8 individuals per domicile) were identified. There were 353 contacts (90 index case contacts, 102 index control contacts, and 161 unmatched control neighbors), of them 270 (77%) agree to participate in study, 50 (14%) were excluded because age less than 5 years old or were not located after several household visits, and 33 (9%) refused to participate. Stratifying by study group, there was not a significant difference in losses (refuses and excluded): 16 (19%) in index case contacts, 33 (9%) in index control contacts, and 41 (49%) in unmatched control neighbors ($p=0.33$). After exclusion of 5 index cases and yours contacts, 3 index control subjects and yours contacts, and 4 unmatched control neighbors domiciles, because at least one household in each group (index case, index control and unmatched control neighbors) was not identified at same neighborhood, 245 contact subjects from 72 households were included in analysis. The included contacts not significantly differed from those not included by age and sex. There was not significant differences between index cases and control subjects, considering age, sex, monthly income (US\$), employment, and number of household contacts (Table 1). There were 63 index case

contacts, 76 index control contacts, and 106 unmatched control neighbors. There was not difference by age and sex between these 3 groups (table 1)

Household survey for past leptospiral infection

The matching for cases and controls was presumed to control for familiar structure of households by the presence of an adult man in majority of index cases' domiciles. Because there was not difference, in terms of age and sex, between index control subject contacts and unmatched control neighbors (table 1), they were jointed in a group of control contact subjects further analysis.

The index case contacts had a risk 6 to 9 times higher, depending on a MAT reciprocal titer cut-off used, than control contact subjects for a previous *Leptospira* infection (table 2). This association was observed in different cut off points of MAT, and was not modified by adjusting for cluster sampling design of study. The risk was specific for pathogenic *Leptospira*, and not significant for the non-pathogenic serovar (table 2). The higher risk for index case contacts remained if only index control subject contacts were used as comparison group.

Discussion

Brazil had a major demographic transformation in the last 40 years, more than 350% growth in the urban population, which resulted in expansion of urban slums ("favelas") without sanitary infra-structure. In combination with seasonal heavy rainfall and flooding, this produced the conditions for the emergence of rodent-borne urban epidemics of leptospirosis [7]. Similar social and climatic conditions observed in other Latin American countries indicate that urban leptospirosis may be a under recognized problem [6, 9].

In this setting of urban cyclic epidemics, the present study identified agglomeration of risk in household, as indicated by risk 6 times higher of previous leptospiral infection in the index case contacts subjects.

A host genetic factor associated with susceptibility to leptospiral infection could be present in families, how has been demonstrated in other infectious diseases [13]. However, the attributable fraction to host genetic factors are small for acquisition of infection [14], compared to severity of disease. In addition, none of these factors has been identified until now in leptopirosis [1, 2].

Perhaps, socioeconomic status or specific lifestyle, present in households of index cases, could expose your contacts to leptopirosis. But, these individuals are neighbors living in similar socioeconomic conditions (table 1) in favelas. Also, lifestyles within families are typically associated with intra-domiliary habits, and not peri-domiciliary.

On the other hand, a previous case-control study demonstrated independent strong association of open sewers, presence of, and number of rats in the peri-domiciliary environment with acquisition of leptopirosis in the urban setting [10]. These differences were observed in neighborhood households distancing less than 50 meters, indicating micro-environmental conditions present in leptopirosis patients' households that could promote infestation of rats, for example open sewers. Consequently, the *Rattus norvegicus*, the principal carrier of *L. interrogans* in urban environment [5], with an average home range radius of 30 to 50 meters [15], could contaminate differentially the neighborhood's favela environment.

This pattern of transmission was not previously described in a search or literature. In fact, this was not observed in places where the disease is rural-based and endemic, such as Barbados and Trinidad [16]. Contrasting with the occupational acquisition in traditional

endemic rural-based leptospirosis, the data of present study in combination with independent strong association of risk factors in the peri-domiciliary environment [10], indicate this environment as an important site of transmission in urban epidemics.

In conclusions, a new pattern of peri-domiciliary leptospirosis transmission, occurring in the urban epidemic setting, in Salvador, Brazil, was identified. This finding, associated with specific risk factors responsible for acquisition of leptospirosis identified [10], indicate that public health interventions aimed to reduce the impact of severe leptospirosis should be focus on peri-domiciliary environment.

References

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326
2. Faine SB, Adler B, Bolin C and Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999
3. Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 2002;34:1593-9
4. Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 1998;178:1457-63
5. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P and Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med* 1996;125:794-8
6. Lomar AV, Diament D and Torres JR. Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:23-39, vii-viii
7. Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr. and Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 1999;354:820-5

8. Tavares LMSA, Elkoury MR and Oliveira RC. Boletim eletrônico EPIDEMIOLOGICO - FUNASA - Notificação de casos de leptospirose através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN). (Accessed April 04, 2003, At [http://www.funasa.gov.br](#))
9. Seijo A, Coto H, San Juan J, et al. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1004-5
10. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:605-10
11. Terpstra WJ, Ligthart GS and Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J Gen Microbiol* 1985;131:377-85
12. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO Offset Publ 1982:1-171
13. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001;2:967-77
14. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med* 2001;134:978-96
15. FUNASA. Manual de controle de roedores. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, 2002
16. Everard CO, Maude GH and Hayes RJ. Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. *Ann Trop Med Parasitol* 1990;84:255-66

Table 1. Characteristics of leptospirosis cases, age and sex-matched control subjects, household contacts of index cases and control subjects, and unmatched control neighbors.

Characteristics	Index cases (n=20)	Index control subjects (n=25)	
Index cases and control subjects	No. (%) or median (range)		
Age (years) ^a	34.5 (17-64)	37.0 (20-68)	
Male gender ^b	17 (85)	22 (88)	
Monthly income (US\$) ^a	63.5 (0-252)	84.0 (0-273)	
Employed ^b	17 (85)	22 (88)	
No. of household contacts ^a	3.5 (0-10)	3.0 (0-11)	
Contacts	Index case contacts (n=63)	Index control subject contacts (n=76)	Unmatched control neighbors (n=106)
Age (years) ^c	21.0 (5-75)	22.0 (5-97)	22.5 (5-86)
Male gender ^b	27 (43)	27 (36)	39 (37)

a Kruskal-Wallis test

b χ^2 or Fisher's exact test

c Mann-Whitney test

Table 2. Prior leptospiral infection among household contacts of index leptospirosis cases and control subjects.

Reciprocal MAT titer	Index case contacts (n=63)	Control contact subjects ^a (n=182)	OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI) ^b
No. (%)				
Against pathogenic serovar^c				
≥ 25	17 (27)	7 (4)	9.24 (3.36-27.67)	8.38 (2.68-26.25)
≥ 50	13 (21)	7 (4)	6.50 (2.25-20.14)	5.64 (1.79-17.81)
≥ 100	10 (16)	3 (2)	8.40 (2.28-37.77)	9.40 (2.36-37.47)
Against serovar patoc^d				
≥ 25	9 (14)	22 (12)	1.21 (0.46-2.94)	1.23 (0.38-3.94)
≥ 50	4 (6)	1 (1)	12.12 (1.17-607.53)	7.82 (0.49-124.68)
≥ 100	1 (1)	0	-	-

Note. MAT= Microagglutination test.

a Control contacts subjects include household contacts of age and sex-matched index individuals and unmatched control neighbors

b Adjusted for the cluster sample design, that include sampling of household and neighborhood, and weights were calculated according to the no. of inhabitants for each household

c Pathogenic serovars included: Canicola, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Saxkoebing

d Nonpathogenic *Leptospira biflexa* of the Seramanga serogroup.

VII.b. RESULTADOS ADICIONAIS

Durante o período do estudo, abril a julho de 2001, foram identificados 406 indivíduos residindo em 84 domicílios (4,8 moradores por domicílio, variando entre 1 e 13 moradores). Entre os moradores, 38 (9,4%) foram excluídos por serem menores do 5 anos; 36 (8,9%) recusaram-se a participar do estudo; 12 (3%) não foram encontrados após sucessivas visitas ao domicílio. Dos 320 (78,8%) indivíduos incluídos no estudo, 25 (7,8%) foram casos índices; 74 (23,1%) contactantes do caso; 25 (7,8%) controles índices; 76 (23,8%) contactantes do controle e 120 (37,5%) domiciliares controle.

A soroprevalência variou entre os grupos do estudo, dependendo do título recíproco do MAT usado como ponto de corte para definir positividade (Figura 4). Por exemplo, para o título recíproco no MAT ≥ 25 , observou-se por grupo: contactantes do caso índice 29,7% (IC95% = 19,7-41,5); controles índice 16% (IC95% = 4,5-36,1); contactantes do controle 9,2% (IC95% = 3,8-18,1) e controles domiciliares 7,5% (IC95% = 3,5-13,8).

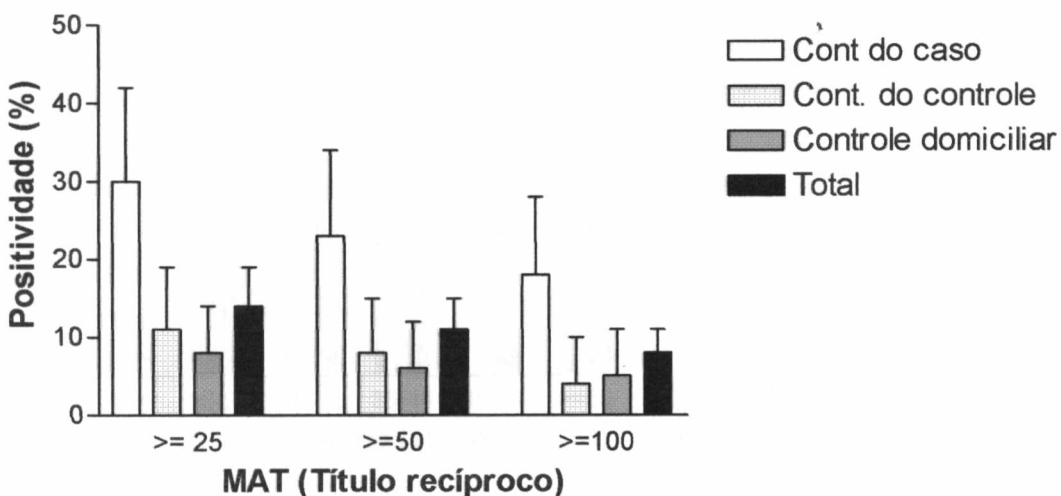


Figura 4. Prevalência de infecção previa por leptospira por grupo de estudo, agrupados por título recíproco no MAT utilizado como ponto de corte, para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia.

Para estimar a prevalência de infecção prévia foram analisados os indivíduos controles domiciliares, considerado um grupo mais representativo da comunidade, uma vez que não houve pareamento no momento da seleção. Nesse grupo a prevalência foi de 7,5% (IC95% = 3,5-13,8), não diferindo entre o sexo feminino e masculino, 8% (6/75) e 6,7% (3/45), respectivamente ($p=1,0$). Para verificar se mulheres e crianças são expostas à infecção por leptospira na comunidade, a prevalência de infecção prévia por leptospira entre os contactantes foi estratificada por sexo e faixa etária, mostrando que ambos são expostos em níveis comparáveis aos indivíduos do sexo masculino (figura 5).

Para identificar fatores associados com infecção prévia por leptospira entre os contactantes (270 indivíduos), em análise tipo caso-controle, foram comparados os indivíduos positivos ($\text{MAT} \geq 25$) e os negativos, quanto a presença de fatores de risco em potencial. As variáveis pesquisadas foram sócio-demográficas, exposições ambientais e presença de reservatórios, tanto no peri-domicílio quanto no ambiente ocupacional (Anexo II – Questionário).

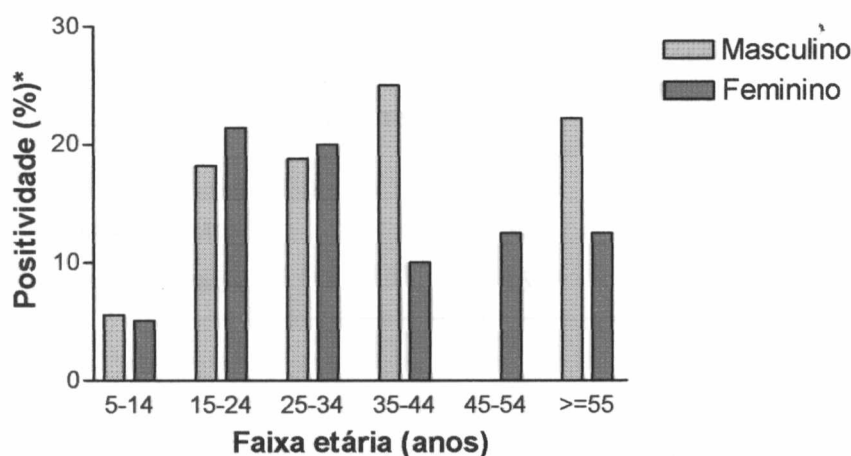


Figura 5. Prevalência de infecção prévia por leptospira, estratificada por sexo e faixa etária, para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia.

* Título recíproco no $\text{MAT} \geq 25$.

A análise dos dados sócio-demográficos (Tabela 1), não mostrou diferença no risco de infecção prévia entre os gêneros, entretanto, adultos (idade maior ou igual a 21 anos) apresentaram um risco maior que duas vezes em relação a adolescentes e crianças (OR = 2,5; IC95% = 1,3-5,9).

Tabela 1. Fatores sócio-demográficos e exposições peri-domiciliares como fatores de risco potenciais para infecção prévia por leptospira (título recíproco no MAT \geq 25) para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia.

Variável	Positivos (N=38)		Negativos (N=232)		OR	95%CI
	No. de	No. (%)	No. de	No. (%)		
	respostas		respostas			
Sexo masculino	38	14 (37)	232	88 (38)	1,1	0,5-2,5
Idade (> 20 anos)	38	27 (71)	232	121 (52)	2,5	1,3-5,9
Horas em casa/dia (>16 hs)	10	5 (50)	80	48 (60)	1,3	0,3-6,5)
Esgoto a céu-aberto	36	12 (33)	215	39 (18)	3,1	1,3-7,8
Contato com água de esgoto	11	3 (27)	85	14 (17)	2,0	0,8-4,8
Contato com lama	11	5 (46)	85	36 (42)	1,6	0,4-6,6
Contato com água de alagamento	11	4 (36)	85	30 (35)	1,4	0,5-4,3
Terreno baldio	12	7 (58)	86	41 (48)	1,6	0,6-4,4
Observar de ratos	36	32 (89)	209	174 (83)	1,6	0,5-5,9
Observar > 5 ratos	35	11 (31)	208	59 (28)	1,0	0,4-2,6

Dos fatores de risco associados ao ambiente peri-domiciliar (Tabela 1), a presença de esgoto a céu-aberto aumentou o risco de infecção prévia em 3 vezes (OR = 3,1; IC95% = 1,3-7,8). Também, contatos ambientais, potencialmente de risco, não foram

significativamente associados ao risco de infecção prévia (Tabela 1). Além disso, a presença de roedores, detectada pela observação pelos moradores, ou pela proximidade do domicílio a terreno baldio, local de moradia em potencial para roedores, não foram fatores de risco significantes (Tabela 1).

Entre as exposições relacionadas ao ambiente ocupacional, contato com fontes potencialmente contaminadas (lama, água de alagamento e água de esgoto) nesse ambiente foram significativamente associadas ao risco de infecção prévia (Tabela 2). Enquanto, como aconteceu no ambiente peri-domiciliar, a presença de ratos não foi associada ao risco (Tabela 2).

Tabela 2. Exposições ocupacionais como fatores de risco potenciais para infecção prévia por leptospira (título recíproco no MAT \geq 25) para 270 indivíduos, em Salvador, Bahia.

Variável	Positivos (N=38)		Negativos (N=232)		OR	95%CI
	No. de	No. (%)	No. de	No. (%)		
	respostas		respostas			
Contato com lama	16	4 (25)	63	7 (11)	3,8	1,5-9,6
Contato com água de alagamento	16	4 (25)	62	10 (16)	2,4	1,1-5,3
Contato com água de esgoto	18	3 (19)	63	5 (8)	4,3	2,2-11,0
Ver ratos no trabalho	20	1 (5)	128	16 (13)	0,3	0,1-2,7
Ver >5 ratos no trabalho	16	1 (6)	70	5 (7)	0,7	0,1-5,1

VIII. DISCUSSÃO

O padrão de epidemias urbanas associadas a chuvas predomina no Brasil (Ko *et al.*, 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Kupek *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001), com até 10.000 casos de leptospirose notificados anualmente (Tavares *et al.*, 2002). Além do número elevado de casos, uma letalidade por volta de 10% atesta a importância da doença no nosso meio. No entanto, estima-se que apenas 5 a 15% dos casos sintomáticos evoluam para a forma grave da doença (Faine *et al.*, 1999).

Os dados do presente estudo demonstram uma elevada soroprevalência (7,5%), nessa população considerada de alto risco (elevada incidência de casos graves), revelando a subestimativa do impacto da leptospirose na comunidade, uma vez que uma proporção não conhecida desses indivíduos pode representar casos sub-clínicos ou com doença leve, os quais não são notificados às Secretarias de Saúde. Além disso, diferindo das formas graves, que acometem principalmente homens adultos, os dados apontam que mulheres e crianças são expostas. Então, porque “apenas” homens evoluem para as formas graves? Três fatores principais poderiam estar envolvidos: o hospedeiro, o patógeno e o tamanho do inóculo.

Em relação ao hospedeiro, não são conhecidos fatores genéticos associados à susceptibilidade para infecção ou gravidade de doença para a leptospirose. No entanto, em outras doenças infecciosas existem fatores genéticos que determinam susceptibilidade ou resistência bem conhecidos (Blackwell, 2001; Hogan & Hammer, 2001). Além disso, na paracoccidiodomicose, uma micose sistêmica, parece haver uma associação entre a gravidade e forma clínica com o gênero do paciente, o que poderia ser decorrente de influências hormonais (Brummer *et al.*, 1993).

A virulência do patógeno pode determinar a gravidade da doença após a infecção. Em regiões do mundo onde várias espécies de leptospira são implicadas como causa da leptospirose humana (Edwards *et al.*, 1990; Phraisuwan *et al.*, 2002), este pode ser um fator que determina o desfecho clínico. Porém, foi demonstrado que um único sorovar de *L. interrogans* é o agente causal nas epidemias urbanas em Salvador (Ko *et al.*, 1999), tornando a virulência do patógeno uma explicação pouco provável como causa da determinação do espectro clínico observado.

A transmissão de leptospirose acontece por contato com um ambiente contaminado. Os resultados de investigações de caso-controle em ambientes rurais e urbanas enfatizam a importância de exposições ambientais na aquisição de infecção por leptospira (Sasaki *et al.*, 1993; Trevejo *et al.*, 1998; Bovet *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 1999; Tangkanakul *et al.*, 2000). Estudos ecológicos mostraram que regiões com esgotos abertos, e propensas a inundações apresentam maior risco para leptospirose urbana (Barcellos & Sabroza, 2000, 2001), sugerindo que estes ambientes podem servir como fontes de transmissão. Porém, indivíduos das mesmas comunidades dos casos são frequentemente expostos às fontes de contaminação, embora não desenvolvam leptospirose clínica. Portanto, a progressão de infecção para doença severa pode estar associada com comportamentos de risco que influenciam o tamanho do inóculo durante as exposições à ambiente contaminado. Porém, não existe qualquer investigação epidemiológica que tenha investigado especificamente esta questão.

Como esperado a soroprevalência aumenta com a idade. Quando analisados possíveis fatores de risco, observa-se que exposição a ambiente contaminado no trabalho (contato com água de alagamento, lama ou água de esgoto) foram associados a infecção prévia por leptospira, o que corrobora os dados do estudo de caso-controle (Sarkar *et al.*,

2002). Em relação ao peri-domicílio, a presença de esgoto a céu-aberto mostrou uma associação significativa com infecção prévia, confirmando os resultados do estudo de caso-controle. No entanto, a observação de roedores no peri-domicílio, não mostrou significância estatística, provavelmente pela elevada prevalência do fator de risco tanto no grupo de infectados quanto nos não infectados.

Finalmente, o risco maior do que 5 vezes de apresentar evidência para infecção prévia por leptospirosas patogênicas, nos indivíduos que moram no mesmo domicílio que um caso de leptospirose grave, quando comparados com indivíduos vizinhos, que não tem um caso de leptospirose grave no domicílio, confirma a importância do ambiente peridomiciliar para a aquisição de leptospirose no cenário de epidemias urbanas. Esta associação permaneceu nos diferentes pontos de corte da MAT, considerando o valor geralmente aceito em estudos de soroprevalência, um título recíproco maior ou igual a 100, e também valores menores utilizados frequentemente por outros autores (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

A determinação do ambiente peridomiciliar como o local predominante da transmissão da leptospirose urbana tem importância fundamental para a saúde pública, pois indica onde as medidas preventivas devem ser dirigidas para diminuir o impacto da doença. No entanto, mesmo em locais de alto risco para aquisição de leptospirose, existem diferenças micro-ambientais que determinam tal risco, e a identificação de tais diferenças pode ajudar a focalizar as ações preventivas nos grupos sob maior risco dentro das favelas urbanas.

IX. CONCLUSÕES

- Foi observada uma elevada prevalência (7,5%) de infecção prévia por leptospira na população estudada.
- Mulheres e crianças são expostas à infecção por leptospira patogênica igualmente, na comunidade.
- Fatores de risco ocupacionais (contato com ambiente contaminado: lama, água de alagamento e água de esgoto) e associados ao ambiente peri-domiciliar (presença de esgoto a céu-aberto) foram identificados com infecção prévia por leptospira.
- Contactantes de casos índice tiveram mais que 5 vezes o risco de uma infecção prévia do que seus vizinhos controle, indicando a importância da transmissão no ambiente peri-domiciliar, durante epidemias urbanas de leptospirose.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulkader RC. Acute renal failure in leptospirosis. *Ren Fail.* 19: 191-8, 1997.

Abdulkader RC, Seguro AC, Malheiro PS, Burdmann EA, Marcondes M. Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 54: 1-6, 1996.

Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun.* 17: 67-72, 1977.

_____. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J Med Microbiol.* 11: 387-400, 1978.

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 338: 347-54, 1998.

Andrade J, Brandao AP. [Epidemiology of human leptospirosis, with special reference to greater Rio de Janeiro, Brazil, from 1970 to 1982]. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 82: 91-100, 1987.

Andrade ZA, Oliveira JC. Estudo sôbre a leptospirose na Bahia. *Boletim da Fundação Gonçalo Moniz:* 1-37, 1954.

Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Amer J Pathol.* 40: 393-423, 1962.

Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, Plikaytis B, Jarquin C, De Lose Reyes JO, Amador JJ. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 63: 249-54, 2000.

Azevedo R, Corrêa MOA. Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife em 1966. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 28: 85-111, 1968.

Baldwin CL, Sathiyaseelan T, Naiman B, White AM, Brown R, Blumerman S, Rogers A, Black SJ. Activation of bovine peripheral blood gammadelta T cells for cell division and IFN-gamma production. *Vet Immunol Immunopathol.* 87: 251-9, 2002.

Barcellos C, Sabroza PC. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. *Int J Environ Health Res.* 10: 301-13, 2000.

_____. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica.* 17 Suppl: 59-67, 2001.

Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG, Riley LW. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol.* 39: 191-5, 2001.

Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW. Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans*, an Invasive but Nonintracellular Pathogen. *Infect Immun.* 70: 6926-6932, 2002.

Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 90: 40L-48L, 2002.

Berman SJ, Tsai CC, Holmes K, Fresh JW, Watten RH. Sporadic anicteric leptospirosis in South Vietnam. A study in 150 patients. *Ann Intern Med.* 79: 167-73, 1973.

Bethlem EP, Carvalho CR. Pulmonary leptospirosis. *Curr Opin Pulm Med.* 6: 436-41, 2000.

Blackwell JM. Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends Mol Med.* 7: 521-6, 2001.

Bovet P, Yersin C, Merien F, Davis CE, Perolat P. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case- control study in the Seychelles (Indian Ocean). *Int J Epidemiol.* 28: 583-90, 1999.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 2: 839-58, 1999.

Brito Td. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 10: 237-41, 1968.

Brito Td, Penna DO, Pereira VC, Hoshino S. Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 343: 124-35, 1967.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 6: 89-117, 1993.

Burth P, Younes-Ibrahim M, Goncalvez FH, Costa ER, Faria MV. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 65: 1557-60, 1997.

Cabello FC, Sartakova ML, Dobrikova EY. Genetic manipulation of spirochetes--light at the end of the tunnel. *Trends Microbiol.* 9: 245-8, 2001.

Caldas EM, Costa E, Sampaio MB. [Leptospirosis in Salvador (Brazil). Clinical and laboratory aspects]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 20: 164-76, 1978.

Caldas EM, Sampaio MB. Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brazil: a case-control seroepidemiologic study. *Int J Zoonoses*. 6: 85-96, 1979.

Charon NW, Goldstein SF. GENETICS OF MOTILITY AND CHEMOTAXIS OF A FASCINATING GROUP OF BACTERIA: The Spirochetes. *Annu Rev Genet*. 36: 47-73, 2002.

Chaudhry R, Premlatha MM, Mohanty S, Dhawan B, Singh KK, Dey AB. Emerging leptospirosis, north India. *Emerg Infect Dis*. 8: 1526-7, 2002.

Childs JE, Schwartz BS, Ksiazek TG, Graham RR, LeDuc JW, Glass GE. Risk factors associated with antibodies to leptospires in inner-city residents of Baltimore: a protective role for cats. *Am J Public Health*. 82: 597-9, 1992.

Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, Lupidi R, Mansueto S, Manera A, Ioli A, Marcuccio L, Grillo R, Ciarrocchi S, Cinco M. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Eur J Epidemiol*. 16: 79-86, 2000.

Cinco M, Vecile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *FFMS Microbiol Lett*. 138: 211-4, 1996.

Correa MO. Human leptospirosis in Brazil. *Int J Zoonoses*. 2: 1-9, 1975.

Costa E, Costa YA, Lopes AA, Sacramento E, Bina JC. [Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 34: 261-7, 2001.

Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun*. 70: 2311-8, 2002.

Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 61: 731-4, 1999.

Daher E, Zanetta DM, Cavalcante MB, Abdulkader RC. Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. *Am J Trop Med Hyg*. 61: 630-4, 1999.

De Brito T, Bohm GM, Yasuda PH. Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig. *J Pathol*. 128: 177-82, 1979.

De Brito T, Freymuller E, Hoshino S, Penna DO. Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea-pig. A light and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*. 341: 64-78, 1966.

De Brito T, Machado MM, Montans SD, Hoshino S, Freymuller E. Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 342: 61-9, 1967.

de Brito T, Morais CF, Yasuda PH, Lancellotti CP, Hoshino-Shimizu S, Yamashiro E, Ferreira Alves VA. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann Trop Med Parasitol.* 81: 207-14, 1987.

De Brito T, Penna DO, Hoshino S, Pereira VG, Caldas AC, Rothstein W. Cholestasis in human leptospirosis: a clinical, histochemical, biochemical and electron microscopy study based on liver biopsies. *Beitr Pathol Anat.* 140: 345-61, 1970.

de Carvalho JE, Marchiori EdS, Guedes e Silva JB, Netto BA, Tavares W, de Paula AV. [Pulmonary compromise in leptospirosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 25: 21-30, 1992.

de Fost M, Hartskeerl RA, Groenendijk MR, van der Poll T. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10: 332-5, 2003.

Diament D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun.* 70: 1677-83, 2002.

Donaghy M, Rees AJ. Cigarette smoking and lung haemorrhage in glomerulonephritis caused by autoantibodies to glomerular basement membrane. *Lancet*. 2: 1390-3, 1983.

Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA, Everard CO, Callender J. Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *Am J Trop Med Hyg*. 35: 352-4, 1986.

_____. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 39: 388-90, 1988.

_____. Leptospirosis in Barbados. A clinical study. *West Indian Med J*. 39: 27-34, 1990.

Edwards GA, Domm BM. Human leptospirosis. *Medicine (Balt)*. 39: 117-56, 1960.

Emmanouilides CE, Kohn OF, Garibaldi R. Leptospirosis complicated by a Jarisch-Herxheimer reaction and adult respiratory distress syndrome: case report [see comments]. *Clin Infect Dis*. 18: 1004-6, 1994.

Everard CO, Hayes RJ, Fraser-Chanpong GM. A serosurvey for leptospirosis in Trinidad among urban and rural dwellers and persons occupationally at risk. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 79: 96-105, 1985.

Everard CO, Maude GH, Hayes RJ. Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. *Ann Trop Med Parasitol*. 84: 255-66, 1990.

Faine S. Reticuloendothelial Phagocytosis of Virulent Leptospire. *Am J Vet Res.* 25: 830-5, 1964.

_____. Guidelines for the control of leptospirosis. *WHO Offset Publ:* 1-171, 1982.

Faine SB, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci. 1999

Faria MT. Leptospirose epidêmica em Salvador, Bahia: Estudo de reservatórios e desenvolvimento do teste de reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) para a sua identificação. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2000. 118 p.

Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 21: 1-6; quiz 7-8, 1995.

Ferrer SR. Desenvolvimento e avaliação de métodos baseados em PCR para diagnóstico e triagem molecular de cepas isoladas em epidemias urbanas de leptospirose em Salvador, Bahia. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2000. 82 p.

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-

based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 39: 3303-10, 2001.

Fraser CM, Casjen S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R. Genome sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 390: 580-586, 1997.

Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Venter JC, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science.* 281: 375-88, 1998.

Friedland JS, Warrell DA. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: possible pathogenesis and review [see comments]. *Rev Infect Dis.* 13: 207-10, 1991.

Fróes JAG. Etiologia da febre amarela e reconhecimento na Bahia do *Leptospira icteroides* (Correspondencia trocada sobre esse assumpto entre os Professores Dr. Hideyo Noguchi, do Rockefeller Institute for Medical Research, de New-York e Dr. João A. G. Fróes, da Faculdade de Medicina da Bahia). *Gazeta Medica da Bahia.* 54: 611-30, 1924.

Goncalves AJ, de Carvalho JE, Guedes e Silva JB, Rozembaum R, Vieira AR. [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: 261-70, 1992.

Gonsalez CR, Casseb J, Monteiro FG, Paula-Neto JB, Fernandez RB, Silva MV, Camargo ED, Mairinque JM, Tavares LC. Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 40: 59-61, 1998.

Guidugli F, Castro AA, Atallah AN. Systematic reviews on leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 42: 47-9, 2000.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 68: 2276-85, 2000.

Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ, Ashford DA. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis*. 34: e40-3, 2002.

Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*. 67: 6572-82, 1999.

Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med*. 134: 978-96, 2001.

Holk K, Nielsen SV, Ronne T. Human leptospirosis in Denmark 1970-1996: an epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis*. 32: 533-8, 2000.

Johnson WD, Jr., Silva IC, Rocha H. Serum creatine phosphokinase in leptospirosis. *Jama*. 233: 981-2, 1975.

Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr., Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*. 354: 820-5, 1999.

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother*. 7: 10-5, 2001.

Kupek E. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996 [In Process Citation]. *Braz J Infect Dis*. 4: 131-4, 2000.

Kupek E, de Sousa Santos Favarsani MC, de Souza Philippi JM. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. *Braz J Infect Dis*. 4: 131-4, 2000.

Kuriakose M, Eapen CK, Paul R. Leptospirosis in Kolenchery, Kerala, India: epidemiology, prevalent local serogroups and serovars and a new serovar. *Eur J Epidemiol*. 13: 691-7, 1997.

Laras K, Cao BV, Bounlu K, Nguyen TK, Olson JG, Thongchanh S, Tran NV, Hoang KL, Punjabi N, Ha BK, Ung SA, Insisiengmay S, Watts DM, Beecham HJ, Corwin AL. The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg.* 67: 278-86, 2002.

Letocart MP, Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Baranton G, Perolat P. Genetic structure of the genus *Leptospira* by multifocus enzyme electrophoresis. *Int J System Bacteriol.* 49: 231-238, 1999.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 14: 296-326, 2001.

Marangoni A, Aldini R, Sambri V, Montagnani M, Ballardini G, Storni E, Cevenini R. Uptake and killing of *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver. *Infect Immun.* 68: 5408-11, 2000.

Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajn bok J, Seguro AC. Acute Lung Injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, Outcome, and Factors Associated with Mortality. *Clin Infect Dis.* 29: 1561-1563, 1999.

Martinez Garcia MA, de Diego Damia A, Menendez Villanueva R, Lopez Hontagas JL. Pulmonary involvement in leptospirosis [In Process Citation]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19: 471-4, 2000.

McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med.* 100: 696-8, 1984.

Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 30: 2219-24, 1992.

Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis.* 172: 281-5, 1995.

_____. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun.* 65: 729-38, 1997.

Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett.* 185: 17-22, 2000.

Merien F, Truccolo J, Rougier Y, Baranton G, Perolat P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett.* 169: 95-102, 1998.

Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW. Outbreak of leptospirosis among triathlon

participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis.* 34: 1593-9, 2002.

Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun.* 69: 7550-8, 2001.

Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, Baldwin CL. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun.* 70: 6147-57, 2002.

Nicodemo AC, Del Negro G, Amato Neto V. Thrombocytopenia and leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 32: 252-9, 1990.

Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, Takakura CF, Santos RT, Nicodemo EL. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 181-7, 1997.

Nicodemo AC, Medeiros N, del Negro G, Amato Neto V. [Hematologic changes in leptospirosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 31: 71-9, 1989.

Oie S, Hironaga K, Koshiro A, Konishi H, Yoshii Z. In vitro susceptibilities of five *Leptospira* strains to 16 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 24: 905-8, 1983.

O'Neil KM, Rickman LS, Lazarus AA. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Rev Infect Dis.* 13: 705-9, 1991.

Pereira MM, Andrade J. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospire and specific antibodies in rodents. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82: 768-70, 1988.

Phraisuwan P, Whitney EA, Tharmaphornpilas P, Guharat S, Thongkamsamut S, Aresagig S, Liangphongphanthu J, Junthima K, Sokampang A, Ashford DA. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg Infect Dis.* 8: 1455-9, 2002.

Phu NH, Hien TT, Mai NT, Chau TT, Chuong LV, Loc PP, Winearls C, Farrar J, White N, Day N. Hemofiltration and peritoneal dialysis in infection-associated acute renal failure in Vietnam. *N Engl J Med.* 347: 895-902, 2002.

Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect.* 2: 1265-76, 2000.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y,

Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 422: 888-93, 2003.

Romero EC, Billerbeck AE, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, Yasuda PH. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *J Clin Microbiol*. 36: 1453-5, 1998.

Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 66: 605-10, 2002.

Sasaki DM, Pang L, Minette HP, Wakida CK, Fujimoto WJ, Manea SJ, Kunioka R, Middleton CR. Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *Am J Trop Med Hyg*. 48: 35-43, 1993.

Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. *Nephron*. 55: 146-51, 1990.

Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents*. 13: 249-55, 2000.

Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes MLC, Linhares AC, Vasconcelos PF, Ko AI. [Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35: 159-65, 2002.

Silva JJ, Dalston MO, Carvalho JE, Setubal S, Oliveira JM, Pereira MM. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35: 395-9, 2002.

Sperber SJ, Schleupner CJ. Leptospirosis: a forgotten cause of aseptic meningitis and multisystem febrile illness. *South Med J.* 82: 1285-8, 1989.

Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports (Washington).* 22: 241, 1907.

Tajiki H, Salomao R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 23: 1177-8, 1996.

Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, McNeill KM, Timboe HL, Kane RE, Sanchez JL. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med.* 310: 497-500, 1984.

Tangkanakul W, Tharmaphornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasien P, Kingnate D, Ashford DA. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 63: 204-8, 2000.

Tavares LMSA, Elkoury MR, Oliveira RC. Boletim eletrônico EPIDEMIOLOGICO - FUNASA - Notificação de casos de leptospirose através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN): CENEPI/FUNASA/Ministério da Saúde. 2003: 8-9 p. 2002.

Thomas DD, Higbie LM. In vitro association of leptospires with host cells. *Infect Immun.* 58: 581-5, 1990.

Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect.* 128: 29-36, 2002.

Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis.* 178: 1457-63, 1998.

Vaughan C, Cronin CC, Walsh EK, Whelton M. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis. *Postgrad Med J.* 70: 118-21, 1994.

Vinetz JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 14: 527-38, 2001.

Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med.* 125: 794-8, 1996.

Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, Laughlin LW. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet.* 1: 433-5, 1988.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* 2: 346-52, 2001.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, Huang CC. Leptospira Outer Membrane Protein Activates NF-kappaB and Downstream Genes Expressed in Medullary Thick Ascending Limb Cells. *J Am Soc Nephrol.* 11: 2017-2026, 2000.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 13: 2037-45, 2002.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family

Leptospiraceae with proposal for seven new *Leptospira* species. *Int J Syst Bacteriol.* 37: 407-15, 1987.

Yersin C, Bovet P, Merien F, Clement J, Laille M, Van Ranst M, Perolat P. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 71-6, 2000.

Younes-Ibrahim M, Buffin-Meyer B, Cheval L, Burth P, Castro-Faria MV, Barlet-Bas C, Marsy S, Doucet A. Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. *Braz J Med Biol Res.* 30: 213-23, 1997.

Younes-Ibrahim M, Burth P, Faria MV, Buffin-Meyer B, Marsy S, Barlet-Bas C, Cheval L, Doucet A. Inhibition of Na,K-ATPase by an endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis. *C R Acad Sci III.* 318: 619-25, 1995.

Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2: 455-62, 2000.

Zuerner RL. Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res.* 19: 4857-60, 1991.

ANEXO I.- Termo de consentimento

Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde

Consentimento para Investigação Clínica

Título do Projeto: Um Projeto de Leptospirose Epidêmica em Salvador, Bahia: Um Estudo Epidemiológico de Transmissão.

Nome do Participante do Grupo Controle: _____

No. Projeto de Pesquisa: _____

Para ser lido a todos os participantes de grupo controle adultos e responsáveis legais pelos participantes do grupo controle menores de idade: As informações, a seguir, descreverão o estudo e o papel de você / seu filho, como participante. O entrevistador responderá quaisquer perguntas que você/seu filho possa ter sobre este questionário e sobre o estudo. Pôr favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações fornecidas.

Propósito do Estudo: Nós estamos convidando você a participar de um estudo que a ser realizado na Fundação Oswaldo Cruz para investigar como as pessoas pegam leptospirose, ou o que, comumente, é conhecido como "a doença do rato". Estamos convidando você/seu filho a participar porque, embora não achamos que tem leptospirose, essa doença é comum em seu bairro. Para aprender como as pessoas desenvolvem leptospirose precisamos entrevistar pessoas que tem a doença e pessoas que não tem a doença. Ao, comparamos as entrevistas, procuraremos diferenças entre os dois grupos. As informações que você fornece podem ajudar-nos a entender como essa doença é transmitido na comunidade. Usando essa informação, os órgãos de saúde publica poderão desenvolver intervenções para prevenir esta doença no futuro.

Procedimentos a serem seguidos: Se você/seu filho decidir, voluntariamente, a participar após ter lido este termo de consentimento, o investigador perguntará questões a respeito de onde você/seu filho mora, suas ocupações, e suas atividades durante as duas semanas passadas. Também gostaríamos fazer um teste de seu sangue para estarmos certos que você não teve essa doença recentemente. Um técnico de laboratório treinado tirará 5 mililitros (1 colher de chá) de sangue. Pode ser que alguma dor, uma mancha roxa, o mais raramente, uma infecção aparece no local onde o sangue é tirado. Este risco será minimizado porque um profissional especializado vai tirar o sangue. Você/seu filho pode não ser diretamente beneficiado da participação deste estudo. Contudo, quando completado, os resultados serão enviados para seu centro de saúde para o benefício de você/seu filho no futuro em relação aos cuidados médicos.

Confidencialidade: Suas respostas durante a entrevista, e as informações do exame de sangue serão confidenciais e apenas você/seu filho, ou o responsável pelo seus cuidados médicos no centro de saúde ou o grupo do estudo terão acesso a elas. Você/seu filho não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante do estudo.

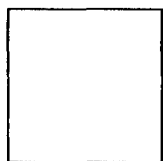
Participação Voluntária: Sua participação ou a de seu filho neste estudo é voluntária. Você/seu filho pode recusar-se a participar ou interromper a participação em qualquer momento durante o estudo, se você/seu filho assim decidir. Você/seu filho não precisa

responder a nenhuma questão durante a entrevista ou avaliações diárias. Se você/seu filho se recusa a participar do estudo completo ou de parte deste estudo, não serão afetados nos cuidados presentes ou futuros de forma nenhuma em relação ao centro de saúde. A você/a seu filho será dada uma copia deste documento de consentimento. Você/seu filho não será responsável pôr nenhuma despesa associada com este estudo.

Grupo de Contato: Se você/seu filho tiver quaisquer questões futuras sobre sua participação ou a de seu filho, neste estudo, o sobre seus direitos ou os de seu filho como participantes desta pesquisa, pôr favor, pôr-se em contato com Dr. Albert Ko, coordenador do estudo, ou Dr. Italo Sherlock o Presidente do Comitê de Ética, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcao 121, Brotas, Salvador, telefone (071) 356-4320.

Consentimento Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo em participar:

Assinatura do participante do estudo Data Hora



Assinatura 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:



Assinatura Digital dos Pais ou Responsável

Assinatura dos pais ou responsável legal Data Hora

Assinatura da testemunha Data Hora

Assinatura do investigador Data Hora

Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde
Consentimento de Menores para Investigação Clínica

Título do Projeto: Um Projeto de Leptospirose Epidêmica em Salvador, Bahia: Um Estudo Epidemiológico de Transmissão.

Nome do Participante do Grupo Controle: _____ No. Projeto de Pesquisa: _____

Para ser lido para todos os participantes do grupo controle menores de idade: As informações que seguem serão para um estudo que estamos realizando. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que tem. Pôr favor escute cuidadosamente e pergunte sobre qualquer dúvida que você tenha.

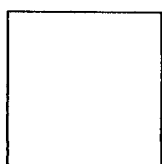
Estamos estudando uma doença que se chama leptospirose, o “doença do rato”. Embora não achamos que você tenha essa infecção, pode ser que tenham outras pessoas em seu bairro com essa doença. Estamos pedindo sua ajuda porque estamos procurando diferencias entre as pessoas que têm leptospirose e as pessoas que não têm. Nós gostaríamos de fazer algumas perguntas e também fazer um teste de seu sangue para estarmos certos que você não teve essa doença recentemente. Pode ser que apareça alguma dor, uma mancha roxa, o mais raramente, uma infecção no local onde o sangue é tirado. Este risco será minimizado porque um profissional especializado vai tirar o sangue. As informações que nós obtivermos ajudarão a entender e prevenir a doença no futuro. Se você e seu pães querem participar, nos fazemos algumas perguntas a vocês. Só fazemos isso se você e seus pães estão de acordo.

Consentimento Eu ouvi e entendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo em participar:

Assinatura do participante do estudo

Data

Hora



Assinatura Digital do Participante do Estudo

Assinatura da testemunha

Data

Hora

Assinatura do investigador

Data

Hora

ANEXO II – Questionário

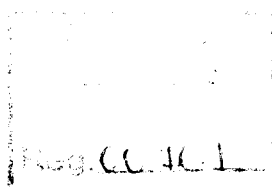
QUESTIONÁRIO: Transmissão peridomiciliar de leptospirose –L14 CONTACTANTES

I. Identificação e dados demográficos

1. Número do caso índice	LVIGI	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2. Grupo do estudo (1=caso, 2=controle, 3=contactante do controle, 4=domicilio)					<input type="text"/>
3. Ordem do controle/contactante/domiciliar (1=primeiro, 2=segundo, 8=NSA)					<input type="text"/>
4. Numero do contactante/domiciliar (1, 2, 3, 4, ..., 88=NSA)					<input type="text"/>
5. Data da entrevista (dd/mm/aa)					<input type="text"/>
6. Idade (≥ 5 anos):					<input type="text"/> anos
7. Sexo (0=F, 1=M):					<input type="text"/>
8. Quantas horas por dia fica em casa?					<input type="text"/> horas
9. Ocupação :					<input type="text"/>
9.1. Quantas horas trabalha por dia?	<input type="text"/>	<input type="text"/>	horas;	Quantos dias por semana?	<input type="text"/>
					<input type="text"/> dias

II. Dados epidemiológicos e clínicos

1. Teve leptospirose-doença do rato? (0= não, 1= sim, 8= NSA, 9=NS)					<input type="text"/>
1.1. Se sim, ano: <input type="text"/>				1.2. Hospitalizado? (0=não, 1=sim)	<input type="text"/>
1.3. Local (hospital):	<input type="text"/>				
2. Teve dengue? (0= não, 1= sim, 8=NSA, 9=NS)					<input type="text"/>
2.1. Se sim, ano: <input type="text"/> do ultimo episodio					
3. Teve febre alta com dores nos músculos e dor de cabeça no último ano? (0= não, 1= sim, 8= NSA, 9=NS)					<input type="text"/>
4. Procurou ambulatório / urgência por causa de febre alta nos últimos 5 anos? (0= não, 1= sim, 8= NSA, 9=NS)					<input type="text"/>
4.1. Se sim, ano do ultimo episodio:					<input type="text"/>
4.2. Local :	<input type="text"/>				
	Diagnostico: <input type="text"/>				
5. Vê ratos perto de casa (frente ou quintal)? (0=nunca, 1=raramente, 2=às vezes, 3=todos os dias, 9=NS)					<input type="text"/>
5.1. Se sim, qual o maior n ^o de ratos que viu de uma só vez? <input type="text"/>					
Em qual período (Dia=1, Noite=2)					<input type="text"/>
6. Vê ratos no trabalho? (0=nunca, 1=raramente, 2=às vezes, 3=todos os dias, 8=NSA, 9=NS)					<input type="text"/>
6.1. Se sim, qual o maior n ^o de ratos que viu de uma só vez? <input type="text"/>					
7. Exposição à ambiente contaminado (0= não, 1= sim, 8=NSA, 9=NS):					
		Em geral		No trabalho	
7.1. Tem contato com lama?		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
7.2. Tem contato com água de esgoto?		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
7.3. Tem contato com água de alagamento?		<input type="text"/>		<input type="text"/>	



Journal of Infectious Diseases Instructions for Authors

Notice of Page Charges

Page charges for the regular issue are assessed as follows: \$55 per page for the first 6 pages and \$85 for each additional page. The publisher will bill the author concurrently for page charges and reprints. Invited Perspectives, Editorials, and Correspondence related to articles recently published in the *Journal* will not be subject to page charges. In unusual circumstances, the Editor may waive page charges.

The *Journal of Infectious Diseases (JID)* is sponsored by the Infectious Diseases Society of America. Reports of research related to any aspect of the fields of microbiology and infection, whether laboratory, clinical, or epidemiologic, will be considered for publication in *JID*. Major articles and Concise Communications are, in general, peer reviewed; correspondence is reviewed by the Editors.

Submission of the Manuscript

All manuscripts submitted to *JID* must be accompanied by a letter declaring that the manuscript has not been submitted or accepted for publication elsewhere. This letter must be signed by all authors and must warrant that all authors have seen and approved the content and have contributed significantly to the work. A similar letter must accompany a revised submission. Only the corresponding authors of letters to the Editor are required to sign the covering letter.

In matters concerning what appears to be significant overlap between a manuscript submitted to *JID* and another *submitted* manuscript by the same authors (to this or another journal) or such overlap between a submitted *JID* manuscript and one *published* by this or another journal, the Editors will ask the corresponding author to respond to the question of overlap. On the basis of the response, the Editors may choose to consider the manuscript further, ask for modification of the manuscript, or reject the manuscript; in the latter case, the Editors will provide the author(s) with a detailed explanation. If the manuscript is rejected, the Editors may choose to take further action, which could include contacting the appropriate superior at the home institution and/or suspending publishing privileges in *JID* for a designated period of time. If it was found that authors of an article *published* in *JID* had published an overlapping or identical manuscript in another journal, the Editors would publish an announcement to that effect in *JID*.

Written permission must be obtained from all investigators cited in a personal communication who are not coauthors of the present manuscript and from the copyright owner if a previously published table or figure is to be reproduced. All letters of permission should accompany the submitted manuscript. Accompanying the manuscript should be four copies of "in press" references and articles by the same authors on the same subject submitted elsewhere.

Nucleotide sequences must be submitted to the International Nucleotide Sequence Databases prior to acceptance, and the accession numbers must appear in the final revision of the manuscript.

Please submit manuscripts to The Editor, *Journal of Infectious Diseases*, 1910 Fairview Avenue E., Suite 210, Seattle, WA 98102-3603. Include the complete address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author. Each manuscript is assigned a number; the corresponding author will be notified of receipt of the manuscript and of the number assigned. This number should be used in all communications. Authors are encouraged to submit the names, addresses, telephone numbers, and e-mail addresses of 4 persons who potentially could serve as unbiased and expert reviewers for their manuscript, but *JID* reserves the right of final selection. *JID* will return only the original manuscript and figures of papers not accepted for publication.

Manuscript Categories

Major Articles describe original investigations that are an important advance in the field and that have been brought to an acceptable degree of completion. Although there is no length restriction, the text, tables, and illustrations must be limited to the minimum necessary for clear and concise presentation.

Concise Communications present a complete study that is narrower in scope than one in a major article or that represents a new development. Manuscripts that are descriptive or primarily methodologic in nature, that report results of phase I and II vaccine trials, or that describe in vitro chemotherapeutic studies should, in general, be submitted as Concise Communications. Concise Communications include an abstract (≤150 words) and are limited to no more than 2000 words of text, two inserts (tables or figures), and 15 references.

Correspondence (letters). Only correspondence that is submitted in reference to a previous publication in *JID* (within the preceding 12 months) will be considered. Please prepare the letter in manuscript format, including a title page. The letter cannot exceed 750 words of text, one insert (table or figure), and 10 references (no acknowledgments). Please submit one original of the manuscript and a high-density disk for electronic editing; the program and format must be specified. Only the corresponding authors of letters to the Editor are required to sign the letter declaring that the manuscript has not been submitted or accepted for publication elsewhere.

Errata and Announcements can be submitted as hard copy with an electronic version, on a high-density disk, or as e-mail (if no graphics are involved) to dzmirkes@u.washington.edu.

Perspectives are invited and are overviews of articles in *JID* or of other research in infectious diseases.

Editorials may be on any aspect of infectious diseases. They are generally invited, but unsolicited editorials will be considered.

Institutional Reports are summaries of workshops and reports from the National Institutes of Health or the Centers for Disease Control and Prevention. Page charges may be required.

Reviews that are primarily basic in nature will be considered by *JID*. Authors should contact the Editor in advance of submission, to determine whether a specific topic is deemed appropriate and timely. Review articles will be peer reviewed.

Supplements are published by *JID*. Inquiries related to suitability of topic, program organization, and production should be made in writing to the Editor.

News from the Infectious Diseases Society of America carries announcements of interest to the members of IDSA.

JID reserves the right to edit for *JID* style, clarity, precision of expression, and grammar. Authors review these changes at the galley proof stage but must limit their alterations in proof to correcting errors and to clarifying misleading statements.

Manuscript Preparation

JID complies with Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (*Ann Intern Med* 2000;133:229–31 [editorial]; <http://www.icmje.org/>, full text), except reference citations should appear in the text in square brackets (not parentheses). Text, tables, references, and legends must be double-spaced. Either italics or underlining can be used (e.g., genus and species names, genes, proteins but not *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, or *et al.*); see a recent issue of *JID* for style.

Submit the original typescript and three copies with four sets of illustrations. Each set of illustrations (e.g., figures 1–4) should be in an envelope. **All** pages must be numbered. Order Major Articles and Concise Communications as follows: title page, footnotes to the title page, abstract, text, acknowledgment(s), references, figure legends, tables, and figures. **Please include a disk with the text, tables, and figures in separate files.**

Title page. Please supply a running head of not more than 40 characters and spaces, a title of not more than 160 characters and spaces, the names and affiliations of the authors, and a word count of the abstract and of the text. The first name of each author should be spelled out in full; middle initials should be used. If there is potential confusion with respect to whether the first name presented is actually the last name of the author, please identify the last name.

Footnote page. Footnotes must include (1) the name, date (month and year), and location (city, state, and country if not USA) of a meeting at which all or part of the information has been presented (include an abstract number if possible); (2) a statement that informed consent was obtained from patients or their parents or guardians and that human

experimentation guidelines of the US Department of Health and Human Services and/or those of the authors' institution(s) were followed in the conduct of clinical research or that animal experimentation guidelines were followed in animal studies; (3) a statement, if applicable, that an author has a commercial or other association that might pose a conflict of interest (e.g., pharmaceutical stock ownership); (4) sources of financial support (including grant numbers); (5) the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the person to whom proofs and requests for reprints should be addressed; and (6) current affiliations and addresses for authors who have moved since completion of the study.

Abstract. The abstract, one paragraph of *not more than 150 words*, should state the purpose of the research, the methods used, the results, and the conclusions. Write the abstract in third person; do not cite references in the abstract. Authors are reminded that the abstract is of particular value to producers and users of computer-based literature retrieval systems such as MEDLINE.

References. Only works that have been published or accepted for publication can be included. Unpublished observations by the authors, personal communications, and manuscripts submitted for publication should appear as parenthetical expressions in the text, e.g., (unpublished data). Number references in order of appearance; those cited only or first in tables or figures are numbered according to the order in which the table or figure is cited in the text. Example: If table 2 is cited in the text after reference 25, a new reference cited in table 2 will be reference 26.

References must follow the format of the National Library of Medicine as used in *Index Medicus* and "Uniform Requirements" (see above). Provide all authors' (or editors') names when fewer than 7; when 7 or more, list the first 3 and add et al. Titles of journals not listed in *Index Medicus* should be spelled out in full. Reference to a doctoral dissertation should include the author, title, institution, location, year, and publication information, if published. **Accuracy of references is the responsibility of the authors.** Examples of the proper format are as follows:

1. Uherova P, Connick E, MaWhinney S, Schlichtemeier R, Schooley RT, Kuritzkes DR. In vitro effect of interleukin-12 on antigen-specific lymphocyte proliferative responses from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **1996**; 174:483–9.
2. McIntosh K. Diagnostic virology. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, et al., eds. *Fields virology*. 2nd ed. Vol 1. New York: Raven Press, **1990**:411–40.
3. Lyon DJ, Cheng AFB, Norrby SR. Mechanisms of cefotaxime resistance in blood culture isolates of *Enterobacter*—high prevalence of extended-spectrum β -lactamases [abstract C43]. In: Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: American Society for Microbiology, **1995**:47.

Acknowledgment(s). The page preceding the references can include a statement thanking those who assisted substantially with work relevant to the study.

Statistical analysis. The statistical analyses used should be identified both in the text and in all tables and figures where the results of statistical comparison are shown.

Units of measurement. Use degrees Celsius for temperature. The use of SI units is encouraged. All data should be expressed in metric units.

Tables and figures. Data should not be repeated in both a table and a figure. Abbreviations and acronyms used in tables and figures must be explained in the table footnotes and figure legends.

Tables are numbered in the order of appearance in the text. Tables should be typed double-spaced throughout. Vertical and internal rules are not used. Footnotes and accompanying explanatory material should be kept to a minimum. Footnotes should be placed below the table and are designated by superscript lowercase letters (listed in order of location when the table is read horizontally). Each column must have an appropriate heading, and units of measure must be clearly indicated.

Figures that are line drawings (black and white charts and graphs) may be submitted as glossy photographs or as high-quality laser prints on bond paper. Each graph or chart should incorporate a key to the symbols used. Half-tone images (e.g., gels, photomicrographs) must be submitted as glossy photographs. Each print should be clearly labeled with the first author's name and the figure number. Authors must pay the full cost for reproduction of color figures. Photomicrographs should show only the most pertinent area of the material being studied. A micron bar or appropriate scale marking must appear on the figure.

Style. Authors are referred to *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (6th ed. Bethesda, MD: Council of Biology Editors, 1994) and the *Chicago Manual of Style* (14th ed. Chicago: University of Chicago Press, 1993).

For commercially obtained products mentioned in the text, list full names of manufacturers and locations (city, state, and country if not USA). Generic names of drugs and other chemical compounds should be used.

Nomenclature. It is the intent of the Editor to use the latest widely accepted nomenclature. See *Approved Lists of Bacterial Names* (amended ed., American Society for Microbiology, 1989), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed., revised, Williams & Wilkins, 1993) and *Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes* (Academic Press, 1992). Formal terms for virus families, genera, and species should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses: *Virus Taxonomy—The Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Springer-Verlag, 1995). This volume also includes standard abbreviations for virus species. For names and abbreviations of chemical compounds, refer to the *Merck Index* (11th ed., Merck, 1989). The Editors appreciate the assistance of authors and readers who inform them of changes in nomenclature.