



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E**  
**SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

**JÉSSICA DANIELLA DAMASCENO BRANDÃO**

**ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LEPTOSPIROSE EM**  
**PROFISSIONAIS DE LIMPEZA URBANA DO MUNICÍPIO DE MANAUS-AM**

**MANAUS – AM**

**2023**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E**  
**SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

**JÉSSICA DANIELLA DAMASCENO BRANDÃO**

**ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LEPTOSPIROSE EM**  
**PROFISSIONAIS DE LIMPEZA URBANA DO MUNICÍPIO DE MANAUS-AM**

**MANAUS – AM**

**2023**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



**ILMD**

INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE

Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E**  
**SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

**JÉSSICA DANIELLA DAMASCENO BRANDÃO**

**ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LEPTOSPIROSE EM**  
**PROFISSIONAIS DE LIMPEZA URBANA DO MUNICÍPIO DE MANAUS-AM**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração Determinantes Socioculturais, Ambientais e Biológicos do Processo Saúde-Doença-Cuidado na Amazônia.

**ORIENTADOR:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Luciete Almeida Silva.

**MANAUS – AM**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B817e

Brandão, Jéssica Daniella Damasceno

Estudo soroepidemiológico de Leptospirose em profissionais de limpeza urbana no município de Manaus - AM. / Jéssica Daniella Damasceno Brandão. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

113 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciete Almeida Silva.

1. Leptospirose 2. Doença infecto-parasitária I. Título

CDU 616.986.7(811.3)(043.3)

CDD 616.986

22. ed.

**JÉSSICA DANIELLA DAMASCENO BRANDÃO**

**ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LEPTOSPIROSE EM  
PROFISSIONAIS DE LIMPEZA URBANA DO MUNICÍPIO DE MANAUS-AM**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração Determinantes Socioculturais, Ambientais e Biológicos do Processo Saúde-Doença-Cuidado na Amazônia.

**Aprovada em:** 31 / 08 /2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Profa. Dra. Luciete Almeida Silva.

ILMD/FIOCRUZ

Prof<sup>a</sup>. Dra. – Membro Externo Jaqueline Cruz  
Instituto Gonçalo Moniz

Prof<sup>o</sup>. Dr. – Membro Interno Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
ILMD/FIOCRUZ

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que em sua infinita bondade me proporcionou chegar até esse momento, no qual me encontro repleta de gratidão por todas as conquistas alcançadas. E ao mesmo tempo com uma imensa fé dentro do meu coração que me faz acreditar que seja apenas o começo de uma linda trajetória. Agradeço a Nossa Senhora, a qual sou devota, por me guiar em busca dos meus sonhos.

Agradeço a minha família, por todo apoio e incentivo que recebi durante minha trajetória acadêmica. Por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo. Agradeço em especial à minha mãe Graça, por ser fundamental em minha vida. Agradeço a minha querida avó Ana, mesmo não estando mais presente, sei o quanto essa conquista a deixaria feliz. Agradeço às minhas sobrinhas, por transformarem os meus dias com tanto amor e carinho. Agradeço ao meu pai Hevandro e ao meu irmão Heverton, por serem fundamentais em minha caminhada.

Agradeço ao meu namorado Iron, por ser meu porto seguro, diante de todas as situações em que vivenciei. Por sempre estar ao meu lado, me dando forças e me incentivando a cada dia ser melhor e sempre ir em busca dos meus sonhos. Agradeço por segurar minha mão desde o primeiro momento e por todo apoio que recebi nessa reta final do mestrado.

Agradeço à minha orientadora Dra. Salete, por todo aprendizado que me proporcionou. Agradeço aos participantes da minha banca, membros titulares e suplentes, por todo conhecimento agregado à minha trajetória. Agradeço aos pesquisadores do ILMD que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste sonho.

Agradeço aos meus amigos, por todo apoio e auxílio que recebi durante minha jornada acadêmica. Grata por participarem desse momento.

## RESUMO

A leptospirose, doença infecciosa aguda grave, é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que são transmitidas ao homem através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados. É uma zoonose de ampla distribuição mundial, apresentando-se de forma endêmica em algumas localidades e epidêmicas quando fatores climáticos e ambientais são favoráveis a disseminação da bactéria no meio ambiente. É considerada um problema de saúde pública, principalmente no Brasil, por ser uma doença subnotificada e até mesmo negligenciada, apresentando um padrão endêmico que varia de acordo com as características de cada região do país, como o que ocorre no município de Manaus, onde há presença de fatores predispostos para a ocorrência da doença, aliados a questões da vulnerabilidade social. Neste sentido, este estudo teve como objetivo analisar o perfil epidemiológico da leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus, Amazonas. Por ser considerada uma doença de risco ocupacional, atinge diferentes categorias profissionais, principalmente as que estão em contato direto com resíduos contaminados. Através da realização do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), observamos uma soroprevalência de infecção por *Leptospiras* de 15% nessa população, além da prevalência do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, nas amostras analisadas. Para traçar o perfil epidemiológico da leptospirose entre os participantes do estudo, foram realizadas análises descritivas e multivariadas, sobre os fatores de riscos analisados. Vale ressaltar que inquéritos soropidemiológicos são importantes ferramentas utilizadas na saúde pública para implementações de estratégias de prevenção e controle diante das doenças infecciosas.

Palavras-chaves: Leptospirose, Epidemiologia, Prevalência, Fatores de risco e Diagnóstico.

## ABSTRACT

Leptospirosis, a severe acute infectious disease, is caused by bacteria of the genus *Leptospira*, which are transmitted to humans through direct or indirect contact with the urine of infected animals. It is a zoonosis with a wide worldwide distribution, appearing endemic in some locations and epidemic when climatic and environmental factors are favorable to the spread of the bacteria in the environment. It is considered a public health problem, mainly in Brazil, as it is an underreported and even neglected disease, presenting an endemic pattern that varies according to the characteristics of each region of the country, such as what occurs in the municipality of Manaus, where there is presence of predisposing factors for the occurrence of the disease, combined with issues of social vulnerability. In this sense, this study aimed to analyze the epidemiological profile of leptospirosis in urban cleaning professionals in the city of Manaus, Amazonas. As it is considered an occupational risk disease, it affects different professional categories, especially those who are in direct contact with contaminated waste. By performing the Microscopic Agglutination Test (MAT), we observed a seroprevalence of *Leptospira* infection of 15% in this population, in addition to the prevalence of the Icterohaemorrhagiae serogroup, in the samples analyzed. To outline the epidemiological profile of leptospirosis among study participants, descriptive and multivariate analyzes were carried out on the risk factors analyzed. It is worth highlighting that seroepidemiological surveys are important tools used in public health to implement prevention and control strategies against infectious diseases.

Keywords: Leptospirosis, Epidemiology, Prevalence, Risk factors and Diagnosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotografia de microscopia eletrônica de *Leptospira*.

Figura 2: Município de Manaus, Amazonas, Brasil.

Figura 3: Preparação do meio de cultura EMJH.

Figura 4: Meio de cultura armazenado para controle de qualidade.

Figura 5: Preparação para controle de crescimento das *Leptospiras*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos estratégicos para realização das entrevistas e colheita de material.

Tabela 2 – Sorovares de *Leptospira* utilizados como antígenos no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) realizado segundo protocolo preconizado.

Tabela 3: Títulos encontrados em poços até onde houve 50% de aglutinação.

Tabela 4: Análise da quantidade de funcionários por empresa, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Tabela 5: Análise da quantidade de funcionários por faixa etária, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Tabela 6: Análise da quantidade de funcionários por escolaridade, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Tabela 7: Análise da quantidade de funcionários por zonas de moradia, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Tabela 8: Análise da quantidade de funcionários por tempo de função, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Tabela 9: Análise da quantidade de funcionários por realização de treinamentos, recebimento de orientações e utilização de EPIs, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 10: Análise da quantidade de funcionários por mordeduras por ratos, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 11: Análise da quantidade de funcionários quanto ao desconforto, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 12: Análise da quantidade de funcionários quanto ao hábito de se alimentar no local de trabalho e hábitos de lavar as mãos, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 13: Análise da quantidade de funcionários quanto a leptospirose, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 14: Análise da quantidade de funcionários quanto ao destino do lixo, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 15: Análise da quantidade de funcionários quanto a frequência de recolhimento do lixo, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 16: Análise da quantidade de funcionários quanto a existência de lixeiras coletivas, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 17: Análise da quantidade de funcionários quanto a existência de terrenos baldios, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 18: Análise da quantidade de funcionários quanto a existência de ratos no interior e próximos das residências, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 19: Análise da quantidade de funcionários quanto a exposição aos fatores de riscos, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 20: Análise da quantidade de funcionários quanto a limpeza de fossa, caixa de gordura e esgoto, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 21: Análise da quantidade de funcionários quanto a presença de roedores, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 22: Análise da quantidade de funcionários quanto a presença de lixo em terrenos baldios, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 23: Análise da quantidade de funcionários quanto a limpeza de caixas d'água, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 24: Análise da quantidade de funcionários quanto aos sinais e sintomas apresentados, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 25: Análise da quantidade de funcionários quanto a hospitalização e casos anteriores de leptospirose, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Tabela 26: Análise quantitativa quanto a soroprevalência de infecção, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R), por meio do teste exato de Fisher.

Tabela 27: Análise quantitativa quanto ao sorogrupo infectante, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 28: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante L1-130, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 29: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante Akiyami A, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 30: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante Hond Ulrich IV, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 31: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante 3522C, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Tabela 32: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante RGA, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2 PROBLEMÁTICA .....</b>	<b>8</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>10</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
<b>4.1 Histórico .....</b>	<b>10</b>
<b>4.2 Agente etiológico .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.1 Taxonomia .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2.3 Fisiologia e metabolismo .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Reservatórios.....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Cadeias de transmissão .....</b>	<b>15</b>
<b>4.5 Patogenia .....</b>	<b>17</b>
<b>4.6 Imunidade.....</b>	<b>18</b>
<b>4.7 Manifestações clínicas .....</b>	<b>19</b>
<b>4.8 Diagnóstico Laboratorial .....</b>	<b>22</b>
<b>4.8.1 Método direto .....</b>	<b>22</b>
<b>4.8.2 Método indireto.....</b>	<b>23</b>
<b>4.9 Tratamento .....</b>	<b>24</b>
<b>4.10 Prevenção .....</b>	<b>25</b>
<b>5 EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Epidemiologia da leptospirose no mundo.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Epidemiologia da leptospirose no Brasil .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3 Epidemiologia da leptospirose no município de Manaus, Amazonas.....</b>	<b>30</b>
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>6.1 Desenho de estudo.....</b>	<b>32</b>
<b>6.2 Área de estudo.....</b>	<b>32</b>
<b>6.3 População de estudo .....</b>	<b>34</b>
<b>6.4 Seleção dos participantes .....</b>	<b>34</b>
<b>6.5 Colheita de material biológico .....</b>	<b>35</b>
<b>6.6 Questionário .....</b>	<b>36</b>
<b>6.7 Técnicas Laboratoriais.....</b>	<b>36</b>

6.7.1 Meio de cultura .....	36
6.7.2 Controle de qualidade para contaminação .....	37
6.7.3 Controle de qualidade para crescimento de <i>Leptospira</i> .....	38
6.7.4 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT).....	39
6.7.5 Antígenos .....	39
6.7.6 Preparo dos antígenos .....	40
6.7.7 Preparo dos controles do teste .....	41
6.7.8 Preparo para Triagem .....	42
6.7.9 Preparo para Titulação .....	42
6.7.10 Leitura e interpretação .....	43
6.8 Análise estatística.....	44
6.9 Aspectos éticos .....	44
7 Resultados .....	44
7.1 Análise dos fatores de identificação dos profissionais.....	44
7.2 Análise dos fatores de riscos sociais e ambientais.....	46
7.3 Análise do Teste de Aglutinação Microscópica.....	55
7.3.1 Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Linhagem L1-130 .....	56
7.3.2 Autumnalis, Autumnalis, Linhagem Akiyami - A .....	56
7.3.3 Canicola, Canicola, Linhagem Hond Ulrich IV .....	57
7.3.4 Cynopteri, Cynopteri, Linhagem 3522C .....	57
7.3.5 Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae, Linhagem RGA.....	58
8 DISCUSSÃO .....	58
9 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Leptospira*, pertencentes à ordem *Spirochaetales* e a família *Leptospiraceae* (LEVETT, 2015). É causada por uma bactéria helicoidal (espiroqueta), no qual se conhecem 17 espécies patogênicas, sendo a mais importante, a *L. interrogans*. A unidade taxonômica básica é o sorovar (sorotipo) (PICARDEAU, 2017). Existem mais de 300 sorovares, identificados cada um com seus hospedeiros preferencias, ainda que uma espécie animal possa albergar um ou mais sorovares (BRASIL, 2017).

As *leptospiras* acometem diversos animais domésticos e selvagens que atuam como reservatórios para a persistência dos focos de infecção. Nas áreas urbanas, os roedores sinantrópicos são os principais disseminadores da doença, pois são capazes de abrigar as bactérias nos rins de forma assintomática, sendo apenas portadores (THIBEAUX et al., 2018). A transmissão ocorre de modo acidental por meio do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, sendo uma das zoonoses de maior distribuição geográfica no mundo, predominante em regiões de clima tropical e países em desenvolvimento, por sua relação direta com fatores comportamentais e socioambientais (HAAKE; LEVETT, 2015).

A ocorrência da doença é cosmopolita, sendo variável em diferentes partes do mundo, podendo ser observada tanto de forma esporádica quanto endêmica. A incidência anual estimada de leptospirose ultrapassa 1 milhão de casos no mundo, com aproximadamente 59.000 mortes (COSTA et al., 2015). Nos países em desenvolvimento, a doença é associada a veiculação hídrica, os surtos estão relacionados principalmente as atividades ocupacionais, elevada densidade demográfica da população, precárias condições de saneamento básico, além do fator climático (LEE et al., 2018).

Nos países desenvolvidos está relacionada a grupos de riscos, como veterinários, mineiros, agricultores, trabalhadores de saneamento/esgoto, de matadouro, de pecuária e até mesmo militares, além de algumas atividades de lazer que incluem, canoagem, jardinagem, golfe, natação (DAY; CALDERWOOD, 2018). No Brasil, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública, principalmente por ser uma doença negligenciada, com uma distribuição endêmica, tornando-se epidêmica nas capitais e

regiões metropolitanas, principalmente durante os períodos chuvosos, onde há uma elevação nos números de casos da doença (BRASIL, 2017).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2022) sobre o levantamento epidemiológico da leptospirose no país, no período de 2010 a 2020, foram confirmados 39.270 casos da doença, com uma média anual de 3.734 casos, apresentando variações entre 1.276 casos (2020) e 4.390 casos (2011). Nesse mesmo período houve registros de 3.419 óbitos, com média de 321 óbitos/ano e uma letalidade média de 8,7%, com um coeficiente médio de incidência de 2,1/100.000 habitantes, com predomínio em áreas urbanas.

Na região amazônica, a estrutura ecológica e o clima tropical são favoráveis a disseminação das leptospiras e conseqüentemente a ocorrência da leptospirose, principalmente por suas condições de temperatura e umidade, características próprias da zona equatorial (BRASIL, 2017). A cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, assim como outras cidades da região, apresenta características ecológicas e ambientais bastante favoráveis a disseminação da bactéria. O período intenso de chuvas na região foi previamente associado ao aumento do número de casos de leptospirose, indicando forte associação entre a elevação dos índices pluviométricos com o aumento do número de casos. Por ser uma doença subnotificada, os dados oficiais não revelam a real magnitude do problema enfrentado em Manaus (HOMEM, 2001).

A leptospirose tem sido considerada historicamente como uma doença de risco ocupacional (AGAMPODI et al., 2014) demonstrando que o âmbito profissional é de suma relevância para a epidemiologia da doença (BRASIL, 2010). A maioria dos casos de leptospirose ainda ocorrem entre indivíduos que trabalham ou residem em ambientes com pouca, ou nenhuma infraestrutura sanitária e até mesmo que são expostos à urina de roedores (BRASIL, 2019).

Algumas profissões são mais favoráveis ao contato com a *Leptospira*, como profissionais de limpeza urbana, desentupidores de esgotos, catadores de materiais recicláveis, bombeiros, agricultores, tratadores de animais pescadores, médicos veterinários dentre outros, devido à realização de suas atribuições em locais prováveis de infecção pela bactéria (LARA et al., 2014). Sendo assim, o serviço de coleta de lixo e

limpeza das vias urbanas, expõem diariamente os profissionais a situações de vulnerabilidade, devido à falta ou uso inadequado de equipamento de proteção individual (EPI), facilitando a probabilidade de adquirirem infecção por leptospirosas, além da exposição aos riscos pelo contato direto com materiais contaminados (MCBRIDE, 2005).

Portanto, estudos epidemiológicos sobre a leptospirose humana são ferramentas essenciais para se obter informações para a implementação de estratégias de prevenção e controle da leptospirose nessa população de grande vulnerabilidade. Conhecimento epidemiológico pode ainda auxiliar no diagnóstico e consequentemente na eficácia do tratamento individual. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo soroepidemiológico de leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus, Amazonas.

## **2 PROBLEMÁTICA**

A leptospirose é considerada um problema de saúde pública, por ser uma doença bastante disseminada e negligenciada, apresentando caráter endêmico em algumas regiões, tornando-se epidêmica, em algumas épocas do ano, com altos índices de casos da doença, principalmente em áreas com precários investimentos em infraestrutura sanitária, aglomerados populacionais, presença de roedores e até mesmo exposição ocupacional, aumentando a vulnerabilidade dessa população a suscetível infecção por *Leptospiras* (BRASIL, 2017).

No Brasil, a transmissão do agente etiológico no meio é facilitada devido à grande população de roedores, considerados importantes disseminadores das bactérias no meio, acúmulo de lixo, devido à precariedade em investimentos como saneamento básico e pelo clima tropical úmido. Esses fatores, aliados as estações chuvosas e as inundações, favorecem a disseminação e a persistência das *Leptospiras* em várias regiões do país. (BARCELLOS et., 2008).

Em Manaus, assim como em outras cidades da região norte, a explosão demográfica e o crescimento desordenado da cidade resultaram em problemas socioambientais, que contribuíram para redução da qualidade de vida da população, com reflexos diretos nas condições de saúde, higiene e moradia. Além disso, os períodos de

chuva forte e constante que causam enchentes e inundações aumentam o risco de contaminação por parte da população em risco. Em tais situações, a urina dos ratos, presentes essencialmente em bueiros, valas e esgotos, misturam-se à enxurrada e à lama, elevando assim o risco de transmissão ao ser humano. Segundo a experiência da vigilância epidemiológica no Brasil, dentre as principais ocorrências epidemiológicas, após as inundações, destaca-se: o aparecimento de surtos de doenças infecciosas, particularmente a leptospirose e de doenças de transmissão hídrica (BRASIL, 2019).

Visando essa vertente foi abordada a seguinte pergunta norteadora: Qual o perfil epidemiológico da leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus? Para responder a essa pergunta fez-se necessário obter mais informações sobre os fatores de risco associados à doença a fim de evitar seu grande impacto na saúde pública. Nesse sentido, os resultados desta pesquisa poderão revelar novos fatos e obter informações para a implantação de estratégias de prevenção e controle da leptospirose nessa população de grande vulnerabilidade.

Embora haja uma vasta literatura sobre leptospirose humana no Brasil, existe uma deficiência de estudos na cidade de Manaus sobre inquéritos que avaliam a incidência e prevalência dessa doença e sua relação com aspectos sociais e espaço urbano, em especial, os casos envolvendo profissionais responsáveis pela limpeza urbana da cidade. Por ser uma doença negligenciada, esse projeto visa traçar o perfil epidemiológico da leptospirose, bem como, analisar os fatores de riscos associados a doença em profissionais de limpeza urbana. Um melhor entendimento da ocorrência da infecção por *Leptospira* nesta cidade, permitirá a revisão das medidas de controle que beneficiará não só os responsáveis pela coleta de lixo urbano, bem como toda população exposta.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar o perfil epidemiológico da Leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus-AM.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a soroprevalência de infecção por *Leptospira* em profissionais da limpeza urbana do município de Manaus.
- Identificar o sorogrupo prevalente entre os profissionais envolvidos no estudo.
- Identificar fatores de riscos ambientais e sociais para a presença de anticorpos aglutinantes contra a *Leptospira* entre os profissionais.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Histórico

A leptospirose humana foi mencionada pela primeira vez por volta de 1880, no Cairo, Egito, pelo médico militar francês Larey, através da observação de manifestações clínicas em combatentes, como febre e icterícia, cujas causas eram desconhecidas. Em 1883, uma descrição semelhante foi realizada por Landauzy, através da observação dos sintomas de funcionários da limpeza de esgoto em Paris, a qual denominou “Tifo Hepático grave” (FAINE et al., 1999).

A descrição da doença ocorreu pela primeira vez em 1886, pelo médico patologista alemão Adolf Weil, em Heidelberg. Weil ficou conhecido por descrever detalhadamente a sintomatologia de 4 casos clínicos em seres humanos da doença, denominando-a como “icterícia infecciosa” (SIMÕES et al., 2016).

Em 1887, Goldschmidt, utilizou pela primeira vez o termo “Síndrome de Weil”, considerada a forma mais grave da leptospirose humana, sendo bastante relacionada com doença ocupacional, já que nesse período, a maioria dos afetados era trabalhadores da limpeza de esgotos das grandes cidades (WHO, 2003). Atualmente os casos de leptospirose, denominados por Síndrome de Weil, apresentam como manifestações clínicas, complicações multiorgânicas, cursando com icterícia clinicamente manifesta, quadros de insuficiência renal aguda e acometimento pulmonar, presentes geralmente os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* (FAINE et al., 1999).

Em 1907, Simon visualizou pela primeira vez a *Leptospira* (bactéria espiroqueta, causadora da leptospirose), em cortes histológicos de um rim humano, supostamente acometido por febre-amarela, utilizando da coloração de prata, foi possível a identificação de espiroquetas nos túbulos renais. Simon observou que esses organismos apresentavam forma espiralada, possuindo ganchos em suas extremidades e na forma de pontos de interrogação, sendo denominadas por ele como *Espirochaeta interrogans* (FAINE; STALLMAN, 1982).

O agente etiológico causador da leptospirose foi isolado pela primeira em 1914, no Japão, por Inada e colaboradores. Através da inoculação de sangue de pacientes com Síndrome de Weil em cobaias foi possível comprovar a natureza contagiosa da doença, demonstrando ser causada por bactérias espiroquetas, as quais denominaram de *Spirochaeta icterohaemorrhagica*. Em 1917, a equipe japonesa demonstrou que os ratos eram considerados portadores renais da *Leptospira*, possibilitando a investigação sobre o ciclo de transmissão da doença (SAMBASIVA et al., 2003).

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre leptospirose foram publicados em 1917, por Aragão, após identificar a presença de *Leptospira Icterohaemorrhagica*, ao estudar seis ratos na cidade do Rio de Janeiro (OLIVEIRA, 2008). Em 1963, estudos publicados por Magaldi sobre incidência, prevalência e distribuição da leptospirose, alertaram para tendência de proliferação da espiroqueta no país, demonstrando como o Brasil era suscetível para proliferação da *Leptospira* (BARBOSA, 1972). Porém, foi a partir de 1942, que as primeiras relações entre animais domésticos e roedores foram estabelecidas, demonstrando a importância desses animais quanto reservatórios naturais das *Leptospiras* (AZEVEDO; PALMEIRO, 1972).

## **4.2 Agente etiológico**

### **4.2.1 Taxonomia**

A leptospirose é causada por bactérias pertencentes a ordem Spirochetales e a família Leptospiraceae que compreendem o gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Segundo GOMES (2015), o gênero *Leptospira* foi dividido tradicionalmente em duas

espécies, levando em consideração características fenotípicas, relação sorológica e patogenicidade, sendo elas: *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa*.

A *L. interrogans*, compreende todas as cepas patogênicas e a *L. biflexa* compreende todas as cepas saprofitas isoladas do ambiente, geralmente não associadas a doença. Através da identificação por meio de aspectos sorológicos, as espécies são divididas em vários sorovares, com grupos que apresentam antígenos semelhantes (BRITO; DIAMANTE; LOMAR, 2009).

Os sorovares que apresentam similaridades antigênicas foram agrupados em sorogrupos, sendo que atualmente já foram descritos mais de 250 sorovares patogênicos, distribuídos em aproximadamente 25 sorogrupos. A classificação dos sorovares e sorogrupos, pode ser baseada através da detecção de anticorpos aglutinantes, antígeno específico e o teste de aglutinação microscópica (MAT). Cepas que apresentam pequenas diferenças antigênicas, foram classificadas como pertencentes ao mesmo sorovar (WHO, 2003).

De acordo com BRASIL (2016) cada tipo de sorovar tem preferência por determinado hospedeiro e cada hospedeiro pode abrigar mais de um tipo de sorovar. Cada sorovar pode apresentar diferentes formas clínicas no homem, desde assintomáticas, até as mais graves, que levam o paciente a óbito. Casos mais graves estão geralmente associados com os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* da espécie *Leptospira interrogans*.

#### **4.2.2 Morfologia**

O agente etiológico responsável pela leptospirose é a *Leptospira* spp., um micro-organismo aeróbico, helicoidal, móvel, com uma ou ambas as extremidades encurvadas, ou em forma de gancho, conforme representa a figura 1. Acomete humanos e animais, sendo que ambos participam da cadeia epidemiológica como portadores assintomáticos, doentes e reservatórios, além de ser as únicas espiroquetas patogênicas que podem viver no ambiente livremente fora dos seus reservatórios (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

Morfológicamente essas bactérias apresentam de 6-20  $\mu\text{m}$  de comprimento com 0,1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem dois filamentos axiais (flagelos periplasmáticos), com inserções polares que se encontram no espaço periplasmático, possibilitando a execução de 3 tipos de movimentos: ao redor do eixo central, progressivo e circular, sendo os únicos microrganismos que atravessam os filtros com uma porosidade em torno de 0,22  $\mu\text{m}$ , possibilitando sua excreção renal (NELSON e COUTO, 2010).

O formato helicoidal cilíndrico, em conjunto com a movimentação dos dois flagelos periplasmáticos, possibilitam que essas bactérias penetrem ativamente nos tecidos do hospedeiro, por um movimento denominado de abridor de garrafas (OIE, 2014).

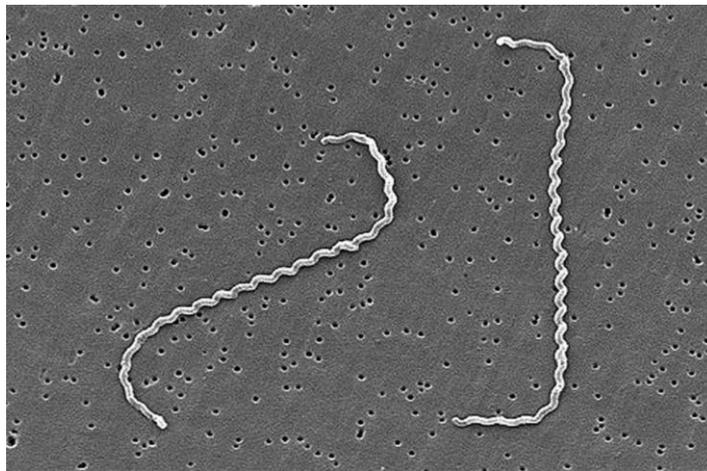


Figura 1- Fotografia de microscopia eletrônica de *Leptospira* (adaptado de [https://pt.wikipedia.org/wiki/Leptospira\\_interrogans](https://pt.wikipedia.org/wiki/Leptospira_interrogans)).

#### 4.2.3 Fisiologia e metabolismo

As *Leptospiras* são bactérias aeróbicas obrigatórias, se reproduzem por fissão binária transversal, apresentam um ótimo crescimento em meios com pH ligeiramente alcalino (7,2 -7,6), na faixa de temperatura em torno de 28° a 30 °C. Produzem catalase e oxidase, tendo seu crescimento ideal observado entre 6 e 14 dias, variando em meio líquido (ABGUEGUEN, 2014).

As bactérias utilizam como única fonte de carbono, os ácidos graxos de cadeia longa, e são metabolizadas por beta-oxidação, se multiplicam lentamente e são bastante

exigentes quanto ao meio de cultura, precisando ser suplementados com soro de coelho e albumina sérica bovina (BSA) (MURRAY et al., 2004).

As *Leptospiras* são organismos que não apresentam resistência a desinfetantes químicos e são facilmente destruídas pela desidratação e por altas temperaturas, entre 50° e 60 °C. São inibidas em pH ácido, abaixo de 6.0, porém se adaptam ao frio e sobrevivem ao congelamento a -80 °C durante meses. O tempo de sobrevivência das bactérias em água varia conforme temperatura, pH, salinidade e grau de poluição (ADLER et al., 2010).

No meio ambiente, as *Leptospiras* patogênicas não conseguem se multiplicar, mas podem sobreviver por até 180 dias em água ou em solo que apresentam um pH alcalino em torno de 6.8 a 7.4, com salinidade baixa e ausência de radiação ultravioleta. No entanto, estas bactérias apresentam uma transmissão facilitada através da água, o que confere uma boa adaptação ao meio e uma constituição genética favorável que lhe permite sobreviver em diversos ambientes (RADOSTITS et al., 2007).

O genoma das *Leptospiras* são constituídos por dois cromossomos circulares e são considerados grandes quando comparados aos de outras espiroquetas. A dimensão de seus cromossomos revela alta capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros e reservatórios, assim como alta capacidade de sobrevivência em diversos ambientes. Além desses fatores, podem formar agregados celulares e biofilme, características que conferem sua sobrevivência fora do organismo hospedeiro (SAMBASIVA et al., 2003).

### **4.3 Reservatórios**

As *Leptospiras* são organismos capazes de infectar uma variedade de mamíferos selvagens e domésticos, como bovinos, suínos, canídeos, equinos, ovinos e caprinos, tendo uma menor incidência em felinos. No entanto, os principais reservatórios das *Leptospiras* são ratos urbanos e até mesmo pequenos roedores silvestres, capazes de eliminar o microrganismo por meio da urina por toda sua vida, sendo considerados, portadores assintomáticos universais. Esses reservatórios são capazes de excretar altas concentrações de *Leptospiras* no ambiente, cerca de 10<sup>7</sup> microrganismos por mililitro (mL), em um período constituído por meses após a infecção (DAMASCO; MENEZES; FRIEDRICH, 2015).

Os organismos destes animais abrigam as espiroquetas nos túbulos proximais renais, sendo eliminadas na urina de mais de 160 espécies de mamíferos, incluindo algumas aves e até mesmo répteis no meio ambiente. Qualquer mamífero pode ser infectado com um dos 260 sorovares que compõem a espécie patogênica, conhecida como *L. interrogans* (VIEIRA; GAMA; COLLARES, 2006). No entanto, a sobrevivência desses animais às *Leptospiras* se dá por mecanismos de tolerância imunitária, tornando-se assintomáticos e eliminando os microrganismos continua ou intermitentemente na urina (CINCO, 2010).

O reconhecimento de uma espécie animal como reservatório está relacionada com o padrão epidemiológico de transmissão e nesse caso o rato é considerado o reservatório mais importante para *Leptospiras* (LEVETT, 2001). Esse mecanismo, em associação com à elevada capacidade de reprodução dos roedores, o contato mais próximo com o ser humano, no ambiente doméstico ou peridoméstico, confere a esses reservatórios importante função diante da manutenção e disseminação dessas bactérias no meio ambiente (COLLARES et al., 1997).

Os roedores sinantrópicos são conhecidos como os principais reservatórios da *Leptospira* no meio urbano, sendo o *Rattus norvegicus* (ratazanas ou ratos-de-esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato-preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita). Esses animais, ao se infectarem, são portadores assintomáticos e abrigam as bactérias nos rins e eliminando-as vivas através da urina no meio ambiente, atuam como veículo de contaminação para água, solo e alimentos que entrem em contato com as espiroquetas (BHARTHI et al., 2003).

De acordo com JOAQUIM et al., (2016), grande parte dos inquéritos de investigações epidemiológicas realizadas no Brasil, apontam que o contato direto ou até mesmo indireto com os roedores sinantrópicos estão relacionados como a principal via de transmissão das *Leptospiras* ao homem.

#### **4.4 Cadeias de transmissão**

A transmissão da *Leptospira* pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre, através do contato com a urina, sangue, tecidos ou órgãos de animais infectados. Já a forma indireta ocorre através do contato com a água, solo úmido ou vegetação contaminados (RIBEIRO et al., 2003). A transmissão pode ocorrer através das mucosas nasal, oral, conjuntival, anal, genital, pele lesionada ou até mesmo com pele íntegra se imersa por longos períodos em água ou lama contaminada (BHARTI et al., 2003). De acordo com BRASIL (2010) a transmissão entre humanos é considerada rara e até mesmo sem muita relevância epidemiológica.

A penetração da *Leptospira* acontece por meio da pele ou mucosas lesionadas ou até mesmo em pele íntegra se imersa em água ou lama contaminadas pela bactéria por longos períodos, demonstrando a importância do elo hídrico na transmissão da *Leptospira*, já que a grande maioria das contaminações ocorre pelo meio hídrico (HINES, 2014). Após a penetração ativa nos organismos, as leptospiros atingem a corrente sanguínea e são transportadas para todas as partes do corpo, multiplicando-se rapidamente e rompendo pequenos vasos sanguíneos (BIAZOTTI, 2006).

O risco de contrair infecção por *Leptospiras* aumenta consideravelmente quando comparado as condições ambientais, pois são favoráveis a disseminação das bactérias no meio, principalmente após enchentes em locais onde há falta de infraestrutura adequada em saneamento básico. De acordo com DINIZ (2011), o aumento no número de casos da doença no Brasil, está relacionado aos períodos chuvosos e mais quentes do ano, geralmente ocorrendo entre os meses de dezembro e março. As enchentes associadas aos períodos intensos de chuva e precárias condições de saneamento básico são responsáveis pelos casos de leptospiroses em regiões endêmicas, assim como, exposições ocupacionais, recreacionais ou cotidianas também estão relacionados aos casos de infecção (FAINE, 1999).

Além disso, na zona urbana os grupos populacionais mais propícios à infecção por *Leptospiras* são os trabalhadores ou moradores que residem em áreas sujeitas a inundações, que se encontram em locais com baixo investimento em políticas públicas, possivelmente em contato direto ou indireto com a urina de animais infectados. Animais domésticos também podem estar associados a essa cadeia de transmissão, porém os roedores sinantrópicos são considerados os principais reservatórios da doença (CAMPOS

et al., 2010). Na zona rural, é possível adquirir leptospirose, através do contato direto com animais infectados, como bovinos, ovinos, suínos, equinos, cães e até mesmo animais silvestres, que eliminam a bactéria pela urina favorecendo a contaminação da água, alimentos, solo e possíveis contaminações ao ambiente (SEGURADO; CASSENOTE; LUNA, 2016).

Existem também situações em que há maior probabilidade de o homem adquirir infecção por *Leptospiras*, relacionadas a certas práticas ocupacionais em locais propensos a infecção, como os profissionais que atuam nos serviços de limpeza de esgoto e caixa d'água, saneamento ambiental, catadores de lixo, profissionais de limpeza urbana, veterinários, agricultores, pescadores, dentre outros que apresentam contato direto com ambientes contaminados (BRASIL, 2016).

#### **4.5 Patogenia**

Após a penetração do agente pelas mucosas e pele lesionadas, ou até mesmo pele íntegra se imersa por longos períodos em água ou lama contaminadas, as *Leptospiras* se dispersam na corrente sanguínea e imediatamente alcançam diversos órgãos e tecidos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Rapidamente se estabelece uma infecção sistêmica, pois esses microrganismos são capazes de atravessar as barreiras epiteliais, disseminando-se por todo corpo. Entretanto, as *Leptospiras* apresentam certa predileção por determinados órgãos como, fígado, rins, coração e musculatura esquelética (DIAMENT; LOMAR; BRITO, 2015).

Após romper com mecanismos de defesa não específicos do organismo, as bactérias ao atingirem a corrente sanguínea multiplicam-se no sangue, na linfa, no fluido cerebral espinal e circulam por todos os tecidos, caracterizando a fase aguda da doença, conhecida como leptospirose. Nessa fase os órgãos alvos atingidos pelas *Leptospiras* são rins e fígado, podendo desenvolver um quadro clínico com lesão aguda e insuficiência renal e até mesmo lesão nas células do fígado (SILVA, 2007). Na corrente sanguínea, essas bactérias conseguem driblar as células fagocíticas e multiplicar-se a cada 8 horas (TULSIANI et al., 2010). De acordo com SILVA (2007) durante o período de invasão dos tecidos, a infecção por *Leptospiras* causa um estado de infecção generalizada no organismo.

A descrição clínica dessa fase cursa com lesões mecânicas em pequenos vasos sanguíneos, o que resulta em hemorragias e até mesmo trombos, ocasionando possíveis infartes teciduais. O rompimento desses capilares possibilita a migração das bactérias para os espaços extracelulares, pela ação mecânica do microrganismo dentro da parede dos vasos sanguíneos. Esse processo acontece devido aos fatores de virulência da bactéria, como as lipoproteínas e proteínas de membrana externa (FAGUNDES, 2008). É notado o quadro de icterícia no paciente, principalmente devido à lesão hepática, causada pelo rompimento dos hepatócitos, assim como a insuficiência renal, devido a problemas de filtração nos rins, caracterizando o quadro agudo da doença, com duração média de 4 dias, dificilmente persiste até o 7 dia de sinais e sintomas (GARCIA; MARTINS, 2011).

Com a evolução da infecção, ocorre o processo de reação imunitária do hospedeiro, definida como a fase imune ou tardia da doença. Nessa fase há notável crescimento de anticorpos devido à presença das *Leptospiras* em locais de difícil acesso no organismo, formando complexo de bactérias nas câmaras do glóbulo ocular, interior dos túbulos renais e do sistema reprodutivo, sendo possível verificar imunidade humoral insistente ou em níveis baixos. A presença desses microrganismos nos túbulos renais indica a fase de eliminação das leptospiras pela urina, conhecida como leptospirúrica, por volta do sétimo ao décimo dia da doença (ALCINDO, 2010). A ausência de fagócitos no filtrado glomerular possibilita que essas bactérias se multipliquem nos túbulos contorcidos renais, formando microcolônias de *Leptospiras*, eliminadas através da urina dos reservatórios, por períodos compreendidos entre dias e até mesmo anos (ACHA; SZYFRES, 2003).

#### **4.6 Imunidade**

A imunidade relacionada a leptospirose é do tipo humoral, na qual, anticorpos específicos opsonizam as *Leptospiras*, para que neutrófilos e macrófagos realizem a fagocitose desses microrganismos. São digeridas nos vacúolos dos macrófagos e a fagocitose acontece por ação dos neutrófilos através da opsonização devido à presença de anticorpos (HAAKE et al., 2002).

Na leptospirose, a resposta humoral é do tipo clássica, apresentando um pico inicial de anticorpos da classe IgM, seguido pelo crescimento acelerado de anticorpos da classe IgG, sendo que os anticorpos IgG permanecem por muito mais tempo do que os anticorpos IgM. Nas respostas imunológicas, os elevados níveis de IgM são detectados durante os primeiros dois meses da infecção. Já anticorpos da classe IgG são observados por volta do décimo quinto dia após os primeiros sinais e sintomas da doença e permanecem por um período de 9 meses, sendo utilizado como um bom marcador epidemiológico (SAMBSIAVA et al., 2003).

A fase leptospirêmica tem duração média de uma semana e sua resolução coincide com o aparecimento de anticorpos. Devido ao aumento na produção dos anticorpos, as bactérias são eliminadas da corrente sanguínea e dos órgãos. Após o período de 1 a 3 dias, sem manifestação sintomatológica pelo paciente, ocorre a fase leptospirúrica, caracterizada pela eliminação das bactérias na urina e o surgimento dos primeiros anticorpos da classe IgM anti-leptospira (FAINE et al., 1999).

No entanto, todo organismo em contato com ambiente contaminado por *Leptospiras* é suscetível a infecção por leptospirose, após a infecção o organismo adquire imunidade do tipo sorovar-específica, sendo esse tipo de imunidade específica por sorovar. Por isso, o mesmo indivíduo pode desenvolver a doença mais de uma vez se o agente causador for diferente em cada infecção (BRASIL, 2016).

De acordo com estudos de EVANGELISTA e COBURN (2010) o principal mecanismos de imunidade na infecção por leptospirose é a chamada resposta humoral, mediada por anticorpos, atuando nos mecanismos de resistência natural. Foram notados em soros de pacientes que adquiriram as formas graves da doença, a presença de anticorpos das classes IgM e IgG, observados mesmo após anos de infecção (CUMBERLAND et al., 2001).

#### **4.7 Manifestações clínicas**

A leptospirose é uma doença que apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas, desde suas formas assintomáticas até as formas mais graves, que afetam diversos órgãos, podendo levar o paciente a óbito (ELKHOURY et al., 2009). A

virulência da cepa infectante está diretamente relacionada a evolução clínica da doença, assim como aspectos de susceptibilidade do hospedeiro, idade e estado imunológico, já que certos sorovares como Icterohaemorrhagiae e Copenhageni estão associados aos casos mais graves da doença (CHIRATHAWORN; KONGPAN, 2014).

A leptospirose pode apresentar sinais e sintomas comuns, como febre de início abrupto, cefaleia, mialgia intensa, sendo notadamente nas panturrilhas e coxas, calafrios e sufusão (derrame) conjuntival. Também pode apresentar sintomas variados como febre bifásica (dois picos), exantema do palato (caracterizada como uma erupção cutânea localizada no céu da boca), anemia hemolítica, meningite, hemorragia na pele e nas membranas mucosas, insuficiência hepática e renal, icterícia, confusão mental e até mesmo comprometimento pulmonar, com ou sem hemoptise (expectoração com sangue proveniente do pulmão) (BRASIL, 2016).

A doença pode assumir duas formas clínicas distintas: a forma anictérica e a forma ictérica. Dentro dessas duas formas, é possível acompanhar duas fases distintas: a fase leptospirêmica/septicêmica e a fase leptospirúrica/imunológica. No processo inicial de infecção, as *Leptospiras* penetram no organismo, multiplicam-se na corrente sanguínea e desaparecem gradualmente da circulação, migrando para os tecidos. Ao atingirem os tecidos, esses microrganismos irão se disseminar por diversos órgãos, principalmente os rins, multiplicando-se e causando severas consequências as células do epitélio tubular. Em contrapartida, ocorre a produção de anticorpos específicos em resposta a imunidade humoral, e posterior excreção da bactéria pela urina, conferindo o desaparecimento dos sinais e sintoma da doença (WHO, 2003).

Na forma clínica anictérica, a infecção cursa com a fase leptospirêmica com duração de 3 a 7. Nessa fase é possível a detecção das *Leptospiras*, nos tecidos e órgãos, a partir do terceiro dia, através do isolamento do microrganismo no sangue do paciente. A doença inicialmente manifesta-se pela instalação de um quadro febril abrupto, seguido geralmente por cefaleia, mialgia, especialmente nas panturrilhas, calafrios, prostração, diarreia, náusea, vômito e mal-estar, dor abdominal, dores retro orbitais, fotofobia, bem como hepatomegalia, sufusão conjuntival dentre outros sinais e sintomas inespecíficos (LEVETT et al., 2001). O sinal clínico caracterizado por sufusão conjuntival é descrito como um achado importante, podendo aumentar a suspeita por leptospirose,

principalmente em pacientes que apresentam um quadro febril abrupto (DAY; CALDERWOOD, 2018).

Na forma clínica ictérica, ocorrem os casos mais graves da doença, descritos na Síndrome de Weil, cuja evolução clínica é do tipo rápida e progressiva, sendo caracterizada por complicações multisistêmicas, associadas com a localização das *Leptospiras* dentro dos tecidos, cursando com febre, icterícia, insuficiência renal aguda, insuficiência hepática, insuficiência pulmonar grave, meningite e hemorragia, podendo ocorrer também alterações no estado de consciência (SLACK, 2010).

Segundo EVANGELISTA e COBURN (2010), em todos os órgãos afetados pelas *Leptospiras* são observadas lesões vasculares e teciduais. A icterícia rubínica típica dessa fase se dá em decorrência da elevação dos níveis séricos de bilirrubina, por conta dos danos hepatocelulares e ruptura das junções intercelulares entre hepatócitos. Ocorre elevação moderada nos níveis séricos de transaminases e fosfatase alcalina. Nota-se que a elevação das taxas de bilirrubina sérica com taxas normais das transaminases é característica de leptospirose (AHMED; SHAH; AHMAD, 2005).

A insuficiência renal aguda causada pela doença, na forma não-oligúrica e até mesmo hipocalêmica, apresenta uma nefrite túbulo-intersticial, com edema intersticial e infiltrados celulares no túbulo intersticial (YANG; WU; PAN, 2001). Outra complicação importante em decorrência da doença é a insuficiência pulmonar hemorrágica, que consiste no desenvolvimento de hemorragias intra-alveolar associadas a falência respiratória (HELMERHORST et al., 2012).

A maioria dos casos de leptospirose apresentam quadros assintomáticos, podendo surgir sinais e sintomas inespecíficos durante o período de incubação, que varia de 7 a 14 dias. Por esse motivo, a doença apresenta um amplo diagnóstico diferencial, sendo confundida com outras patologias infecciosas, ou até mesmo como “virose”, devido às suas características inespecíficas da fase aguda (SEGURADO; CASSENOTE; LUNA, 2016). Mesmo que a maioria dos pacientes infectados apresentam a forma mais branda da doença, um conjunto de aproximadamente 5 a 15% desses pacientes, podem evoluir para casos mais graves (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). De acordo com

DOUDIER et al. (2006) a taxa de mortalidade envolvendo as formas graves da doença varia em torno de 15 a 40% dos casos.

#### **4.8 Diagnóstico Laboratorial**

A leptospirose é inespecífica em seus sinais e sintomas, podendo ser confundida com outras doenças infecciosas, como dengue, febre amarela, febre maculosa e hantavirose, por apresentar um amplo quadro de manifestações clínicas, que envolvem febre, cefaleia e mialgia, principalmente no início da infecção, dificultando seu diagnóstico (BRASIL, 2014). Geralmente, os sinais e sintomas, em conjunto com a história epidemiológica, não são suficientes para diagnosticar a doença, sendo necessário à confirmação laboratorial (KOURY; SILVA, 2006).

Comumente, na fase precoce da doença, fase conhecida como leptospirêmica, as bactérias podem ser encontradas no sangue, LCR e em diversos órgãos e tecidos do paciente infectado. Na fase tardia, conhecida como fase imune, anticorpos específicos circulantes podem ser detectados, devendo-se levar em consideração a fase em que o paciente se encontra para escolha do método laboratorial (VIEIRA, 2006).

Quanto aos métodos para diagnóstico da leptospirose podem ser realizadas demonstrações diretas, para identificação das *Leptospiras* em amostras de sangue e urina ou demonstrações indiretas, por meio da detecção de anticorpos específicos contra *Leptospiras* (VINETZ, 2001). A confirmação do diagnóstico da doença é de fundamental importância para a evolução do tratamento, a fim de prevenir as manifestações mais graves com acometimento multisistêmicos de órgãos e tecidos, que podem levar o paciente a óbito (KOURY; SILVA, 2006).

##### **4.8.1 Método direto**

O método direto envolve a microscopia, a cultura e amplificação do DNA. A visualização direta das *Leptospiras* pode ser realizada por meio da microscopia de campo escuro em amostras de sangue e urina, possibilitando a identificação de características básicas como morfologia e motilidade. Entretanto, esse método apresenta baixa

sensibilidade e a identificação desses microrganismos só é possível nos primeiros dias de infecção, durante a fase leptospirêmica (LEVETT, 2001).

O isolamento das *Leptospiras* em meios de cultura são considerados padrão ouro para o diagnóstico direto da leptospirose. Entretanto, por apresentar um crescimento fastidioso é necessário que os tubos sejam examinados semanalmente por um prazo de até 13 semanas. Já que o isolamento da *Leptospira* possibilita o diagnóstico definitivo da infecção, contribuindo para estudos epidemiológicos e profiláticos (SILVA, 2007).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método utilizado para detecção e amplificação do DNA específico das leptospiras do soro, urina, humor aquoso e tecidos de vários órgãos. Os resultados são positivos na fase em que a bactéria está presente na corrente sanguínea, por volta da primeira semana de infecção. A partir da segunda semana, as *Leptospiras* e os fragmentos de DNA, passam a ser encontrados na urina do paciente. Com a técnica de PCR é possível realizar a identificação do microrganismo leptospiras antes mesmo da detecção dos anticorpos (FRAGA, 2009).

#### **4.8.2 Método indireto**

Como método indireto mais utilizado para detecção de anticorpos específicos contra *Leptospira*, o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) é o teste preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo considerado padrão ouro para o diagnóstico da leptospirose, por ser extremamente sensível e altamente específico (GOMES, 2011). No MAT, as diluições seriadas do soro do paciente são submetidas a uma bateria de *Leptospiras* vivas para observar presença de aglutinação em microscopia de campo escuro (MONTEIRO, 2003). A técnica requer uma bateria de *Leptospiras* com diferentes cepas, para manutenção da diversidade de estirpes de referência, além de profissionais especializados para realização da técnica (FRAGA, 2009).

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática – ELISA IgM é utilizado para detecção de anticorpos IgM específicos anti-*Leptospira*, utilizando soro sanguíneo. Com o ELISA IgM é possível diferenciar os anticorpos IgM e IgG, baseado na especificidade antígeno e anticorpo e na sensibilidade de reações enzimáticas. A sensibilidade do teste está relacionada com alguns fatores, o kit utilizado e o momento em que a amostra foi

coletada, sendo possível a detecção dos anticorpos anti-*Leptospira* a partir da primeira semana de início dos sinais e sintomas. Entretanto, o teste apresenta restrições, pois detecta somente a presença de anticorpos anti-*Leptospira*, por esse motivo sua utilização não é recomendada para identificação de sorogrupo e nem de sorovar (MELO et al., 2010).

#### **4.9 Tratamento**

O tratamento da leptospirose envolve a administração de antibióticos e o uso de ações terapêuticas de suporte, importantes para controlar a evolução da doença. O uso de antibióticos é indicada nas duas fases da doença, precoce e tardia, apresentando uma boa eficácia na primeira semana de início dos sintomas (BRASIL, 2014). A terapêutica utilizada precisa levar em consideração a gravidade da infecção e visa, controlar o processo de infecção antes da doença causar lesões em órgãos como, rim ou fígado (HAAKE; LEVET, 2015). No geral, os casos em que apresentam sintomatologia leve, devem proceder com tratamento assintomático, e para os casos mais graves são indicados internações e tratamento dirigido (KOBAYASHI, 2001).

Na fase precoce da doença, em que o paciente apresenta sintomatologia leve, são recomendados a administração de fármacos como amoxicilina (por via oral, de 5 a 7 dias), doxiciclina (por via oral, de 5 a 7 dias) ou azitromicina (por via oral, por 3 dias) (CUNHA et al., 2008). Na fase precoce ou tardia, em que o paciente apresenta sintomatologia moderada a grave, são recomendados a administração de penicilina G cristalina intravenosa por 7 dias, ampicilina intravenosa por 7 dias, ceftriaxona intravenosa por 7 dias ou até mesmo cefotaxima intravenosa por 7 dias (DAY; CALDERWOOD, 2018). Durante o período de tratamento, pode ocorrer reação de Jarish-Herxheimer, devido à ação das toxinas liberadas pela lise das bactérias por conta da ação medicamentosa. Considerada uma reação rara, apresenta febre, cefaleia, calafrio, mialgia e exantemas, tendo como tratamento secundário o uso de anti-inflamatórios para amenizar a reação (DAMASCO; MENEZES; FRIEDRICH, 2015).

A conduta terapêutica da leptospirose representa um aspecto importante para a evolução do tratamento da doença. Em casos de manifestações clínicas leves, a conduta pode ser realizada ao nível ambulatorial, com tratamento sintomático, como hidratação e

repouso, estabelecendo um retorno ao hospital a cada dois a três dias para acompanhamento clínico do paciente (BRASIL, 2016).

Em caso de manifestação clínica moderada a grave é necessário hospitalização para monitoramento e estabilização clínica. Em quadros de insuficiência renal, recomenda-se a hidratação como medida de suporte para o controle do caso. Já em quadros de insuficiência renal oligúrica, recomenda-se a diálise para evitar complicações fatais. Nos casos envolvendo hemorragia pulmonar recomenda-se a ventilação mecânica como medida de suporte, aliada ao internamento em uma unidade intensiva para acompanhamento do caso (KOBAYASHI, 2001). Outro importante procedimento como medida terapêutica de suporte, refere-se ao controle das hemorragias, com utilização de protetores gástricos, assim como reposição sanguínea e de hemoderivados (DIAMENT; LOMAR; BRITO, 2015).

#### **4.10 Prevenção**

No Brasil, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública por ser bastante disseminada, principalmente em épocas de chuva (BRASIL, 2014). Aspectos sociais e econômicos influenciam diretamente na incidência da doença, principalmente a ausência de políticas públicas como saneamento básico, precárias condições de habitação e presença de roedores infectados pela bactéria. Tais fatores, associados aos períodos intensos de chuva, favorecem a disseminação do agente causador da leptospirose no ambiente, possibilitando a infecção (SOUZA et al., 2011).

As estratégias de prevenção devem atuar nas fontes de contaminação e nos fatores de riscos e são baseadas na vigilância epidemiológica e nos mecanismos de transmissão (PELLISSARI et al., 2011). A prevenção da doença envolve um conjunto de medidas tanto sanitárias quanto higiênicas, com a intenção de conter a disseminação das bactérias no meio ambiente e realizar o controle nos reservatórios, para ser possível a prevenção individual e ambiental (GENOVEZ, 2011).

Na prevenção individual é necessário informar e sensibilizar a população sobre as formas de transmissão da doença, assim como propor melhorias nas condições de trabalho dos profissionais expostos diariamente a resíduos propensos a contaminação, incluindo o

uso dos equipamentos de proteção individual (EPI), além de evitar contato com água e lama provenientes das enchentes e após contato com material contaminado lavar bem as mãos (VIEIRA; GAMA; COLLARES, 2006).

Na prevenção ambiental são necessárias ações que contribuam com a saúde pública, como recolhimento e destino correto do lixo produzido, drenagem nos locais propícios a inundações em épocas de chuvas, construção de redes de água e esgoto adequada, além de investimentos em saneamento básico (GUIMARÃES et al., 2014).

Segundo ESTEVES et al., (2014), o controle dos reservatórios também é uma importante medida de prevenção em áreas de risco, assim como a identificação dos animais infectados para poderem ser controlados os possíveis surtos da doença. A imunização de animais susceptíveis a bactéria também é uma medida que precisa ser avaliada, já que reduz a contaminação e transmissão da leptospirose humana. Entretanto, a imunização em humanos contra leptospirose no Brasil, ainda não está disponível pelo Programa Nacional de Imunização do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2014).

A falta de conhecimento sobre os impactos da leptospirose na saúde pública acaba postergando a criação de medidas mais efetivas para o controle da doença, principalmente a falta de informações acerca dos aspectos socioambientais envolvidos nesse processo, contribuindo para o descaso da doença (SOUZA et al., 2011). Dessa forma, a educação em saúde, apresenta-se como um fator decisivo no controle e prevenção da doença, sendo possível obter informações sobre o problema e buscar soluções para que a leptospirose não cause tantos impactos negativos na vida da população (BRASIL, 2002).

## **5 EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE**

A leptospirose é uma doença infecciosa de ampla distribuição mundial, que afeta tanto humanos quanto animais, ocorrendo em regiões urbanas e rurais de diferentes partes do mundo (LEVETT, 2001). A epidemiologia da doença está associada com a área geográfica, o clima e os fatores de sobrevivência do microrganismo no meio ambiente. É uma doença de caráter sazonal, apresentando maiores picos nos meses do verão e do outono, em regiões temperadas e em regiões de clima quente, o pico de incidência dos

casos ocorre durante os períodos chuvosos, sendo a temperatura um fator importante para disseminação das bactérias (COSTA et al., 2015).

Quando se trata da disseminação das *Leptospiras*, nota-se que a prevalência de sorovariedade das cepas nas regiões dependem de fatores como, tipos de reservatórios, condições climáticas e geográficas, associadas a fatores ocupacionais e recreativos. Tem-se notado também surtos da doença após períodos intensos de chuva com inundações em diferentes partes do mundo, revelando a importância do elo hídrico na transmissão do agente etiológico (NETO, 2010).

### **5.1 Epidemiologia da leptospirose no mundo**

A leptospirose é uma doença endêmica na maioria dos países, podendo ser notificada durante o ano todo ou apresentar caráter sazonal, incidindo principalmente em épocas de chuva ou em períodos de elevadas temperaturas (WHO, 2003).

Em países em desenvolvimento da região da Ásia, a doença é associada a veiculação hídrica, os surtos estão relacionados principalmente as atividades ocupacionais, elevada densidade demográfica da população, precárias condições de saneamento básico, além do fator climático (VICTORIANO et al., 2009). Em algumas regiões, como na China, entre os anos de 2005 e 2015 houve uma diminuição dos números de casos da doença em todo país, porém a população jovem e na idade produtiva ainda são os mais afetados (DHEWANTARA et al., 2018).

Nos países considerados desenvolvidos, a doença está relacionada aos grupos de riscos como, veterinários, mineiros, agricultores, trabalhadores de saneamento, limpeza e esgoto, de matadouro, de pecuária e até mesmo militares, além de algumas atividades de lazer que incluem, canoagem, jardinagem, golfe e natação, devido ao contato direto ou indireto com água, lama e solo contaminados com a urina de animais infectados pela bactéria (COSTA et al., 2015). Em algumas regiões da Europa no século passado, também houve uma redução na incidência da doença e atualmente ainda há relatos de casos nas áreas urbanas de países industrializados (DUPOUEY et al., 2014). Segundo achados apontados por ALLAN et al. (2015), a leptospirose ocorre com maior frequência no

continente africano do que em outras localidades, com estimativa de 750.000 pessoas doentes por ano.

Na América Latina, a leptospirose é caracterizada como uma doença negligenciada, pois apresenta informações irrelevantes nos sistemas de vigilância e notificação dos casos. Possui uma incidência elevada em regiões com pouco ou nenhuma infraestrutura, afetadas pelas inundações das fortes chuvas e desastres ambientais. Considerada também como uma doença de risco ocupacional, por afetar trabalhadores em contato direto ou indireto com resíduos contaminados com a urina de animais infectados (SCHNEIDER et al., 2017).

Estimativas globais apontam que anualmente ocorrem mais de 1 milhão de casos da doença e em média 58.900 mortes por leptospirose, sendo que a prevalência dos infectados são do sexo masculino, na faixa etária produtiva predominante entre os 20 aos 49 anos, associados a atividades ocupacionais (DAY; CALDERWOOD, 2018).

## **5.2 Epidemiologia da leptospirose no Brasil**

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, porém nos meses de maior pluviosidade, a doença se torna epidêmica. Apresenta elevada incidência de casos nas capitais e regiões metropolitanas, por conta da alta taxa de densidade populacional de pessoas com baixa renda, aliados as precárias condições de moradia, falta de investimentos em políticas públicas, como saneamento básico, escassas redes de esgoto, acúmulo de lixo urbano, propiciando aumento na infestação por roedores, favorecendo assim o contato com humanos. A maioria dos casos relatados da doença estão relacionados as pessoas que moram ou trabalham em regiões que apresentam tais características (BRASIL, 2016).

Nos anos de 2007 e 2016 a incidência média anual de leptospirose no Brasil atingiu a taxa de 2.0/100 mil habitantes, apresentando uma letalidade anual média de 8,9%. Todos os estados brasileiros apresentaram casos da doença, porém os maiores índices ocorreram nas regiões Sul e Sudeste do país (BRASIL, 2016).

Entre o período de 2009 a 2019 foram confirmados no país 41.602 casos de leptospirose, com 3.583 óbitos e letalidade de 8,6%, apresentando incidência em torno de 19,8/100 mil habitantes. No mesmo período, a região Nordeste, apresentou 6.335 casos confirmados da doença, com 792 óbitos e letalidade de 12,5%, apresentando incidência de 11,1/100 mil habitantes. Na Bahia foram confirmados 1.327 casos, com 177 óbitos e letalidade de 13,3%, apresentando incidência de 8,9/100 mil habitantes. Nesse mesmo período, o estado de São Paulo registrou 8.054 casos confirmados da doença, apresentando o maior número de casos no país. Já o maior risco de adoecimento por leptospirose, foi no estado do Acre, apresentando incidência de 445,7/100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

Entre o período de 2010 a 2020, foram confirmados no país 39.270 casos da doença, apresentando média anual de 3.734 casos, com variações de 1.276 casos em 2020 e 4.390 casos em 2011. Com relação ao número de óbitos, foram registrados 3.419 óbitos, apresentando uma média de 321 óbitos/ano e uma letalidade média em torno de 8,7%, com coeficiente médio de incidência de 2,1/100 mil habitantes (BRASIL, 2022).

Registros históricos apontam que o maior número de casos da doença foi registrado nas regiões Sul e Sudeste, entre os casos confirmados, os mais atingidos na população são do sexo masculino (80%) na faixa etária entre os 20 aos 49 anos (60%). Nota-se que não há predisposição relacionada a gênero ou idade quando se relata infecção pelo agente etiológico e desenvolvimento da doença. A maioria dos locais de provável infecção ocorrem em áreas urbanas (80%), notadamente em ambientes domiciliares (41%) e até mesmo em localidades de trabalho (17%) (BRASIL, 2023).

No país, atualmente a leptospirose apresenta taxa de letalidade média de 9%, em se tratando de casos mais graves, essa taxa pode atingir até 40%, com elevada incidência em determinadas regiões (BRASIL, 2023). Estudos apontam que no primeiro trimestre do ano, grande parte das cidades brasileiras apresentam chuvas intensas, associadas a precárias condições de infraestrutura sanitária e alta infestação por roedores, principalmente nas zonas mais carentes das cidades, configurando o cenário propício para a ocorrência da doença.

De acordo com dados do Sinan, no Brasil, foram registrados 564 casos confirmados de leptospirose, no período de novembro de 2022 a fevereiro de 2023, indicando associação entre os elevados índices pluviométricos com o surgimento dos casos. Dentre eles, 21,28% pertencem ao estado de São Paulo, 17,20% ao estado do Paraná, 15,96% ocorreram em Santa Catarina, 10,28% em Rio Grande do Sul, 9,75% em Minas Gerais, 4,26% no Rio de Janeiro e 4,08% ocorreram na Bahia (BRASIL, 2023).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (2023), até 28 de fevereiro de 2023, ocorreram 1.908 registros de casos suspeitos da doença na plataforma do Sinan, destes foram confirmados um total de 224 casos. De acordo com indícios de controle da leptospirose no país, as primeiras semanas de 2023, apresentaram um padrão endêmico da doença, já que o número de casos notificados e o número de casos confirmados da doença estão dentro dos perfis de normalidade – dentro da curva mediana e abaixo do limite superior. Porém, para cada região do país, esse padrão endêmico pode ser modificado, de acordo com fatores predispostos para a ocorrência da doença.

Conforme o Ministério da Saúde (2018), o perfil epidemiológico da população brasileira afetada pela doença indica maior infecção entre adultos jovens, predominantemente do sexo masculino, moradores das áreas urbanas, infectados via exposição ocupacional. A relação é que os casos da doença ocorram devido à exposição direta dessa população com fatores que propiciam a infecção, principalmente atividades ocupacionais e/ou contato com água e lama contaminadas em épocas chuvosas, com alertas eminentes de alagamentos e inundações.

De fato, algumas atividades ocupacionais acabam facilitando o contato com a bactéria causadora da leptospirose, principalmente atividades desenvolvidas por trabalhadores de limpeza urbana das grandes cidades e profissionais de desentupimento de fossas e esgotos, catadores de lixo, pescadores, bombeiros, veterinários, agricultores, dentre outros (BRASIL, 2022).

### **5.3 Epidemiologia da leptospirose no município de Manaus, Amazonas**

No município de Manaus, assim como em toda a região norte do país, as características ambientais e sociais, contribuem para a ocorrência de casos de

leptospirose. Porém, a doença ainda é subnotificada, e os dados oficiais não revelam a real situação do problema (FREITAS; GIATTI, 2015).

De acordo com análises de dados secundárias realizadas sobre casos da doença no município de Manaus, entre os anos de 2000 a 2010, foram registrados 665 casos de leptospirose, destes 339 foram confirmados e 35 deles evoluíram para óbito (10,3%). Sabe-se que os dados oficiais geralmente expressam a forma mais grave da doença, já que a forma mais branda, por apresentar sinais e sintomas inespecíficos, pode ter seu diagnóstico confundido com o de outras doenças comuns na região, sendo assim, subnotificada (JESUS et al., 2012).

No que se refere ao perfil epidemiológico, a maior concentração de casos, registrados juntamente a óbitos, pertencem ao sexo masculino, na faixa etária dos 14 aos 44,9 anos, traçando um perfil na capital amazonense com predominância de adultos jovens do sexo masculino. A maioria dessa população adquiriu a infecção ao realizar atividades recreativas ou ocupacionais. Sendo que destes, 87,05% possuem apenas o ensino fundamental completo, convivem em precárias situações sanitárias e apresentam uma baixa renda (JESUS et al., 2012).

Estudos realizados por Soares e colaboradores (2010), revelam que os índices pluviométricos elevados na região são um fator importante para o aumento do número de casos de leptospirose. De acordo com dados oficiais, a maioria dos casos é notificada nos meses em que há maior concentração de chuva, de março a maio. Sendo que em Manaus, o maior número de casos já registrados ocorreu no ano de 2009, quando houve a maior enchente já registrada no município, com inundações em diversas localidades residenciais, resultando em 63 casos confirmados da doença.

Quanto a distribuição de casos da doença, todas as zonas apresentaram ocorrência, com maior predominância, respectivamente, na zona sul (26,64%), oeste (23,52%) e leste (19,72%). Sendo assim, as maiores taxas de soropositividade (73,7%), se concentram em áreas próximas das duas bacias hidrográficas dos rios São Raimundo e Educandos. Quando analisada a residência da população com maior incidência de casos, percebe-se que o fator socioeconômico das famílias é fator crucial para o risco de exposição ao agente, já que são moradias localizadas em áreas com pouca ou nenhuma infraestrutura,

aliados a falta de investimentos em políticas públicas, o que favorece o acúmulo de lixo nas principais vias, contribuindo para o aparecimento de roedores, que representam o principal elo de transmissão da doença (FREITAS; GIATTI, 2015).

Manaus, capital do estado do Amazonas, apresenta um cenário endêmico para leptospirose, já que há detecção de diferentes sorovares em indivíduos assintomáticos, apresentando uma prevalência de infecção em torno de 4,3%, apesar de ser uma das taxas mais baixas de inquérito sorológicos no Brasil (com taxas que variam entre 9,7 a 28,5%), deve ser levado em consideração a subnotificação dos casos juntamente com a população a ser avaliada (LIMA et al., 2012).

Sabe-se que as condições socioambientais da cidade, contribuem diretamente para a ocorrência de infecção por mais de um tipo de sorovar, que são evidenciadas ao analisar a diversidade de reservatórios infectados, o ambiente propício para circulação de *Leptospiras*, assim como fatores relacionados a exposição de água contaminada, contato com a urina de animais infectados, além das condições ambientais apresentadas pela região e as atividades recreativas e ocupacionais desenvolvidas pela população (CASTRO et al., 2011).

Além desses fatores, a subnotificação dos casos pode estar relacionada a baixa procura por parte da população acometida pelos serviços de saúde, a demora no atendimento médico e até mesmo ao despreparo na identificação da doença por falta de suspeita clínica, já que esta apresenta um amplo diagnóstico diferencial, podendo ser confundida com outras doenças (FREITAS; GIATTI, 2015).

## **6 MATERIAIS E MÉTODOS**

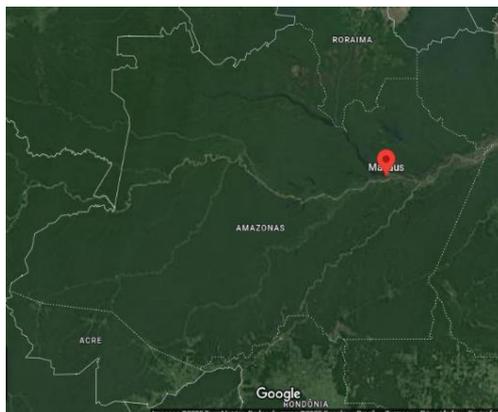
### **6.1 Desenho de estudo**

Trata-se de um estudo epidemiológico, transversal, descritivo e de diagnóstico, com abordagem quantitativa, para analisar o perfil soropidemiológico da Leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus-Amazonas.

### **6.2 Área de estudo**

O estudo foi realizado no município de Manaus, localizado no estado do Amazonas, na margem esquerda do Rio Negro, conforme indica figura 2. Possui área territorial de 11.401,092 km<sup>2</sup>, densidade demográfica de 181,00 habitante por km<sup>2</sup> e população estimada de 2.063.547 habitantes, segundo dados do IBGE (2022).

Figura 2: Município de Manaus, Amazonas, Brasil. Fonte: Google maps, 2022.



Manaus, capital do estado do Amazonas, está dividida em seis zonas geográficas: Centro-Oeste, Centro-Sul, Leste, Norte, Oeste e Sul, distribuídos em aproximadamente 63 bairros (SEPLAN-CTI, 2015). O clima é do tipo equatorial úmido, com faixas de temperatura média anual entre 23,3 e 31,4°, valores mínimos e máximos respectivamente. Apresenta duas estações distintas: a chuvosa, que se estende de dezembro a maio, e a seca entre junho e novembro, com umidade do ar alta e índice pluviométrico médio anual de 2.300 mm (COSTA et al., 2013).

A cidade de Manaus possui condições ecológicas favoráveis à disseminação de leptospiros e conseqüentemente a ocorrência da leptospirose, por suas características de umidade e temperatura, condições próprias da zona equatorial (HOMEM, 2001). Além da implantação da Zona Franca de Manaus (ZFM), na década de 1970, que favoreceu ao crescimento acelerado da população. Como consequência da explosão demográfica e crescimento desordenado, Manaus acumulou problemas socioambientais que influenciaram diretamente na qualidade de vida da população, como redução nas condições de saúde, higiene e moradia (VELLOSO, 2002).

Para compor a área de estudo foram selecionadas 4 empresas que prestam serviços de limpeza urbana na cidade, sendo elas: Mamute, Marquise, Tumpex e Prefeitura,

empresas com atuação predominante no segmento de coleta, transporte e disposição final de resíduos sólidos. Atualmente, o sistema de limpeza pública na cidade movimenta cerca de 3 mil trabalhadores que atuam com serviços à população, garantindo o acesso aos serviços de limpeza urbana por meio da implementação da política de limpeza pública em condições adequadas através do uso dos seguintes métodos: serviços de coleta, serviços de limpeza pública realizados diretamente pela secretaria municipal de limpeza urbana e também por empresas contratadas por licitação (SEMULSP, 2023).

### **6.3 População de estudo**

Para compor a população de estudo, foram convidados profissionais provenientes das empresas que prestam serviços de limpeza pública na cidade.

Como critério de inclusão, foram escolhidos apenas os profissionais que trabalham diretamente na limpeza urbana. A participação destes se deu através assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (em anexo), seguido da colheita de sangue para realização de testes sorológicos e da aplicação de questionários e entrevistas para traçar o perfil epidemiológico da leptospirose nessa população de estudo.

### **6.4 Seleção dos participantes**

Foram selecionados 719 profissionais, provenientes das empresas acima mencionadas, que aceitaram participar desta pesquisa. A escolha desses profissionais se justifica por exercerem suas atividades ocupacionais em ambientes onde a disseminação das *Leptospiras* é facilitada. Sabe-se que a leptospirose é considerada como doença de risco ocupacional, por envolver trabalhadores em contato direto ou indireto com resíduos contaminados com a urina de animais infectados (SCHNEIDER et al., 2017).

Para esta seleção foram realizadas visitas alternadas, durante os meses de abril, maio e junho do ano de 2019, nos turnos matutino e vespertino, com duração de aproximadamente 3 meses. Os locais escolhidos para seleção foram sugeridos pelas próprias empresas, de acordo com seus pontos de coleta, dispondo de ambiente estratégico para encontro dos participantes e realização das etapas do cronograma, conforme a Tabela 1.

<b>Ponto</b>	<b>Local de Coleta</b>
Ponto 01	localizado no Aterro Sanitário – AM010 – empresa Marquise
Ponto 02	localizado no Bairro da Paz – empresa Mamute
Ponto 03	localizado na Balsa do Centro – empresa Mamute
Ponto 04	localizado na Feira da Manaus Moderna – Mamute
Ponto 05	localizado na Garagem Aparecida – empresa Prefeitura
Ponto 06	localizado na Garagem Centro – empresa Prefeitura
Ponto 07	localizado na sede Marquise – Avenida Torquato Tapajós
Ponto 08	localizado na Ponta Negra – empresa Mamute
Ponto 09	localizado na Praça da Matriz – empresa Mamute
Ponto 10	localizado na sede Tumpex – Avenida Torquato Tapajós
Ponto 11	localizado na Vila Olímpica – empresa Mamute

Tabela 1: Pontos estratégicos para realização das entrevistas e colheita de material.

## 6.5 Colheita de material biológico

Para a colheita do material biológico, foi realizado a identificação dos profissionais, através do preenchimento de dados pessoais em protocolos, seguido pela anamnese realizada pelas profissionais da saúde atuantes no projeto aos participantes, enquanto foram repassadas informações acerca dos procedimentos, incluindo a assepsia no local de colheita.

Após o cumprimento dessas etapas foi realizada a colheita de 2 ml de sangue por punção venosa com agulhas hipodérmica estéril de 25x0,7mm acopladas a seringas descartáveis de 10 ml, sendo as amostras colocadas em tubos com ativador de coágulo + gel, para que o sangue coagulasse mais rapidamente, e após a coagulação, o gel realizasse a separação física entre a porção celular e a líquida – soro, ideal para análise.

Todas as amostras sanguíneas foram armazenadas e transportadas sob condições de biossegurança, sendo acondicionadas no Laboratório Geral de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane, localizado na Rua Terezina,

476 – Adrianópolis, Manaus – AM, 69057-070. As amostras foram conservadas em freezers a uma temperatura de -80 °C para realização de exames sorológicos.

## 6.6 Questionário

Foram realizadas entrevistas simples, através da aplicação de questionários com perguntas multifatoriais aos profissionais participantes do estudo sobre indicadores socioambientais, emprego, ocupação e exposição a fontes de contaminação ambiental (REIS et al., 2008).

Foi preenchido um questionário epidemiológico pelos participantes, contendo variáveis como nome, data de nascimento, sexo, idade, raça/cor, gestação, estado civil, escolaridade, renda familiar, endereço, principal fonte de abastecimento de água na casa, destino do lixo da residência, frequência de recolhimento do lixo pela prefeitura, existência de lixeiras coletivas e terrenos baldios próximo das residências, existência de ratos dentro e próximo das residências, função do entrevistado, tempo de trabalho na empresa, treinamento para assumir cargo exercido, orientações e informações sobre risco no trabalho, utilização de equipamentos de proteção individual – EPIs, mordida de ratos durante jornada de trabalho, desconforto durante rotina ocupacional, realização das refeições no local de trabalho, lavagem das mãos após término das atividades, infecção por *Leptospira*, imersão prolongada em água ou lama de enchente, banho de rio ou igarapé, limpeza de fossa/ esgoto / caixa d'água, presença ou sinais de roedores no perímetro domiciliar, ocorrência de situação de risco no local de trabalho, sinais e sintomas (febre, icterícia, diarreia, alteração cardíaca, prostração, insuficiência renal, mialgia, dor na panturrilha, cefaleia e outros) e ocorrência de hospitalização (apêndice).

## 6.7 Técnicas Laboratoriais

### 6.7.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado no estudo foi o EMJH (Ellinghausen – McCullough - Johnson – Harris) preparado para receber as linhagens das cepas de *Leptospira* recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), provenientes do Laboratório

de Referência Nacional de Leptospirose do IOC – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

A preparação do meio de cultura seguiu todas as etapas indicadas de acordo com protocolo padronizado (em anexo), enriquecido com albumina bovina e soro de coelho inativado a uma temperatura de 56 °C por 30 minutos. De acordo com protocolo, foram realizados todos os procedimentos indicados para preparação do meio, como indica a figura 3.

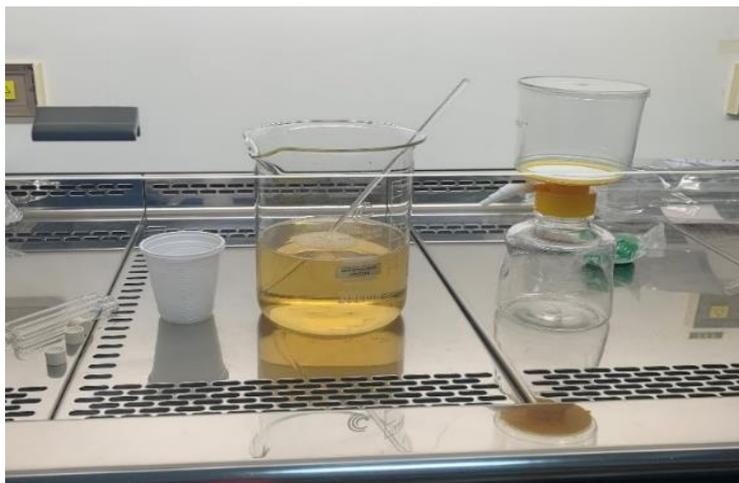


Figura 3: Preparação do meio de cultura EMJH.

Fonte: Acervo pessoal.

### 6.7.2 Controle de qualidade para contaminação

Dos frascos preparados do meio EMJH, foram retiradas alíquotas de 5 ml para controle de qualidade e verificação de contaminação. Essas alíquotas foram armazenadas em estufas a 37 °C e observados o meio que está no tubo a olho nu e campo escuro para presença de contaminação, por um período de 2 semanas. Após esse prazo, não havendo contaminação do meio, considerava-se o lote de meio de cultura ideal para uso, podendo seguir com a próxima etapa descrita no protocolo.

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo), como indica a figura 4.

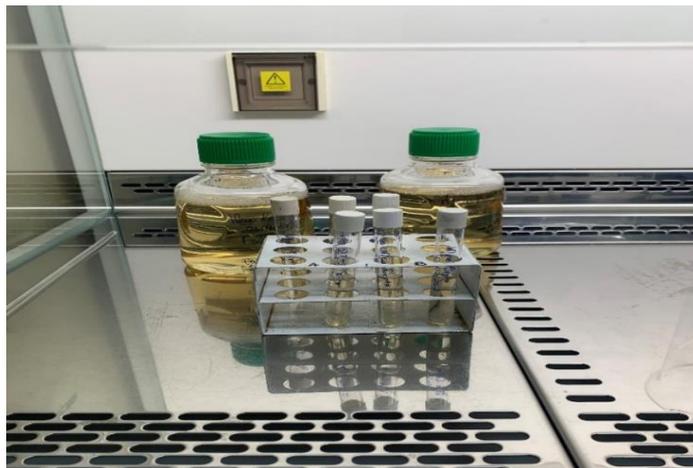


Figura 4: Meio de cultura armazenado para controle de qualidade.  
Fonte: Acervo pessoal.

### 6.7.3 Controle de qualidade para crescimento de *Leptospira*.

Para o controle de qualidade para o crescimento de *Leptospira* foram utilizados 5 mL do meio de cultura EMJH, distribuídos em 38 tubos de Falcon, seguido do repique de 1 mL de cada uma das cepas em duplicatas, provenientes da bateria disponibilizada pelo Laboratório de Referência Nacional de Leptospirose do IOC – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Após a distribuição, as amostras foram incubadas na estufa para posterior visualização.

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo), como indica a figura 5.

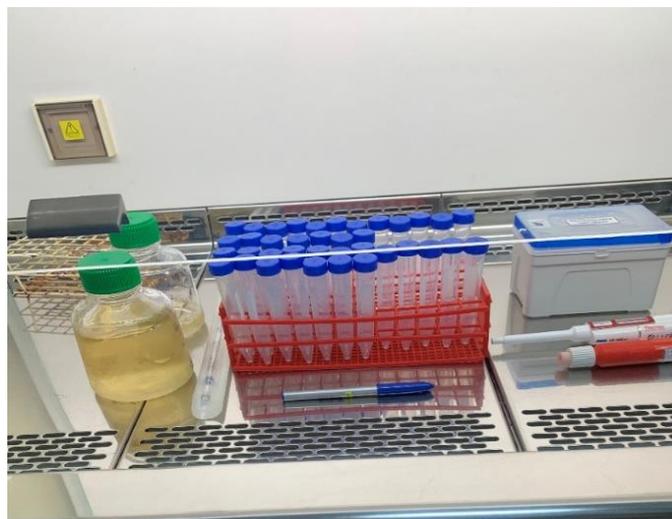


Figura 5: Preparação para controle de crescimento das leptospiros.  
Fonte: Acervo pessoal.

#### **6.7.4 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT).**

Para a realização do diagnóstico sorológico da leptospirose, foi utilizado o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) técnica considerada padrão ouro, para detecção de anticorpos circulantes no paciente, utilizado para confirmação dos casos de leptospirose, além de identificar provável sorogrupo infectante, já que a técnica consiste em utilizar um painel de sorovares representantes dos principais sorogrupos circulantes nas localidades estudadas (OMS, 2003).

As culturas de antígenos vivos utilizadas no MAT devem estar entre quatro a sete dias de crescimento e apresentar-se livres de auto aglutinação (REIS et al., 2008). A primeira triagem iniciou-se com as diluições de 1:50 e 1:100 das amostras de soro. Como critério para amostras positivas foi considerada a presença de aglutinação em mais de 50% das leptospiras. Para os soros no qual foi observado aglutinação a uma diluição de 1:100, essas amostras eram posteriormente tituladas para determinar o maior título de aglutinação.

As amostras utilizadas foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos, a uma temperatura de 4° C, para melhor separação do soro e do plasma. As amostras foram acondicionadas em microtubos (ependorf) de 1,5 ml, devidamente identificadas. A realização do teste de aglutinação microscópica ocorreu no Laboratório Geral de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane, localizado na Rua Terezina, 476 – Adrianópolis, Manaus – AM, 69057-070.

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo).

#### **6.7.5 Antígenos**

Para a realização do teste de aglutinação microscópica (MAT), foram utilizadas culturas vivas, compondo uma bateria com 5 antígenos vivos, correspondentes aos sorovares de *Leptospira*, apresentados na Tabela 2. A escolha dessa bateria se justifica devido a estudos realizados por SILVA et al., 2016 no qual foi evidenciado a soroprevalência da leptospirose humana em áreas de risco para disseminação da doença em Manaus, sendo analisadas 1000 amostras de soro sanguíneo de pessoas assintomáticas, moradores de áreas que apresentavam condições propícias à infecção.

Destas análises, foram identificados os sorovares mais frequentes detectados no município de Manaus. Outro indicador na escolha dos antígenos foram os estudos realizados por CRUZ et al. (2022), apresentando um estudo de coorte prospectivo na comunidade de Pau da Lima, favela localizada em Salvador, Bahia, sendo possível a identificação de um sorovar mais prevalente na região, o sorovar *Copenhageni* linhagem Fiocruz L1-130.

As culturas utilizadas no teste devem ser acondicionadas em meio de cultura EMJH enriquecido com suplementos (REIS et al., 2008). Para o teste 5ml do meio de cultura foram armazenados em tubos Falcon (15ml) juntamente com as culturas, incubados a 28 °C em estufa bacteriológica.

Após controle de qualidade, não havendo contaminação dos meios de cultivo, eram realizadas as culturas das *leptospiras*, através do repique de 500 ml da cepa em 5 ml do meio EMJH suplementado, incubadas em estufa a uma temperatura de 28 °C para crescimento das cepas.

As culturas que apresentavam contaminação após análises macroscópicas e microscópicas, eram consideradas contaminadas e descartadas. Presença de floculações e microrganismo eram considerados como critério de contaminação.

Tabela 2 – Sorovares de *Leptospira* utilizados como antígenos no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) realizado segundo protocolo preconizado

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SOROGRUPO</b>	<b>SOROVAR</b>	<b>CEPA</b>
CLEP 00001	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	L1 130
CLEP 00002	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Ultrich IV
CLEP 00003	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
CLEP 00004	<i>L. kirshneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
CLEP 00005	<i>L.interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA

#### 6.7.6 Preparo dos antígenos

Para preparação dos antígenos foram utilizados uma proporção de 50 µL de antígeno para cada soro, totalizando um volume final de 7 ml por antígeno.

Foram distribuídos em tubos Falcon de 15 ml previamente identificados, 4 ml de PBS 1X, seguidos de 3 ml da cultura viva, totalizando 7 ml de antígeno.

As diluições foram observadas em microscopia de campo escuro, objetiva de 10x, para verificar a qualidade das amostras. Como critério de rejeição, as diluições devem estar sem a presença de auto aglutinação e com *Leptospiras* livres no meio, sem o aspecto de massa esbranquiçada.

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo).

### **6.7.7 Preparo dos controles do teste**

Os controles foram utilizados para garantir maior confiabilidade ao teste, sendo realizados a cada triagem, para melhor qualidade dos resultados. Foram utilizados um pool de amostras positivas e negativas, respectivamente a fim de testar os parâmetros analisados.

Para preparação dos controles, foram diluídos separadamente em tubos eppendorf de 15 ml, 18,3  $\mu\text{L}$  do pool de amostras positivas e negativas, respectivamente, sendo adicionados a 900  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Na distribuição para placa controle, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do controle positivo na linha 1, 50  $\mu\text{L}$  de controle negativo na linha 11 e 50  $\mu\text{L}$  de PBS 1X nas linhas de 2 a 10 e na linha 12. Após distribuição, foram retirados 50  $\mu\text{L}$  da linha 1, homogeneizados e diluídos na linha 2 até a linha 10, com o desprezo do sobrenadante retido na ponteira. Em seguida, adicionados 50  $\mu\text{L}$  de antígenos por linha da placa, dentro da cabine de segurança, para posterior análise.

Os controles foram observados em microscopia de campo escuro, nas objetivas de 4x e 10x para verificar presença ou ausência de aglutinação e assim dar seguimento as etapas do teste (triagem e titulação, respectivamente).

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo).

### 6.7.8 Preparo para Triagem

Para realização da triagem foram distribuídos em placa alta 600  $\mu\text{L}$  de PBS 1X nos poços ímpares (fileiras 1, 3, 5, 7, 9, 11) e 300  $\mu\text{L}$  de PBX 1X nos poços pares (fileiras 2, 4, 6, 8, 10, 12). Em seguida, as placas foram cobertas com papel alumínio e identificados os poços em que seriam realizadas as diluições. Na sequência, foram diluídos 25  $\mu\text{L}$  de soro nos 600  $\mu\text{L}$  de PBS. Após homogeneização, foram retirados com o auxílio da pipeta multicanal 300  $\mu\text{L}$  de amostras dos poços ímpares (fileiras 1, 3, 5, 7, 9, 11) e adicionados aos poços pares (fileiras 2, 4, 6, 8, 10, 12).

Destas diluições, foram transferidos 50  $\mu\text{L}$  de cada poço e distribuídos em microplacas e adicionados 50  $\mu\text{l}$  de antígeno (um antígeno por placa). Cada microplaca foi preparada para 48 soros, com as diluições sequenciais (1:50 e 1:100). Após preparação, as microplacas foram incubadas a 28° C em estufa bacteriológica por 1 hora e 30 minutos, para que houvesse a reação antígeno-anticorpo e consequente formação de aglutininas.

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo).

### 6.7.9 Preparo para Titulação

Para realização da titulação foram utilizados os soros com resultados positivos na triagem, testados a uma diluição de 1:50 e 1:100, para determinar a titulação final das aglutininas *anti-leptospira*, em diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em PBS (tampão fosfato salina).

Para isso, foram diluídos em tubos eppendorf 25  $\mu\text{L}$  do soro em 600  $\mu\text{L}$  de PBX. Todas as amostras foram homogeneizadas no vórtex por cerca de 10 segundos. Posteriormente foram adicionados nas microplacas 50 $\mu\text{L}$  do PBS a partir da 2ª linha em diante e 100  $\mu\text{L}$  da diluição no 1º poço da placa para realizar a diluição nos poços seguintes contendo 50  $\mu\text{L}$  de PBS. Para cada antígeno que o soro foi titulado foi utilizado uma coluna da microplaca. Após essa etapa, foi adicionado com o auxílio da pipeta multicanal 50  $\mu\text{L}$  de cada antígeno previamente diluído, nas respectivas colunas

identificadas nas microplacas, para avaliar a aglutinação formada nas titulações de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200, 1:6.400 e 1:12.800.

As microplacas foram incubadas por cerca de 1 hora e 30 minutos, em estufa bacteriológica, a uma temperatura de 28 °C, para que houvesse a reação antígeno-anticorpo e conseqüente formação de aglutininas.

Para essa etapa foram realizados todos os procedimentos indicados de acordo com protocolo padronizado (em anexo).

#### 6.7.10 Leitura e interpretação

As leituras foram realizadas em microscópio óptico LEICA DM 1000, utilizando adaptador para campo escuro, com lente objetiva de 10x/0.25 para identificar a presença de aglutinações nas amostras analisadas.

Para a triagem utilizaram-se os seguintes critérios de leitura e interpretação: +: menos de 50% das *Leptospiras* aglutinadas; ++: 50% das *Leptospiras* aglutinadas; +++: mais de 50% das *Leptospiras* aglutinadas. As amostras que tiveram como resultado duas ou três cruces de aglutinação foram tituladas.

Para a titulação utilizaram-se os seguintes critérios de leitura e interpretação: o título encontrado conforme o poço onde houve 50% de aglutinação, foi definido conforme a tabela 3.

Tabela 3: Títulos encontrados em poços até onde houve 50% de aglutinação.

POÇOS	TÍTULOS
1	1:50
2	1:100
3	1:200
4	1:400
5	1:800
6	1:1600

7	1:3200
8	1:6400

## 6.8 Análise estatística

A análise dos fatores foi realizada em duas etapas: descritiva e multivariada. Na análise descritiva, as variáveis foram relacionadas com o fator empresa e descritas apresentando frequência absoluta e relativa. Na análise multivariada, foram realizadas associações entre as variáveis e análise de prevalência entre elas, através do teste exato de Fisher, assumindo um valor de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para a realização destas análises estatísticas foi utilizado o software R 4.2.1 (RCORETEAM, 2022).

Para a realização do Teste de Aglutinação Microscópica foi realizado um sorteio aleatório, para obtenção de uma amostra probabilística, assumindo que cada indivíduo teria a probabilidade igual de ser sorteado. Como critério probabilístico foram utilizadas as seguintes situações, amostra aleatória simples, assumindo um nível de confiança de 95% com 5% de erros estabelecidos e uma proporção assumida de 50% (RCORETEAM, 2022).

## 6.9 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo CONEP segundo as normas da Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012 que trata sobre as recomendações Éticas e legais com pesquisas envolvendo seres humanos, com o Número do CAAE: 96695118.4.0000.5016.

## 7 Resultados

### 7.1 Análise dos fatores de identificação dos profissionais

A análise dos casos sobre o perfil epidemiológico da Leptospirose em profissionais de limpeza urbana, no período de abril a junho de 2019 foi feita após a revisão do banco de dados adquirido através de questionários aplicados aos profissionais participantes.

Durante o período do estudo, foram entrevistados 719 profissionais, provenientes das empresas Mamute, Marquise, Prefeitura, Tumpex, dentre essas, a Tumpex foi a empresa que mais disponibilizou trabalhadores dentro do seu quadro funcional (312/719), seguida da empresa Marquise (169/719) Mamute (139/719) e Prefeitura (99/719).

Os dados apontaram que houve o predomínio do sexo masculino conforme a (tabela 4) segundo as empresas participantes, a Marquise foi a empresa com maior número de profissionais do sexo masculino (98,2%). Em relação sexo feminino, o predomínio foi da prefeitura do estado com (64,6%).

Tabela 4: Análise da quantidade de funcionários por empresa, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
Feminino	40	28,8%	3	1,8%	64	64,6%	12	3,8%	119
Masculino	99	71,2%	166	98,2%	35	35,4%	300	96,2%	600

O fator idade foi dividido em categorias para melhor entendimento, assim a maior frequência dos funcionários com idade inferior a 20 anos foi da Mamute (1,4%), entre 21 até 49 anos, Marquise (91,7%), e maior de 50 anos Prefeitura (49,5%) (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da quantidade de funcionários por faixa etária, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
Até 20 Anos	2	1,4%	2	1,2%	0	0,0%	2	0,6%	6
De 21 até 49 Anos	124	89,2%	155	91,7%	50	50,5%	269	86,2%	598
Acima de 50 Anos	13	9,4%	12	7,1%	49	49,5%	41	13,1%	115

Ao analisar o fator escolaridade, o maior índice de profissionais que possuem apenas o ensino fundamental foi da Prefeitura (61,6%), ensino médio da Marquise (56,8%), ensino superior da Prefeitura (1,0%), e sem escolaridade também pertencentes a Prefeitura (7,1%) (Tabela 6).

Tabela 6: Análise da quantidade de funcionários por escolaridade, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		
<b>Escolaridade</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Ensino fundamental (1º grau)	83	59,7%	70	41,4%	61	61,6%	162	51,9%	376
Ensino médio (2º grau)	52	37,4%	96	56,8%	30	30,3%	145	46,5%	323
Ensino Superior	1	0,7%	0	0,0%	1	1,0%	0	0,0%	2
Sem escolaridade	2	1,4%	3	1,8%	7	7,1%	5	1,6%	17

Os profissionais foram classificados quanto as zonas de moradia e o maior quantitativo com relação as empresas, foi observado que: A empresa Mamute foi mais prevalente nos seguintes lugares: Cacau Pereira (0,7%); Iranduba (0,7%); zona leste (30,9%). A Prefeitura: Zona Oeste (25,3%); Zona Sul (15,2%). Tumpex: Zona centro-oeste (8,3%). Marquise: Zona norte (63,3%); Zona centro-sul (4,7%). (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da quantidade de funcionários por zonas de moradia, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		
<b>Zona</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Norte	49	35,3%	107	63,3%	26	26,3%	141	45,2%	323
Sul	9	6,5%	4	2,4%	15	15,2%	12	3,8%	40
Leste	43	30,9%	33	19,5%	28	28,3%	67	21,5%	171
Oeste	28	20,1%	14	8,3%	25	25,3%	52	16,7%	119
Centro-Sul	0	0,0%	8	4,7%	3	3,0%	11	3,5%	22
Centro-Oeste	8	5,8%	3	1,8%	2	2,0%	26	8,3%	39
Irاندuba	1	0,7%	0	0,0%	0	0,0%	2	0,6%	3
Cacau Pereira	1	0,7%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,3%	2

## 7.2 Análise dos fatores de riscos sociais e ambientais

Ao analisar o tempo de serviço na mesma função entre os entrevistados, foi possível observar que a maioria dos funcionários da Mamute possuem de 0 a 1 ano (38,2%) e de 1 a 5 anos (61,8%). De 5 a 10 anos pertencem a empresa Tumpex (34,5%). Acima de 10 anos pertencem à Prefeitura (94,9%) (Tabela 8).

Tabela 8: Análise da quantidade de funcionários por tempo de função, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R)

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
Tempo de função									
0 a 1 ano	42	38,2%	55	32,5%	0	0,0%	23	7,4%	120
1 a 5 anos	68	61,8%	61	36,1%	2	2,0%	102	32,9%	233
5 a 10 anos	0	0,0%	45	26,6%	3	3,1%	107	34,5%	155
Acima de 10 anos	0	0,0%	8	4,7%	93	94,9%	78	25,2%	179

Ao investigar se os funcionários obtiveram algum tipo de treinamento e orientações acerca dos fatores de riscos existentes no local de trabalho antes de assumir a função, foi observado que a Prefeitura foi a empresa que menos deu treinamento aos seus funcionários (70%), e a que menos orientou os seus empregados quanto aos riscos inerentes a sua profissão (53,5%). Avaliando a disponibilidade de equipamentos de proteção individual (EPIs) para os funcionários no local de trabalho, a Prefeitura também foi a empresa que menos disponibilizou EPIs a seus colaboradores (79,8%). (Tabela 9)

Tabela 9: Análise da quantidade de funcionários por realização de treinamentos, recebimento de orientações e utilização de EPIs, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
<b>Treinamento</b>									
Sim	65	46,8%	154	91,1%	29	29,3%	257	82,4%	505
Não	74	53,2%	15	8,9%	70	70,7%	55	17,6%	214
<b>Orientação sobre os riscos</b>									
Sim	92	66,2%	164	97,0%	46	46,5%	296	94,9%	598
Não	47	33,8%	5	3,0%	53	53,5%	16	5,1%	121
<b>Utilização do EPIs</b>									
Sim	129	92,8%	161	95,3%	20	20,2%	305	97,8%	615
Não	9	6,5%	8	4,7%	79	79,8%	7	2,2%	103

Quanto as análises sobre mordeduras por ratos durante jornada de trabalho, foi observado que a maioria dos funcionários da empresa Tumpex admitiram que foram mordidos por algum tipo de rato durante o período de trabalho (6.1%) (Tabela 10).



Sim	89	64,0%	109	64,5%	56	56,6%	269	86,2%	523
Não	50	36,0%	60	35,5%	43	43,4%	43	13,8%	196
<b>Higienização das mãos após exposição</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	91	65,5%	152	89,9%	76	76,8%	272	87,2%	591
Não	48	34,5%	17	10,1%	22	22,2%	40	12,8%	127

Ao analisar se os profissionais já haviam sido acometidos por leptospirose em algum momento de sua trajetória ocupacional, o maior índice de profissionais que indicaram ter contraído a doença foi da empresa Tumpex (3,8%) (Tabela 13).

Tabela 13: Análise da quantidade de funcionários quanto a leptospirose, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		<b>Total</b>
<b>Teve leptospirose</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	2	1,4%	1	0,6%	2	2,0%	12	3,8%	17
Não	137	98,6%	168	99,4%	94	94,9%	300	96,2%	699

Quando analisado o destino do lixo, a maioria dos profissionais que indicaram ter seu lixo colocados diretamente na caçamba/depósito foram da empresa Mamute (5,0%), dos que indicaram ter seu lixo enterrado ou queimado foram da empresa Tumpex (1,6%), entre os que afirmaram ser jogado no quintal, rua ou estrada foram da empresa Mamute (2,2%), entre os que afirmaram ser recolhido pelo serviço de limpeza urbana foram da Prefeitura (99%), conforme indicado na tabela 14.

Tabela 14: Análise da quantidade de funcionários quanto ao destino do lixo, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		<b>Total</b>	
<b>Destino final do lixo</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>
É colocado na caçamba/depósito	7	5,0%	5	3,0%	1	1,0%	4	1,3%	17	2,4%
É enterrado/queimado	0	0,0%	1	0,6%	0	0,0%	5	1,6%	6	0,8%
É jogado no quintal/rua/estrada	3	2,2%	0	0,0%	0	0,0%	2	0,6%	5	0,7%
É recolhido pelo lixeiro/prefeitura	129	92,8%	163	96,4%	98	99,0%	301	96,5%	691	96,1%

Já ao analisar a frequência em que o lixo é recolhido, o maior índice para recolhimento de 03 a 06 vezes por semana, foi da empresa Mamute (5,8%), os que indicaram ser recolhido de 1 a 2 vezes por semana, foram da empresa Prefeitura (9,1%), dentre os que afirmaram ser diariamente, foram da empresa Marquise (93,5%) e dentre os que informaram ser recolhido em intervalos maiores que uma semana, foram da empresa Mamute (1,4%) (Tabela 15).

Tabela 15: Análise da quantidade de funcionários quanto a frequência de recolhimento do lixo, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		<b>Total</b>	
<b>Total</b>	139		169		99		312		719	
<b>Frequência de coleta do lixo</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>	
Diariamente	118	84,9%	158	93,5%	88	88,9%	291	93,3%	655	91,1%
De 03 a 06 vezes	8	5,8%	6	3,6%	1	1,0%	9	2,9%	24	3,3%
De 1 a 2 vezes por semana	11	7,9%	3	1,8%	9	9,1%	11	3,5%	34	4,7%
Com intervalo maior de uma semana	2	1,4%	2	1,2%	1	1,0%	1	0,3%	6	0,8%

Quando analisado a existência de lixeira coletiva próximo das casas, a maioria dos funcionários que indicaram “sim”, foram da empresa Mamute (39,6%), já os que indicaram “não”, foram da empresa Prefeitura (77,8%) (Tabela 16).

Tabela 16: Análise da quantidade de funcionários quanto a existência de lixeiras coletivas, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		<b>Total</b>	
<b>Lixeira coletiva</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>
Sim	55	39,6%	45	26,6%	22	22,2%	86	27,6%	208	28,9%
Não	84	60,4%	124	73,4%	77	77,8%	226	72,4%	511	71,1%

A presença de terrenos baldios próximos da residência também foi questionada, dentre os profissionais que indicaram “sim” foram da empresa Tumpex (34%), e os que afirmaram “não” foram da empresa Marquise (76,9%) (Tabela 17).

Tabela 17: Análise da quantidade de funcionários quanto a existência de terrenos baldios, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		<b>Total</b>	
<b>Terreno baldio</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>
Sim	45	32,4%	39	23,1%	33	33,3%	106	34,0%	223	31,0%

Não	94	67,6%	130	76,9%	66	66,7%	206	66,0%	496	69,0%
-----	----	-------	-----	-------	----	-------	-----	-------	-----	-------

Quando analisada a existência de ratos no interior das casas, a maioria dos funcionários que afirmaram, foram da empresa Prefeitura (66,7%), já a maioria dos que negaram foram da empresa Marquise (40,8%). Quando questionada a existência de ratos próximos às casas, a maioria dos profissionais que disseram “sim” foram da Prefeitura (81,8%), e dos que indicaram “não” foram da empresa Marquise (32,5%) (Tabela 18).

Tabela 18: Análise da quantidade de funcionários quanto a existência de ratos no interior e próximos das residências, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total	
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R
<b>Ratos no interior da casa</b>										
Sim	88	63,3%	100	59,2%	66	66,7%	195	62,5%	449	62,4%
Não	50	36,0%	69	40,8%	32	32,3%	117	37,5%	268	37,3%
<b>Ratos no próximo da casa</b>										
Sim	102	73,4%	114	67,5%	81	81,8%	225	72,1%	522	72,6%
Não	37	26,6%	55	32,5%	18	18,2%	87	27,9%	197	27,4%

Quando analisado os fatores de exposição aos riscos, a maioria dos profissionais que indicaram ficar imersos por longos períodos em água ou lama, foram da empresa Mamute (47,5%), a maioria dos que não possuem esse contato, foram da empresa Tumpex (95,2%). A maioria dos que afirmaram tomar banho de rio, córrego ou igarapé, foram da empresa Mamute (33,1%), já a maioria dos que não possuem esse contato, foram da empresa Tumpex (90,7%) (Tabela 19).

Tabela 19: Análise da quantidade de funcionários quanto a exposição aos fatores de riscos, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
<b>Imersão prolongada</b>									
Sim	66	47,5%	27	16,0%	13	13,1%	15	4,8%	121
Não	73	52,5%	142	84,0%	78	78,8%	297	95,2%	590
<b>Banho de rio, córrego, lagoa ou represa</b>									
Sim	46	33,1%	16	9,5%	16	16,2%	29	9,3%	107
Não	92	66,2%	153	90,5%	75	75,8%	283	90,7%	603

Dentre a maioria dos que indicaram realizar limpeza de fossa, caixa de gordura ou esgoto, foram da empresa Mamute (32,4%) e a maioria dos que não realizam esse tipo de atividade, foram da empresa Marquise (96,4%) (Tabela 20).

Tabela 20: Análise da quantidade de funcionários quanto a limpeza de fossa, caixa de gordura e esgoto, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
<b>Limpeza de fossa, caixa de gordura ou esgoto</b>									
Sim	45	32,4%	6	3,6%	6	6,1%	19	6,1%	76
Não	94	67,6%	163	96,4%	86	86,9%	293	93,9%	636

Quando avaliado se nas residências havia sinais da presença de roedores (urina e fezes), dentre os que afirmaram, a maioria foi da empresa Tumpex (36,9%), e dos que não afirmaram, a maioria foi da empresa Mamute (78,4%) (Tabela 21).

Tabela 21: Análise da quantidade de funcionários quanto a presença de roedores, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
<b>local com sinais de roedores</b>									
Sim	30	21,6%	46	27,2%	15	15,2%	115	36,9%	206
Não	109	78,4%	123	72,8%	77	77,8%	197	63,1%	506

Ao analisar a presença de lixo em terrenos baldios perto das residências, a maioria dos profissionais que disseram “sim” foram da empresa Marquise (21,9%), já a maioria dos profissionais que disseram “não”, foram da empresa Prefeitura (86,9%) (Tabela 22).

Tabela 22: Análise da quantidade de funcionários quanto a presença de lixo em terrenos baldios, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
<b>Terreno baldio com lixo/entulho</b>									
Sim	22	15,8%	37	21,9%	6	6,1%	46	14,7%	111
Não	117	84,2%	132	78,1%	86	86,9%	266	85,3%	601

Dentre os que realizaram a limpeza de caixas d’água, a maioria foram da empresa Marquise (7,1%), já a maioria dos que não realizaram esse tipo de atividade foram da empresa Tumpex (95,5%) (Tabela 23).

Tabela 23: Análise da quantidade de funcionários quanto a limpeza de caixas d'água, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
limpeza de caixa d'agua									
Sim	7	5,0%	12	7,1%	1	1,0%	14	4,5%	34
Não	132	95,0%	157	92,9%	91	91,9%	298	95,5%	678

Quando analisado os sinais e sintomas apresentados pelos profissionais durante sua jornada de trabalho, a maioria dos que apresentaram a variável “febre” foram da empresa Mamute (51,1%). A maioria dos que apresentaram “icterícia” foram da empresa Mamute (12,9%). A maioria dos que apresentaram quadro de “diarreia”, foram da empresa Prefeitura (34,3%). A maioria dos que apresentaram “alterações cardíacas”, foram da empresa Mamute (12,2%). A maioria dos que apresentaram sintomas relacionados a “insuficiência renal”, foram da empresa Mamute (6,5%). A maioria dos que apresentaram estado de “mialgia”, foram da empresa Mamute (43,2%). Já a maioria dos que apresentaram sintomas como “dores na panturrilha”, foram da empresa Mamute (43,9%), assim como a maioria dos que apresentaram sinais de “cefaleia” também foram da empresa Mamute (53,2%) (Tabela 24).

Tabela 24: Análise da quantidade de funcionários quanto aos sinais e sintomas apresentados, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

Empresa	MAMUTE		MARQUISE		PREFEITURA		TUMPEX		Total
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R	
<b>Febre</b>									
Sim	71	51,1%	56	33,1%	32	32,3%	118	37,8%	277
Não	68	48,9%	113	66,9%	64	64,6%	194	62,2%	439
<b>Icterícia</b>									
Sim	18	12,9%	5	3,0%	7	7,1%	10	3,2%	40
Não	121	87,1%	164	97,0%	89	89,9%	302	96,8%	676
<b>Diarréia</b>									
Sim	44	31,7%	46	27,2%	34	34,3%	87	27,9%	211
Não	95	68,3%	123	72,8%	62	62,6%	225	72,1%	505
<b>Alterações cardíacas</b>									
Sim	17	12,2%	16	9,5%	12	12,1%	15	4,8%	60
Não	122	87,8%	153	90,5%	84	84,8%	297	95,2%	656

<b>Prostação</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	60	43,2%	40	23,7%	26	26,3%	91	29,2%	217
Não	79	56,8%	129	76,3%	70	70,7%	221	70,8%	499

<b>Insuficiência Renal</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	9	6,5%	0	0,0%	4	4,0%	5	1,6%	18
Não	130	93,5%	169	100,0%	92	92,9%	307	98,4%	698

<b>Mialgia</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	60	43,2%	24	14,2%	23	23,2%	41	13,1%	148
Não	79	56,8%	145	85,8%	73	73,7%	271	86,9%	568

<b>Dor na panturrilha</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	61	43,9%	47	27,8%	24	24,2%	55	17,6%	187
Não	78	56,1%	122	72,2%	72	72,7%	257	82,4%	529

<b>Cefaléia</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	74	53,2%	82	48,5%	50	50,5%	161	51,6%	367
Não	65	46,8%	87	51,5%	46	46,5%	151	48,4%	349

Quando analisado se os profissionais já foram hospitalizados por conta de algum desses sinais e sintomas, a empresa que apresentou a maior frequência entre os profissionais foi a Tumpex (17,9%). Por fim, quando questionados sobre casos anteriores de leptospirose, tanto entre os profissionais quanto seus familiares e vizinhos, a maioria dos que afirmaram pertencem à empresa Prefeitura (8,1%) e dentre a maioria dos que não afirmaram pertencem à empresa Mamute (96,4%) (Tabela 25).

Tabela 25: Análise da quantidade de funcionários quanto a hospitalização e casos anteriores de leptospirose, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<b>Empresa</b>	<b>MAMUTE</b>		<b>MARQUISE</b>		<b>PREFEITURA</b>		<b>TUMPEX</b>		<b>Total</b>
<b>Esteve hospitalizado</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	20	14,4%	26	15,4%	15	15,2%	56	17,9%	117
Não	116	83,5%	143	84,6%	76	76,8%	256	82,1%	591

<b>Casos anteriores de leptospirose</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>Total</b>
Sim	5	3,6%	7	4,1%	8	8,1%	13	4,2%	33
Não	134	96,4%	162	95,9%	84	84,8%	299	95,8%	679

### 7.3 Análise do Teste de Aglutinação Microscópica

Das 719 amostras coletadas, foram realizadas a sorologia de 385 profissionais, sorteados aleatoriamente conforme o critério estatístico apresentado anteriormente. Na triagem, as amostras que apresentaram 50% das *Leptospiras* aglutinadas ou mais de 50% das *Leptospiras* aglutinadas foram tituladas. Na titulação, o título foi definido conforme o poço em que foi observado 50% de aglutinação.

Partindo dos critérios supracitados, obteve-se uma soroprevalência de infecção por *Leptopiras* em profissionais de limpeza urbana de 15%, através do teste exato de Fisher (Tabela 26).

Tabela 26: Análise quantitativa quanto a soroprevalência de infecção, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R), por meio do teste exato de Fisher.

<b>Leptospirose</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>
Sim	56	15%
Não	329	85%
<b>Total</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

Já as amostras sororreagentes apresentaram os seguintes sorogrupos infectantes, respectivamente, *Icterohaemorrhagiae* (L1-130) (60.7%), *Autumnalis* (Akiyami A) (3.6%), *Canicola* (Hond Ultrich IV) (3.6%), *Cynopteri* (3522C) (16,1%), *Icterohaemorrhagiae* (RGA) (7.1%) e sorogrupo misto – reagiram a mesma titulação para mais de um sorovar (8.9%) (Tabela 27).

Tabela 27: Análise quantitativa quanto ao sorogrupo infectante, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<i>Teste de Fisher</i>	Amostras: 385				p-valor <sup>1</sup> <0,001	
	Sim		Não		Total	
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R
0	0	0,0%	329	100,0%	329	85,5%
Cynopteri (3522C)	9	16,1%	0	0,0%	9	2,3%
Autumnalis (Akiyami A)	2	3,6%	0	0,0%	2	0,5%
Canicola (Hond Ultrich IV)	2	3,6%	0	0,0%	2	0,5%
Icterohaemorrhagiae (L1-130)	34	60,7%	0	0,0%	34	8,8%
MISTO (mais de um sorovar)	5	8,9%	0	0,0%	5	1,3%
Icterohaemorrhagiae (RGA)	4	7,1%	0	0,0%	4	1,0%
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>100,0%</b>	<b>329</b>	<b>100,0%</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

### 7.3.1 Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Linhagem L1-130

Das 385 amostras, 45 delas foram sororreagentes para cepa L1-130, sendo que, desse total, 12 amostras reagiram a uma titulação 1:50 (26,7%), 8 reagiram a uma titulação 1:100 (17,8%), 9 reagiram a uma titulação 1:200 (20,0%), 10 reagiram a uma titulação 1:400 (22,2%), 5 reagiram a uma titulação 1:800 (11,1%) e 1 reagiu a uma titulação 1:3200 (2,2%) (Tabela 28).

Tabela 28: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante L1-130, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<i>Teste de Fisher</i>	Amostras: 385				p-valor <sup>1</sup> <0,001	
	Sim		Não		Total	
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R
<b>L1- 130</b>						
0	0	0,0%	340	100,0%	340	88,3%
50	12	26,7%	0	0,0%	12	3,1%
100	8	17,8%	0	0,0%	8	2,1%
200	9	20,0%	0	0,0%	9	2,3%
400	10	22,2%	0	0,0%	10	2,6%
800	5	11,1%	0	0,0%	5	1,3%
1600	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
3200	1	2,2%	0	0,0%	1	0,3%
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>100,0%</b>	<b>340</b>	<b>100,0%</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

### 7.3.2 Autumnalis, Autumnalis, Linhagem Akiyami - A

Das 385 amostras, 8 delas foram sororreagentes para cepa Akiyami - A, sendo que, desse total, 5 amostras reagiram a uma titulação 1:50 (62,5%), 2 reagiram a uma titulação 1:200 (25,0%) e 1 reagiu a uma titulação 1:400 (12,5%) (Tabela 29).

Tabela 29: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante Akiyami A, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<i>Teste de Fisher</i>	Amostras: 385				p-valor <sup>1</sup> <0,001	
	Sim		Não		Total	
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R
<b>Akiyami A.</b>						
0	0	0,0%	377	100,0%	377	97,9%
50	5	62,5%	0	0,0%	5	1,3%
100	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
200	2	25,0%	0	0,0%	2	0,5%
400	1	12,5%	0	0,0%	1	0,3%
800	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1600	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

	3200	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<b>Total</b>		<b>8</b>	<b>100,0%</b>	<b>377</b>	<b>100,0%</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

### 7.3.3 Canicola, Canicola, Linhagem Hond Ultrich IV

Das 385 amostras, 4 delas foram sororreagentes para cepa Hond Ultrich IV, sendo que, desse total, 1 amostra reagiu a uma titulação 1:100 (25,0%), 1 reagiu a uma titulação 1:200 (25,0%), 1 reagiu a uma titulação 1:400 (25,0%) e 1 reagiu a uma titulação 1:800 (25,0%) (Tabela 30).

Tabela 30: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante Hond Ultrich IV, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<i>Teste de Fisher</i>	Amostras: 385				p-valor <sup>1</sup> <0,001	
	Sim		Não		Total	
<b>Hond Ultrich IV</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>	<b>F.A</b>	<b>F.R</b>
0	0	0,0%	381	100,0%	381	99,0%
50	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
100	1	25,0%	0	0,0%	1	0,3%
200	1	25,0%	0	0,0%	1	0,3%
400	1	25,0%	0	0,0%	1	0,3%
800	1	25,0%	0	0,0%	1	0,3%
1600	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
3200	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>100,0%</b>	<b>381</b>	<b>100,0%</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

### 7.3.4 Cynopteri, Cynopteri, Linhagem 3522C

Das 385 amostras, 16 delas foram sororreagentes para cepa 3522C, sendo que, desse total, 8 amostras reagiram a uma titulação 1:50 (50,0%), 4 reagiram a uma titulação 1:100 (25,0%), 1 reagiu a uma titulação 1:200 (6,3%), 2 reagiram a uma titulação 1:400 (12,5%) e 1 reagiu a uma titulação 1:800 (6,3%) (Tabela 31).

Tabela 31: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante 3522C, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<i>Teste de Fisher</i>	Amostras: 385				p-valor <sup>1</sup> <0,001	
	Sim		Não		Total	
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R
<b>3522C</b>						
0	0	0,0%	369	100,0%	369	95,8%
50	8	50,0%	0	0,0%	8	2,1%
100	4	25,0%	0	0,0%	4	1,0%
200	1	6,3%	0	0,0%	1	0,3%
400	2	12,5%	0	0,0%	2	0,5%
800	1	6,3%	0	0,0%	1	0,3%
1600	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
3200	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>100,0%</b>	<b>369</b>	<b>100,0%</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

### 7.3.5 Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae, Linhagem RGA

Das 385 amostras, 19 delas foram sororreagentes para cepa RGA, sendo que, desse total, 7 amostras reagiram a uma titulação 1:50 (36,8%), 4 reagiram a uma titulação 1:100 (21,1%), 5 reagiram a uma titulação 1:200 (26,3%), 2 reagiram a uma titulação 1:400 (10,5%) e 1 reagiu a uma titulação 1:800 (5,3%) (Tabela 32).

Tabela 32: Análise quantitativa quando analisado isoladamente o sorovar infectante RGA, através da Frequência Absoluta (F.A) e Frequência Relativa (F.R).

<i>Teste de Fisher</i>	Amostras: 385				p-valor <sup>1</sup> <0,001	
	Sim		Não		Total	
	F.A	F.R	F.A	F.R	F.A	F.R
<b>RGA</b>						
0	0	0,0%	366	100,0%	366	95,1%
50	7	36,8%	0	0,0%	7	1,8%
100	4	21,1%	0	0,0%	4	1,0%
200	5	26,3%	0	0,0%	5	1,3%
400	2	10,5%	0	0,0%	2	0,5%
800	1	5,3%	0	0,0%	1	0,3%
1600	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
3200	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100,0%</b>	<b>366</b>	<b>100,0%</b>	<b>385</b>	<b>100,0%</b>

## 8 DISCUSSÃO

Os achados relativos à idade com faixa etária de 21 até 50 anos foram de 94,1%, associados a escolaridade, com maior incidência de 61,6% com perfil inferior a 06 anos de escola. O perfil achado é análogo ao de outros estudos em percepção de risco, visto

que, a cidade de Manaus, tenha os identificadores de escolaridade mais baixos (ABINADER; GARNELO, 2015).

Os riscos inerentes a função tanto sociais quanto ambientais são mais frequentes no primeiro ano de trabalho, com 94,9%, revelando a importância de se realizar treinamentos antes de assumir o cargo. No entanto, os fatores de riscos poderão estar relacionados principalmente a limpeza urbana e coletas de lixo na cidade de Manaus. E os profissionais que não utilizam os EPIs, mesmo com o treinamento, muitos destes apresentam resistência ao uso e pensam que nunca uma contaminação por riscos biológicos ou outros poderá acontecer com os mesmos (BELARMINO et al., 2022).

O contato direto com mordeduras foi de 6,1%, que levará esses profissionais da limpeza urbana a unidade de saúde de referência para o atendimento e se preciso o internamento para tratar da infecção. Corroborando a luz da literatura, que esses acidentes acontecem no período em que a leptospirose aumenta, quando ocorre a elevação do índice pluviométrico, acarretando enchentes (SANTOS SILVA et al., 2022).

Os funcionários que tiveram maior desempenho em hábito de se alimentar no local de trabalho e hábitos de não lavar as mãos foram de 89,9%, observando a importância de introduzir hábitos de higiene, pois a falta deles possibilita que microrganismos sejam levados a boca, olhos, e nariz através das mucosas (ROCHA, 2019).

Os profissionais de limpeza urbana que informaram ter contraído leptospirose durante sua trajetória profissional, o maior índice apresentado foi 3.8%. O manejo dos resíduos sólidos está corroborando com SNIS (2018b), diz que 89,9% da população é atendida por serviço de coleta regular, entretanto o déficit de 10,1% no atendimento, representa 20.893.719 milhões de habitantes em categorias de exposição a estes produtos, revelando uma problemática que os sistemas de saneamento brasileiro tem na sua história, a vulnerabilidade ambiental, que se diferencia pelos danos materiais e imateriais em consequência de fatores do ambiente em que o sujeito está inserido (SILVA et al., 2022).

A prefeitura de Manaus teve o maior recolhimento do lixo, onde 99% foram destinados aos aterros sanitários e controlados pelos órgãos responsáveis. Corroborando

com o estudo Costa et al. (2022), comenta que segundo a Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE) em 2020, o Brasil recolheu 10 milhões em uma década de resíduos sólidos, passando para 33 milhões de toneladas por ano. Em contrapartida, o montante de resíduos segue para unidades impróprias, como lixões e aterros controlados. Além disso, cresceu, mais de 25 milhões de toneladas por ano para 29 milhões de toneladas. Apesar que o recolhimento durante a semana subiu de 3 a 6 vezes no total de 93,5 de lixo recolhido semanalmente.

Com relação à coleta por lixeira seletiva e dados das empresas que fizeram parte da pesquisa, 77,8% informaram que a prefeitura tem o maior déficit neste tipo de recolhimento. Por outro lado, o município de Manaus dispõe de 23 Pontos de Entrega Voluntária (PEVs) que estão localizados em grandes supermercados da cidade como: grupo Nova Era, DB, Atacadão, Carrefour, Veneza, Yroyak, Assaí, Pátio Gourmet, Vitória, Atack e outros que formam a cadeia produtiva da coleta seletiva. Segundo Brasil (2022), comenta sobre a implantação da coleta seletiva de resíduos sólidos urbanos é de responsabilidade dos municípios, titulares dos serviços públicos de limpeza urbana e de manejo de resíduos sólidos pela Política Nacional de Resíduos Sólidos, firmado no art. 36, inciso II, que deverão estabelecer nos Planos Municipais de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos as metas de redução, reutilização, coleta seletiva e reciclagem, com vistas a reduzir a quantidade de rejeitos encaminhados para disposição final.

A presença de 34% desses terrenos baldios próximos da residência também foi questionada durante a coleta de dados, por muitas vezes sendo destinados neste local, uma lixeira viciada, apesar de horários e dias estabelecidos para o recolhimento do lixo doméstico. Silva et al. (2022), comenta que a presença de lixeiras viciadas é uma das formas irregulares de descarte do lixo nas ruas. Isso acontece pelos próprios moradores, cientes do que acontece quando o lixo é desprezado próximo de suas residências, podendo ocasionar o mau cheiro e a proliferação de animais indesejados. No bairro Crespo uma lixeira viciada teve que ser interditada pela prefeitura de Manaus.

Em contrapartida, em 81,8% das casas, os funcionários da limpeza urbana confirmam a presença de ratos, principalmente nas ruas com bueiros sem telas de proteção. Silva et al. (2022), aponta que o descarte irregular ocasiona o aumento de roedores nas residências, pois os mesmos só aparecem onde tem sujeira e restos de

alimentos, sem contar que esses resíduos, em períodos chuvosos, podem ser levados para cursos d'água e igarapés aumentando o risco de contaminação por leptospirose.

Os riscos por contaminação e exposição aos roedores no período chuvoso, acúmulo de água e lama nas ruas e ao entorno das casas chegam a 47,5% assim como os que passam muito tempo em rios, córregos e igarapés aumentando o risco de contaminação não só pela leptospirose mais por outras doenças de pele. Doenças (2019), relata a importância de saneamento básico de qualidade e eficaz no período chuvoso para evitar a proliferação de roedores nestes momentos críticos.

Os profissionais de limpeza urbana também têm uma contribuição de 32,4% da limpeza de fossa, caixa de gordura ou esgoto diariamente. Para Macedo (2022), é muito importante as ações de limpeza urbana juntamente com a empresa de abastecimento de água e tratamento de esgoto para assegurar a higiene adequada e o conforto para sociedade. Ao ter saneamento básico de qualidade e equipes habilitadas para lidar com o tratamento de água e esgoto, compatível com os padrões de coleta, tratamento e disposição adequada dos esgotos e dos resíduos sólidos; drenagem urbana de águas pluviais e controle ambiental de roedores, insetos, helmintos e outros vetores e reservatórios de enfermidades. E mesmo assim a existência de roedores nestes locais foram de 83,7% nas residências do município de Manaus.

Funcionários da limpeza urbana que entraram em contato com água contaminadas pelos roedores apresentaram sinais sintomas como febre, diarreia, alterações cardíacas, prostração, insuficiência renal, mialgia, cefaleia onde foram notificados 17,9% de internações hospitalares (DIZ, 2020). Já Coelho, Jesus Alves e Farias (2019), diz que esses, são os mesmos sinais e sintomas citados pelos autores desse estudo que tiveram a maior ocorrência, com 82,85%, no Bairro de Baixada Santista – São Paulo e a necessidade de qualificar esses profissionais da limpeza urbana rotineiramente para diminuir os riscos ocupacionais entre eles e exigir o cumprimento do uso dos EPIs.

Gonçalves (2020), corrobora com estudos de que o teste sorológico padrão ouro para leptospirose consiste na observação, por meio de microscopia de campo escuro, da aglutinação entre antígeno e o anticorpo, onde o antígeno será a própria *Leptospira*. Por este motivo, se faz necessário ter um panorama de cepas dos principais sorogrupos

existentes, além dos que normalmente estão presentes em animais e reservatórios de determinadas regiões.

Cruz et al. (2022), mostra na sua pesquisa que as coletadas de sangue foram enviadas ao laboratório onde os soros foram obtidos após a centrifugação e processados quanto à presença de anticorpos aglutinantes contra *Leptospira* por meio do teste de aglutinação microscópica. A MAT foi realizada com *L. interrogans sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz LI-130*, sorovar mais prevalente na região da Bahia. A triagem foi realizada empregando a técnica de diluições 1:50 e 1:100 no soro. Uma amostra positiva foi determinada quando a aglutinação foi observada em mais de 50% das leptospiros em comparação com o controle sem soro, a mesma encontrada nesta pesquisa conforme a Tabela 3. Se os soros fossem positivos na diluição de 1:100, a amostra era titulada para determinar o maior título de aglutinação.

Cruz et al. (2021), comenta sobre a presença de anticorpos aglutinantes *anti-Leptospira* que foi utilizada como marcador de infecção prévia na comunidade de Pau da Lima em Salvador (BA), onde ocorreu o estudo por mais de 20 anos. Por este motivo, os achados corroboram com esta pesquisa, já que reduziram os painéis de cepas devido ao conhecimento do agente etiológico e dos reservatórios circulantes. Estudos anteriores mostraram que mais de 90% dos casos graves de leptospirose e 90-98% das infecções na comunidade estão relacionados a *L. interrogans sorovar Copenhageni*. Além disso, 80% dos ratos capturados na comunidade tiveram cultura positiva para leptospirose, sendo o *sorovar Copenhageni* o único isolado (HAGAN et al., 2016).

Segundo estudos apontados por KARPGAM; GANESH (2020) o foco do trabalho foi compreender o papel dos anticorpos aglutinantes na imunidade naturalmente adquirida contra a infecção, tendo como base as análises estatísticas, acerca dos sorovares mais prevalente nos locais de estudo, assim como apresentado nesta pesquisa, visto que, foram identificados anteriormente os sorovares mais prevalentes na região.

O local de estudo tem semelhanças geográficas e sociodemográficas muito comuns a outras regiões onde a leptospirose é considerada um problema de saúde pública. Além disso, a *L. interrogans*, espécie relacionada a casos humanos de leptospirose, apresenta variações de cepas que podem levar a diferentes níveis de resposta imune,

associadas a localização geográfica e condições climáticas e ambientais (CRUZ et al., 2022; JACOB et al., 2018).

## 9 CONCLUSÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa de ampla distribuição mundial, apresentando caráter endêmico em algumas localidades e até mesmo surtos epidêmicos, de acordo com a sazonalidade da região. Está associada a um conjunto de fatores climáticos e ambientais favoráveis à disseminação da *Leptospira*, bactéria causadora da leptospirose, no meio ambiente. Por ser uma doença negligenciada, é considerada um problema de saúde pública em Manaus, estando relacionada principalmente à vulnerabilidade social.

A presença de fatores predispostos para ocorrência da doença aliados à falta de saneamento básico na maioria dos bairros da cidade, reflete diretamente na qualidade de vida dos profissionais atuantes na limpeza urbana. A cidade de Manaus, possui um perfil epidemiológico para leptospirose conforme apresentado neste estudo, com uma predominância de adultos jovens, do sexo masculino, em idade produtiva, com ensino fundamental incompleto e baixa renda. Características descritas ao analisar a população alvo do estudo, os profissionais de limpeza urbana. Também foi possível identificar a soroprevalência de infecção por *Leptospira*, definida pela presença de anticorpos aglutinantes nas amostras testadas, através da Técnica de Aglutinação Microscópica (MAT), no qual foi utilizado uma bateria com 5 antígenos vivos de *Leptospiras*, relacionados a cepas circulantes na região, sendo elas: L1-130, Akiyami-A, Hond Ultrich IV, 3522C e RGA, compondo um panorama antigênico para o teste. Com a realização das análises laboratoriais empregando o MAT, foi possível obter uma frequência de 15% de soroprevalência nesta população de estudo. Através das análises estatísticas, foi possível identificar um panorama dos sorogrupos mais prevalentes entre estes profissionais, sendo o *Icterohaemorrhagiae* (60.7%), o mais frequente quando comparado aos outros sorogrupos analisados no estudo. Em concordância, a maioria dos resultados desta pesquisa revelaram uma relação direta entre populações em estado de vulnerabilidade e a ocorrência da doença, justificados através das análises descritivas e multivariadas, no qual foram atribuídos um valor de significância de 5% nas amostras testadas.

A análise dos fatores de riscos ambientais e sociais para presença de anticorpos aglutinantes contra a *Leptospira*, demonstrou que os profissionais de limpeza urbana do município de Manaus, estão em contato diariamente com a limpeza de caixa de esgoto, limpeza de córregos e igarapés, limpeza de caixa d'água, revelando uma associação entre a variável analisada com a leptospirose. Através das análises foi possível verificar que a grande maioria dos profissionais das 4 empresas analisadas, não receberam treinamento antes de assumir a função, assim como a não utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) e até mesmo casos de mordeduras por ratos durante a rotina de trabalho. Além dessas variáveis, foi possível identificar que estes profissionais também estão em contato com outros fatores propícios a aquisição da infecção, como imersão prolongada em água contaminada ou lama, terrenos baldios com presença de lixos próximos às residências, favorecendo ao aumento de roedores no perímetro urbano, descarte inadequado do lixo, presença de roedores dentro das residências, assim como, casos de mordeduras por ratos e presença de sinais e sintomas característicos para leptospirose.

Portanto, os dados apresentados neste trabalho corroboram com a dinâmica do perfil epidemiológico da leptospirose em profissionais de limpeza urbana, já que inquéritos soropidemiológicos são importantes na construção de medidas de prevenção e controle de doenças prevalentes nesta população, a fim de evidenciar fatores que tornam a leptospirose uma doença negligenciada que atinge grande parte da população de risco devido a fatores sociais e ambientais. Além de contribuir com informações acerca de conhecimento epidemiológico, para implantação de políticas públicas e ambientais, que repercutem na saúde da população.

## REFERÊNCIAS

ABINADER, Erika Oliveira; PEREIRA, Maria Luiza Garnelo. Percepções e Significados da Leptospirose entre Trabalhadores da Limpeza Urbana de Manaus-Am: Perceptions and Meanings of Leptospirosis among Workers in Urban Cleaning Manaus-Am. **Revista do Hospital Universitário Getúlio Vargas**, v. 14, n. 1, p. 23-29, 2015.

ACHA, PN; SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Bacterioses and Mycoses. 3. ed. Washington: **Pan American Health Organization**, vol. 1, p. 157–168, 2003.

ADLER, B. E MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4),: 287-296, 2010.

AGAMPODI, S.B., et al. Regional differences of leptospirosis in Sri Lanka: observations from a flood-associated outbreak in 2011.**PLOS Neglected Tropical Diseases** 16; e2626, 2014.

AGAMPODI, S.B., et al. Regional differences of leptospirosis in Sri Lanka: observations from a flood-associated outbreak in 2011.**PLOS Neglected Tropical Diseases** 16; e2626, 2014.

AHMED, SN; SHAH, S; AHMAD, FMM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 195-200, 2005.

ALCINDO, Jefferson Filgueira. **Caracterização epidemiológica da leptospirose em ovinos deslanados do semi-árido da Paraíba**. 2010. 15 f. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB, 2010.

ALLAN, KJ; BIGGS, HM; HALLIDAY, JEB; KAZWALA, RR; MARO, VP; CLEVELAND, S; *et al.* **Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for One Health in Africa**.

ALMEIDA, L.P et al. Levantamento Soroepidemiológico de Leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento Ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 28(1): 76-81, 1994.

ALMEIDA, L.P. de et al. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 28: 76-81,1994.

AZEVEDO, JF; PALMEIRO, JM. **O diagnóstico laboratorial das leptospiroses em Portugal**. Manuais da Escola Nacional de Saúde Pública e Medicina Tropical. 1972; 6: 89-94.

AZEVEDO, JF; PALMEIRO, JM. **O diagnóstico laboratorial das leptospiroses em Portugal**. Manuais da Escola Nacional de Saúde Pública e Medicina Tropical. 1972; 6: 89-94.

BARBOSA, Milka Alves Correia; LIMA, José Rodolfo Tenório; JUNIOR, Lucio Soares. Prazer, Sofrimento E Retaliação No Trabalho De Garis De Maceió. **Revista Brasileira de Estudos Organizacionais**, v. 9, n. 3, p. 543-576, 2022.

BARBOSA, W. Leptospirose - Epidemiologia e Fisiopatologia. **Patologias tropicais**, 5-27, 1972.

BARBOSA, W. Leptospirose - Epidemiologia e Fisiopatologia. **Patologias tropicais**, 5-27, 1972.

BARCELLOS, C et al. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. *Epidemiol Serv Saude*; 2008 17(1):59- 70.

BELARMINO, Daniela Vilas Boas et al. Trabalho e saúde: percepção de catadores de lixo. 2022.

BHARTI, AR; *et al.* Lepstospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, 2003.

BHARTI, AR; NALLY, JE; RICALDI, JN; MATHIAS, MA; DIAZ, MM; LOVETT, MA; LEVETT, PN; GILMAN, RH; WILLIG, MR; GOTUZZO, E; VINETZ, JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**. 2003; 3: 757-777.

BHARTI, AR; NALLY, JE; RICALDI, JN; MATHIAS, MA; DIAZ, MM; LOVETT, MA; LEVETT, PN; GILMAN, RH; WILLIG, MR; GOTUZZO, E; VINETZ, JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**. 2003; 3: 757-777.

BIAZOTTI, Ricardo. **Leptospirose Canina**. 2006. Monografia (pós-graduação “Lato Sensu em clínica médica de pequenos animais) - Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, 2006.

BIAZOTTI, Ricardo. **Leptospirose Canina**. 2006. Monografia (pós-graduação “Lato Sensu em clínica médica de pequenos animais) - Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, 2006. Ministério da Saúde (Brasil). Sistema Único de Saúde. **Portal Saúde**. Leptospirose. Brasília; 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leptospirose>. Acesso em: 04 de abril. 2022.

BINDER WD. *et al.* Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine**, New York, v. 16, n. 6, p. 851-856, 1998.

BLANCO RM, DOS SANTOS LF, GALLOWAY RL, Romero EC. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil?. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016;44:34-36. doi:10.1016/j.cimid.2015.12.003

BOURHY, P., COLLET, L., BRISSE, S., PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 64, 4061-4067, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Portal da saúde [internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (BR). Sala de apoio à gestão estratégica (SAGE) [internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 [citado 2017 jul 04]. Disponível em: <http://sage.saude.gov.br/>

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Portal Saúde. Leptospirose. Brasília; 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leptospirose>. Acesso em: 04 de abril. 2022.

\_\_\_\_\_. Ministério da saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério do Brasil. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (8), 274-282, 2010.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 3. ed. Brasília, DF; 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Coordenação de Desenvolvimento da Epidemiologia em serviços Guia de Vigilância em Saúde: volume único. – 2. Ed. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>>

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 3. ed. Brasília, DF; 2019. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Portal Saúde. Leptospirose. Brasília; 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leptospirose>.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Qualidade Ambiental. Plano Nacional de Resíduos Sólidos - Planares [recurso eletrônico] / coordenação de André Luiz Felisberto França... [et. al.]. – Brasília, DF: MMA, 2022. 209 p. : il. ; color. Disponível em: <https://portal-api.sinir.gov.br/wp-content/uploads/2022/07/Planares-B.pdf>. Acesso em: 20/08/2023.

\_\_\_\_\_. Manual de controle de roedores. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Coordenação de Desenvolvimento da Epidemiologia em serviços Guia de Vigilância em Saúde: volume único. – 2. Ed. Brasília, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>.

\_\_\_\_\_. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (8), 274-282, 2010.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Portal Saúde. Leptospirose. Brasília; 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leptospirose>.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Portal Saúde. Leptospirose. [Internet]. Brasília; 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leptospirose>. Acesso em: 04 de abril. 2022.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. Portal Saúde. Leptospirose. Brasília; 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leptospirose>. Acesso em: Acesso em: 11 de abril. 2022.

\_\_\_\_\_. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico, Volume 49, N° 41, out. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/imagens/pdf/2018/outubro/25/2018033Leptospirose-situa---o-epidemiol--gica-do-Brasil-no-per--odo-de-2007-a-2016-publica--ao.pdf>. Acesso em: 04 de abril. 2022.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 5ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 725 p. : il., 2021.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020. Brasília, DF: MS, 2020. 217 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao\\_medicamentos\\_rename\\_2020](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020).

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico. Brasília, DF: MS, 2014. 34 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leptospirose\\_diagnostico\\_manejo.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leptospirose_diagnostico_manejo.pdf).

CAMARGO, ED; DA SILVA, MV; BATISTA, L; VAZ, AJ; SAKATA, EE. [Na evolution of the ELISA-IgM test in the early diagnosis of human leptospirosis]. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo 34(4): 355-7, 1992.

CAMPOS, HS; MARTIN, GG; RESENDE, RO; SOUZA, SMS. Leptospirose saúde ambiental, saneamento básico e urbanização. Revisão de Trab. Acadêmic. 2010;2(1).

CHIRATHAWORN, C; KONGPAN, S. Immune responses to *Leptospira* infection: roles as biomarkers for disease severity. **Braz J Infect Dis**, 2014; 18(1):77-81.

CINCO, M; VECILE, E; MURGIA, R; DOBRINA, P; DOBRINA, A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis fator alpha from human monocytes. **FEMS Microbiol Lett** 138(2-3): 211-4, 1996.

CINCO, Marina. Novos Inquéritos sobre a patogenicidade de leptospirosas: Evasão de defesas dos hospedeiros. Departamento Bela Vista. Universidade de Trieste. **Nova Microbiologia**, v. 33, p. 283-292, 2010.

COELHO, Andréa Gobetti Vieira; DE JESUS ALVES, Ivy; FARIAS, Vitória Larissa Vale. Perfil epidemiológico dos casos de leptospirose na Região Metropolitana da Baixada Santista (SP), Brasil. BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 16, n. 183, p. 3-14, 2019.

COLLARES-PEREIRA, M. *Leptospira* e Leptospiroses – Epidemiologia e diagnóstico laboratorial (parte 1) In **Cadernos de doenças Infecciosas**. Faculdade de Medicina de Lisboa.1994; 3:23-28.

COLLARES-PEREIRA, M et al. Agentes zoonóticos associados aos mamíferos silvestres no Arquipélago dos Açores. 1997; 8: 339-357.

COSTA, F., et al. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattusnorvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 9, e0003819, 2015.

COSTA, F., et al. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattusnorvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 9, e0003819, 2015.

COSTA, F; HAGAN, JE; CALCAGNO, J; KANE, M; TORGERSON, P; MARTINEZ-SILVEIRA, M. **Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review**. 2015.

COSTA, Francisca Michelly Marques et al. Manejo dos resíduos sólidos no centro da cidade de Teresina-Piauí. 2022.

CRUZ, Jaqueline S. et al. Biannual and quarterly comparison analysis of agglutinating antibody kinetics on a subcohort of individuals exposed to *Leptospira interrogans* in Salvador, **Brazil**. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 862378, 2022.

CRUZ, Jaqueline Silva et al. Avaliação dos títulos dos anticorpos anti-leptospira em uma comunidade endêmica da cidade de Salvador-BA: associações com aspectos epidemiológicos. 2021. Tese de Doutorado.

CUMBERLAND, P; EVERARD, COR; WHEELER, JG; LEVETT, PN. Persistence of Anti-Leptospiral IgM, IgG and Agglutinating Antibodies in Patients Presenting with Acute Febrile Illness in Barbados 1979-1989. **European Journal of Epidemiology** 17, nº 7: 601-08, 2001.

CUNHA, S., et al. **Doenças Infecciosas**. O Desafio da clínica. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2008.

DAMASCO, PV; MENEZES, VM; FRIEDRICH, AW. **Leptospirose**. In: Tavares W, Marinho LAC, editores. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 4. ed. São Paulo: Atheneu; 2015. p. 753-60.

DAY, N; CALDERWOOD, SB. Leptospirosis: Epidemiology, microbiology, clinical manifestations, and diagnosis - UpToDate. 2018.

DE LA MASA, LM; PEZZLO, MT; SHIGEI, JT; PETERSON, EM. **Color atlas of medical bacteriology**. Washington: ASM Press, 2004.

DHEWANTARA, PW. et al. Epidemiological shift and geographical heterogeneity in the burden of leptospirosis in China. **Infect Dis Poverty** 7, 57, 2018.

DIAMENT, D; LOMAR, AV; BRITO, T. **Leptospiroses**. In: VERONESI, R; FOGACCIA, R editores. **Tratado de infectologia**. 5. ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu; 2015. p.1519-35.

DINIZ, Mariana. **Zoonoses: Leptospirose Canina**. Maio de 2008. Disponível em: <http://site.ourofino.com/blogpet/pet/2011/05/02/zoonoses-leptospirose-canina-2/>. Acesso em: 05 de abril. 2022.

DIZ, Fátima Aparecida. Análise temporal e espacial da relação entre leptospirose humana e fatores de risco no município de São Paulo, Brasil, 2007-2016. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DOENÇAS, Coordenadoria De Controle; De Zoonoses, Divisão. Verão, Estação Das Chuvas, Das Enchentes E Também Da Leptospirose. 2019.

DOUDIER, B. *et al.* Prognostic factors associated with severe leptospirosis. **Clinical Microbiology and Infection**, U. K., v. 12, n. 3, p. 299-300, 2006.

DUPOUEY, J. *et al.* Human Leptospirosis: Na emerging risk in Europe? Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases**. 37 p. 77-83, 2014.

ELKHOURY *et al.* Leptospirose: Diagnostico e manejo clínico. Secretaria de Vigilância Sanitária, 2009, Prelo, p. 1-34.

ESTEVE, LM., et al. Human leptospirosis: Seroreactivity and genetic susceptibility in the population of São Miguel Island (Azores, Portugal). 2014.

EVANGELISTA, K.V; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.**; 5(9): 1413-25, 2010.

FAGUNDES, Michel Quevedo. **Tipificação de Isolados de Leptospiras Interrogans Através de VNTR e Detecção por Eletroforese Capilar**. 2008. Trabalho Acadêmico (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas - Instituto de Biologia, Pelotas, 2008.

FAINE, S Adler B; BOLIN, C; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne Australia: **MediSci**; 1999-2000:326p.

\_\_\_\_\_, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MedSci**, Melbourne, Austrália, 2<sup>nd</sup> Ed., 2000.

\_\_\_\_\_, S; ADLER, B, BOLIN C, PEROLAT P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd edition. MediSci Writing, Armadale Vic, Australia. 1999.

FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis**. 2<sup>o</sup> ed. Melbourne, Australia. 1999.

FAINE, S; STALLMAN, ND – Amended Descriptions of the Genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. **International Journal of Systematic Bacteriology**, oct. 1982, p. 461-463, 1982.

FARR, W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**. 21: p.1-6, 1995.

FIGUEIREDO, CM; MOURÃO, AC; OLIVEIRA, MA *et al.* Leptospirese humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34 n. 4, p. 331-338, 2001.

FRAGA, Tatiana Rodrigues. Estudo de Potenciais Antígenos vacinais de *Leptospira Interrogans* Sorovar Copenhageni. 2009. 149 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) –Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

GARCIA, Mauricio; MARTINS, Luciana Sutti. Leptospirose. Disponível em: [http://www.mgar.vet.br/zoonoses/aulas/aula\\_leptospirose.htm](http://www.mgar.vet.br/zoonoses/aulas/aula_leptospirose.htm). Acesso em: 11 de abril. 2022.

GENOVEZ, M. Artigo técnico. Disponível em: [www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_tecnicos/leptospirose.htm](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_tecnicos/leptospirose.htm). Acesso em: 08 de abril. 2022.

GOMES, M. Gênero *Leptospira spp.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Área de Bacteriologia, **Microbiologia Clínica Veterinária**. 2011.

GOMES, MJP. Gênero *Leptospira spp.* **FAVET- UFRGS**, 2015. Disponível em: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1605090/mod\\_folder/content/0/G%C3%AAreo%20Leptospira%20%202015.pdf?forcedownload=1](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1605090/mod_folder/content/0/G%C3%AAreo%20Leptospira%20%202015.pdf?forcedownload=1)>

GOMES, MJP. Gênero *Leptospira spp.* **FAVET- UFRGS**, 2015. Disponível em: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1605090/mod\\_folder/content/0/G%C3%AAreo%20Leptospira%20%202015.pdf?forcedownload=1](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1605090/mod_folder/content/0/G%C3%AAreo%20Leptospira%20%202015.pdf?forcedownload=1)>

GONÇALVES, Priscilla de Simone. Mapeamento imunológico de cinco proteínas de *Leptospira interrogans* para o desenvolvimento de testes diagnósticos IgM E IgG específicos. 2020.

Growth at Low Temperatures. **Journal of Bacteriology**. 1967; 94:27-31.

GUIDI, Roberta Cristina. **Leptospirose em pequenos animais**. 2006. Monografia (Especialista em Clínica Médica em Pequenos Animais) -Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, 2006.

GUIMARÃES, RM; CRUZ, OG; PARREIRA, VG; MAZOTO, ML; VIEIRA, JD; ASMUS, CIRF. Análise temporal da relação entre leptospirose e ocorrência de inundações por chuvas no município do Rio de Janeiro, Brasil, 2007-2012. **Cien Saude Colet**. 2014;19(9):3683-92.

HAAKE, DA LEVETT, PN. Leptospirosis in Humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015; 387:65-97.

\_\_\_\_\_, DA; LEVET, PN. Leptospirosis in humans. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 387. Berlin, 2015. Capítulo 5 Kobayashi Y. Clinical observation and treatment of leptospirosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**. 2001; 7: 59-68.

HAAKE, DA; DUNDOO, M; CADER, R; KUBAK, BM; HARTSKEERL, RA; SEJVAR, JJ; ASHFORD, DA. *Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis*. **Clin Infect Dis** 34(9): e40-3, 2002.

HAGAN, JOSÉ E. et al. Spatiotemporal determinants of urban leptospirosis transmission: four-year prospective cohort study of slum residents in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004275, 2016.

HELMERHORST, H. J., et al. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. **Neth J Med**, 2012; 70(5):215-21.

HOLT, SC. Anatomy and Chemistry of spirochetes. **Microbiological reviews**. 1978; 114-160.

HOMEM, V. S. F. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.34, p. 173-180, 2001.

HOMEM, V. S. F. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.34, p. 173-180, 2001.

JACOB, S. Mini et al. A 3-year retrospective analysis on the prevalence of antileptospiral antibodies among children in Chennai City, India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 1706-1710, 2018.

- JESUS, M. S. DE ., SILVA, L. A., LIMA, K. M. da S., & Fernandes, O. C. C.. (2012). Cases distribution of leptospirosis in City of Manaus, State of Amazonas, Brazil, 2000-2010. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 45(6), 713–716.
- JESUS, M.S. et al. Cases distribution of leptospirosis in city of Manaus, State of Amazonas, Brazil. 2000-2010. *Revista da sociedade brasileira de Medicina Tropical*, 45(6): 713-716, dezembro, 2012.
- JOAQUIM SF, LATOSINSKI GS, et al. Zoonoses em animais de produção: aspectos gerais. **Vet. e Zootec**, 2016.
- KARPAGAM, Krishnan Baby; GANESH, Balasubramanian. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 39, p. 835-846, 2020.
- KO AI, GOARANT C, PICARDEAU M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, 2009; 7(10):736-47.
- KOBAYASHI, Y. Clinical observation and treatment of leptospirosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**. 2001; 7: 59-68.
- KOURY, MC; SILVA, V. Epidemiologia e Controle da Leptospirese Humana nas Regionais do município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Centro Universitário Metodista Isabela Hendrix. Belo Horizonte, 2006.
- Lara JM, Von Zuben A, Costa JV, et al. Leptospirese no município de Campinas, São Paulo, Brasil: 2007 a 2014. *Rev Bras Epidemiol* [internet]. 2019; (22):2007-14.
- LEE, M. J., et al. 2018. Effects of Culling on *Leptospira interrogans* Carriage by Rats. *Emerg Infect Dis*, 24, 356-360.
- LEVETT PN, BRANCH SL, WHITTINGTON CU, EDWARDS CN, PAXTON H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clin Diagn Lab Immunol** 8(2): 349-51, 2001.
- LEVETT PN. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington D. C., v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. 2001;14: 296-326.
- LEVETT, P.N. Systematics of leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387, 11-20, 2015.
- \_\_\_\_\_, PN. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2011.
- LEVETT, PN; *et al.* Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington D. C., v. 8, n. 2, p. 349-351, 2001.
- MARCHIORI *et al.* **Manifestações Clínicas e Diagnóstico por imagem da Leptospirese Pulmonar. Artigo de revisão.** v. 189, p. 1-9, 2011.

McBRIDE, A.J., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Disease** 18, 376-86, 2005.

MELO *et.al.* **Principais Aspectos da Infecção por *Leptospira sp* em Ovinos.** Universidade de Brasília, Brasília- DF, p. 1-6, 2010.

MONTEIRO, Gloria Regina de Goiás. **Efetividade da Doxiciclina na Profilaxia contra Leptospirose.** 2003. 56 f. Mestrado (Mestre em Bioquímica) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN. 2003.

NETO, Amaro Nunes Duarte. **Patogenia do envolvimento Esplênico na Leptospirose grave com Síndrome de Choque Séptico.** 2010. 225 f. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de São Paulo. São Paulo, 2010.

NETO, Amaro Nunes Duarte. **Patogenia do envolvimento Esplênico na Leptospirose grave com Síndrome de Choque Séptico.** 2010. 225 f. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de São Paulo. São Paulo, 2010.

OLIVEIRA FCS. **Leptospirose bovina no Estado da Bahia, Brasil. Prevalência de sorovares predominantes, distribuição espacial e fatores de risco.** São Paulo: USP, 2008. 123p. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, D. S., M. J. GUIMARAES, *et al.* The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. **Ann Trop Med Parasitol**, v.103, n.2, Mar, p.149-57. 2009.

PELLISSARI, DM; ELKHOURY, ANSM; ARSKY. MLNS; NUNES, ML. Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. **Epidemiol Serv Saúde.** 2011;20(4):565-74.

PEREIRA, Ulliane de Amorim et al. Saneamento Ambiental e o processo saúde doença em Manaus/Am. 2018.

PICARDEAU M. VIRULENCE of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nat Rev Microbiol** [internet]. 2017; 15(5):297-307. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>.

PLANK, R; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect**, 2000; 2(10):1265-76.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

REIS, R. B., G. S. RIBEIRO, *et al.* Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p.e228. 2008

RIBEIRO MG, BELONI SN, LANGONI H, DA SILVA AV. **Leptospirose canina.** Boletim técnico – Fort Dodge Saúde Animal, 2003.

ROCHA, Marilise França. Perfil epidemiológico da leptospirose em Santa Catarina: uma análise descritiva dos últimos cinco anos. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 2, p. 342-358, 2019.

RODRIGUES, A. L. Perfil epidemiológico de pacientes acometidos por leptospirose em um estado brasileiro na Amazônia Ocidental. *Sustinere: Revista de Saúde e Educação*, v. 7, n. 1, p. 32-45, 2019.

RUSSELL CJ, VIRGINIA GH. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire I.

SAMBASIVA RR, NAVEEN G, BHALLA P, AGARWAL SK. Leptospirosis in India and the rest of the World. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 2003; 7:178-193.

SANTOS SILVA, Lindenberg et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE LEPTOSPIROSE EM UM ESTADO DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 9, n. 1, p. 27-36, 2022.

SCHNEIDER, MC; LEONEL, DG; HAMRICK, PN; CALDAS, EP; VELÁSQUEZ, RT; MENDIGAÑA PAEZ, FA; *et al.* Leptospirosis in Latin América: exploring the first set of regional data. **Panam Salud**, 41 e 81, 2017.

Secretaria da Saúde do Estado da Bahia – Sesab. Boletim epidemiológico de leptospirose, Bahia, 2022.

SEGURADO, AC; CASSENOTE, AJ; LUNA, EA. Saúde nas metrópoles – Doenças infecciosas. **Estudos Avançados** [Internet] 2016; 30(86):29-49. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142016.00100003>. Acesso em: 06 de abril. 2022.

SILVA, Gabriela Mendonça et al. UMA ANÁLISE SOBRE OS RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS (RSU) NA BACIA DO IGARAPÉ DO QUARENTA EM MANAUS-AMAZONAS. *Revista Tocantinense de Geografia*, v. 11, n. 24, p. 01-17, 2022.

SILVA, Joan Carlos Santos et al. Índice de salubridade ambiental e a ocorrência da leptospirose: um estudo em bairros populares de Salvador-Bahia. 2022.

Silva, L. A., et al. Seroprevalence of and risk factors for leptospirosis in the City of Manaus, State of Amazonas, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 49(5), 628–63, 2016.

Gonçalves. **Leptospirose Canina**. 2007. Monografia (Especialista em Clínica Médica e cirurgia de pequenos animais) - Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, Ed. 6. Campos dos Goytacazes, out. 2007.

SIMÕES LS, SASAHARA THC, FAVARON PO, *et al.* Leptospirose – Revisão. **Pubvet**, v. 10, n. 2, p. 138-146, 2016.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE O SANEAMENTO (SNIS). Diagnóstico do manejo de resíduos Sólidos Urbanos. Brasília: Ministério das Cidades, 2018b. Disponível em: <<https://www.gov.br/mdr/pt->

br/assuntos/saneamento/snis/diagnosticos-antiores-do-snis/agua-e-esgotos-1/2018>.  
Acesso em 20 ago. 2022.

SLACK, A. **Leptospirose. Reproduzido de Médico da família Australiana.** Vol. 39, No. 7, JULY 2010.

SMITH, J. K. G. et al. Leptospirosis following a major flood in Central Queensland, Australia. **Epidemiology & Infection**, v, n. 0. 1413, p. 585-590, 2013.

SOARES, T.S.M. et al. Análise especial e sazonal da leptospirose no município de São Paulo, SP, 1998 a 2006. *Revista de Saúde Pública*, 44(2): 283-291, 2010.

SOUZA, VMM; ARSKY, MLNS; CASTRO, APB; ARAÚJO, WN. Anos potenciais de vida perdidos e custos hospitalares da leptospirose no Brasil. **Rev Saúde Pública.** 2011;45(6):1001-08.

Sustentabilidade, ambiente e saúde na cidade de Manaus./ Organização de Carlos Machado de Freitas e Leandro Luiz Giatti. – Manaus: Edua, Editora Fiocruz, 2015. 353 p.: il. ISBN 9788-85-7401-737-2 (Edua) ISBN 978-85-7541-466-8 (Editora Fiocruz)

THIBEAUX, R., et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom*, 4, 2018.

TOLLEDO, L.M. Espaço e doença: um olhar sobre o Amazonas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998.

TULSIANI *et.al.* Emergências de doenças tropicais na Austrália. Part.1. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Vol. 104, No. 7, p. 543–556, 2010.

VICTORIANO, AFB. *et al.* Leptospirosis in the Asia Pacific region. **BMC Infect. Dis.**, 9, 147, 2009.

VIEIRA ML, GAMA-SIMÕES MJ, COLLARES-PEREIRA M. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. **International Journal of Infectious Diseases.** 2006; 10: 378-386.

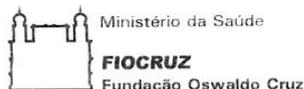
VIEIRA, ML. **Aspectos da caracterização antigénica e molecular da leptospirose em áreas endémicas.** Tese doutoramento, IHMT-UNL, 2006.

VINETZ, J.M. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis** 14(5): 527-38, 2001.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. 2003; 109 pp.

YANG, CW; WU, MZ; PAN, MJ. Leptospirosis renal disease. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, **Oxford**, v. 16, n. 5, p. 73-77, 2001.

## APENDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



### Laboratório Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para Saúde TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Segundo as normas da Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde de  
12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa, “**Estudo soroepidemiológico de leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus-am**”, que tem como objetivo traçar o perfil epidemiológico da leptospirose em profissionais de limpeza pública, a fim de subsidiar intervenções de prevenção na população alvo, no município de Manaus- AM. A pesquisa está sendo desenvolvida pelo ILMD - Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ/AM), localizado na rua Teresina, 476, Adrianópolis, telefone (92) 3621-2323. São responsáveis pelo estudo as pesquisadoras **Luciete Almeida da Silva** (coordenadora), **Kátia Maria Lima de Menezes**, **Lirna Salvioni da Silva** e **Michele Silva de Jesus**. A Leptospirose é uma doença causada por bactéria, transmitida ao homem através da urina de rato ou de outros animais contaminados).

Você está sendo convidado para participar da pesquisa e se você aceitar precisa responder algumas perguntas e permitir a coleta de sangue (2 mililitros) em uma veia do seu braço, por profissionais capacitados, utilizando matérias descartáveis, obedecendo às normas da vigilância sanitária. A coleta poderá causar uma leve dor e uma pequena mancha roxa, que desaparecerá em 03 a 04 dias. Garantimos que o procedimento não causa dano à saúde e que seu nome não será divulgado. A qualquer momento, você poderá retirar este seu consentimento e sair do estudo, sem nenhuma penalidade ou prejuízo, punição ou atitude preconceituosa.

Durante o estudo você será acompanhado (a) pelos pesquisadores que estarão à disposição para qualquer esclarecimentos. Em caso positivo dos exames você será encaminhado para atendimento na rede do SUS, pela equipe de pesquisa. Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa. Você não receberá dinheiro pela sua participação, mas, se tiver qualquer despesa será ressarcido pelo orçamento da pesquisa. Qualquer dano que venha a sofrer em decorrência da sua participação na pesquisa, você será indenizado, podendo ser encaminhado para o ILMD - Instituto Leônidas & Maria Deane (FIOCRUZ/AM), de modo, que ficará assegurado o seu direito a indenizações e cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa.

Você receberá uma via de igual teor deste Termo de Consentimento, onde consta o contato e assinatura dos pesquisadores envolvidos na pesquisa.

Página 1 de 2

Rua. Teresina, 476. Adrianópolis  
CEP: 69.057-070. Manaus - AM



www.amazonia.fiocruz.br  
ILMDFiocruz



Tel.: (92) 3621-2327 | (92) 3621-2323  
E-mail: gabinete.ilmd@fiocruz.br

MA400

Quando o participante do estudo assina essa carta é porque ele entendeu mesmo tudo o que foi explicado sobre a pesquisa e pensa que a pesquisa é importante para a saúde pública do município e vai querer participar.

### Consentimento Pós-informação:

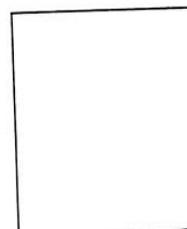
Eu, \_\_\_\_\_, fui muito bem informado sobre o estudo **“Estudo soroepidemiológico de leptospirose em profissionais de limpeza urbana do município de Manaus-am”**.

Eu discuti com o (a) pesquisador (a) \_\_\_\_\_ sobre minha decisão em participar deste estudo. Entendi muito bem os objetivos do estudo, os procedimentos que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que eu não terei despesas com a minha participação e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante



Assinatura do Coordenador

Pesquisador colaborador

Pesquisador colaborador

Pesquisador colaborador

Pesquisador colaborador

Pesquisador colaborador

Pesquisador colaborador



## APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO

### ENTREVISTA - LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO - Leptospirose

1. Nome do entrevistado			2. Data de Nascimento ____/____/____	
3. Sexo ( )  1. Masc. 2. Fem	4. Idade ( )	5. raça/cor ( )  1 - branca 2 – preta 3 – amarela 4- parda 5 - indígena 9 - ignorado	6. Gestante ( )  1 - 1º trimestre 2 - 2º trimestre 3 - 3º trimestre 4 - Idade gestacional ignorada	7. Estado civil ( )  1- Solteiro 2- Casado 3- Divorciado 4- Viúvo
8. Escolaridade: ( )  1.sem escolaridade 2. ensino fundamental (1º grau) incompleto 3. ensino fundamental (1º grau) completo 4. ensino médio (2º grau) incompleto 5. ensino médio (2º grau) completo.				
9. Endereço:  Bairro: _____ Telefone: _____				
10. Qual é a principal fonte de abastecimento da sua casa? ( ) 1. Água encanada dentro de casa 2. Água encanada fora de casa (bica no quintal) 3. Fonte (poço/bica) de até 100m da casa 4. Fonte (poço/bica) distante mais de 100m da casa 5. Outro			11. Para onde vai o lixo da sua casa? ( )  1. É recolhido pelo lixeiro/prefeitura 2. É enterrado/queimado 3. É colocado na caçamba/depósito 4. É jogado no quintal/rua/estrada, 5. Utilizado como alimento para animais	
12. Com que frequência o lixo é recolhido pela prefeitura na sua localidade? ( ) 1. Diariamente 2. De 1 a 2 vezes por semana 3. De 03 a 06 vezes 4. Com intervalo maior de uma semana			13. Existe alguma lixeira coletiva próxima a residência?  1. Sim 2. Não ( )	
14. Existem terrenos baldios próximos a casa? 1. Sim 2. Não ( )			15. O participante refere à existência de ratos no interior da casa: ( ) 1. Sim 2. Não	
16. O participante refere à existência de ratos próximo a residência ( ) 1. Sim 2. Não				
<b>CONDIÇÕES DE TRABALHO</b>				
17. Função:			18. Você fez algum treinamento antes de assumir essa função? ( ) 1 – Sim 2- Não	



## **ANEXO A: POP PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA**

### **POP DO PREPARO DO MEIO DE CULTURA EMJH**

**Procedimento 1 - preparação de casa EMJH media: tempo estimado 7 horas.**

**nota: dissolução de BSA leva de três a quatro horas.**

#### **Equipamentos:**

- Agitador magnético
- Esferas magnéticas
- CSB classe II
- Pipetas automáticas
- medidor de pH

#### **Materiais**

- Pipetas estéreis descartáveis de 2 ml, 5 ml e 25 ml
- luvas
- Pipetas descartáveis de transferência
- Frascos de cultura celular de 2L
- Tubos estéreis de 50 ml de falcão
- Filtros stericulp 1000mL. 100mL
- Pontas de filtro estéreis de 1000ul, 20ul

#### **Reagentes;**

- 70% de álcool
- Água ultra pura autoclavada
- 10% de NaOH (Sigma, S8045)
- Glicerol a 10% (Sigma, 49767)
- 1 NHCl (Sigma, H1758)
- Sulfato de zinco (Sigma, Z475050500G)
- Cloreto de cálcio (Sigma, C3881-500G)
- Cloreto de magnésio (Sigma, M0250-500G)
- Cloreto de tiamina (SIGMA, T1270-25G)
- Vitamina b12 (SIGMA, V6629-1G)
- Sulfato de magnésio hepta-hidratado (Mg SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O) (Fisher, BP213-1)
- Sulfato ferroso (ferro) (Sigma, F7002-500G)

- Tween 80 (Sigma, P8074-100ML)
- hidrolisado de lactalbumina (Fisher, DF5996170)
- Superóxido dismutase SOD (Sigma, S5395-30KU)
- Piruvato de sódio (Sigma, P8574-100G)
- Soro de coelho (100ml) (Fisher, ICN19135780)
- Leptospira médium base (Difco BD, 279410)
- BSA (Sigma, A4503)

#### **Execução:**

**Nota:** Todas as soluções de estoque devem ser preparadas anteriormente. Filtre cada uma dessas soluções de estoque e armazene a 4 ° C até que seja necessário. Melhor se preparado de fresco, mas pode ser armazenado por até um mês.

#### **Soluções estoque**

- Sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O): dissolva 0,4 mg em 100 ml de água ultra pura
- Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O): dissolva 1,0 mg em 100 ml de água ultra pura
- Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O): dissolva 1,0 mg em 100mL de água ultra pura
- Cloreto de tiamina: Dissolva 0,5 mg em 100mL de água ultra pura
- Vitamina B12: dissolva 0,02 g em 100 ml de água
- Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O): dissolva 0,3 mg em 100mL de água
- Glicerol a 10%: dissolva 10 ml de glicerol em 90 ml de água ultra pura
- SOD: dissolva 30 mg de SOD em 3 ml de água ultra pura e faça alíquotas de 100 ul. Mantenha congelado a -20 ° C
- Soro de coelho: inativar o soro a 56 ° C por 30 minutos e alíquota de 10 ml cada um em tubos de 15 ml de falcão.

Essas alíquotas podem ser armazenadas em -20 ° por 6 meses

Prepare e filtre as seguintes soluções no dia em que o suplemento for preparado:

- Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O): dissolva 0,5 mg em 100 ml de água ultrapura e filtro
- Tween 80: dissolva 20 ml em água ultra pura e filtro de 180 ml

Dissolva a BSA em água ultra pura e misture as soluções de estoque:

- Adicione 100g de fração 5 de albumina bovina muito lentamente a 500mL de água destilada. Mexa lentamente para evitar a formação de espuma.

**Nota:** Levará 3-4 horas para dissolver completamente.

Quando a BSA estiver totalmente dissolvida, adicione soluções estoque lentamente, na seguinte ordem, enquanto mexe. continue mexendo por uma hora.

Tiamina	10mL
CaCl <sub>2</sub>	10mL
MgCl <sub>2</sub>	10mL
ZnSO <sub>4</sub>	10 ml
MnSO <sub>4</sub>	01 ml
FeSO <sub>4</sub>	100mL
Vitamina B12	10 ml
Tween 80 (for EMJH)	125mL

- Ajuste o pH para 7,4 com NaOH a 10% (filtrado).
- Ajuste o volume para um litro com água ultrapura da autoclave.
- Filtrar (0,22 um) e distribuir asépticamente em alíquotas de 100 ml. Essas alíquotas podem ser armazenadas a -20 °C por 8 meses

#### **Procedimento 2- Preparação da base EMJH:**

- Pesar 2,3 g de base média de leptospira (Difco BD ref. # 279410)
- Adicione 890 ml de água ultra pura estéril autoclavada em frasco de vidro de 1L e mexa.
- Adicione 0,9 ml de 10% de glicerol.
- Ajuste o pH para 7,4 com IN HCl

#### **Procedimento 3- preparação da mídia EMJH:**

- Descongele uma alíquota de 100 ml de suplemento EMJH à temperatura ambiente.
- Adicionar a 100 ml de suplemento descongelado:
  - ✓ 1 g de hidrolisado de lactalbydrumina,
  - ✓ 100 ul SOD
  - ✓ 0,04 g de piruvato de sódio.
- Misture delicadamente para misturar todos os ingredientes acima.
- Adicione 10 ml de soro de coelho inativado pelo calor ao suplemento.

Nota: Após esse ponto, todos os procedimentos são feitos dentro do BSC.

#### **Esterilidade e assepsia**

- Todos os procedimentos devem ser realizados dentro de uma classe II do BSC.
- Limpe o fluxo laminar com álcool a 70% (ou desinfetante adequado antes do uso;

- Ligue a luz UV por 15 minutos antes e após o uso.
  - Adicione 100 ml de suplemento misturado com 10 ml de soro de coelho a 890 ml de base EMJH.
  - esterilizar através de um sistema de filtro de 0,22 um.
  - Rotular a mídia preparada com data e número do lote

## **ANEXO B: POP CONTROLE DE QUALIDADE DO MEIO**

### **Controle de qualidade para contaminação:**

- Pegue 5 ml de mídia EMJH em 3 tubos de teste de cada mídia de 1L e mantenha a 37 ° C para controle de qualidade e verificação de contaminação
- Observe estes tubos uma vez por semana para contaminação até 2 semanas desde o dia da preparação da mídia
- Se não houver contaminação, o lote de mídia é bom para uso.

### **Controle de qualidade para o crescimento de Leptospira:**

- Pegue 5 ml de meio EMJH em 2 tubos de teste de cada meio de 1 litro e faça uma cultura em um tubo com a cepa L1-130 para ver o crescimento e a motilidade da leptospira no meio preparado.
- Verifique o crescimento e a motilidade em 1 semana e faça outra cultura em outro tubo do mesmo lote de mídia e verifique novamente em uma semana.
- Se a cultura é boa e a leptospira parece móvel e saudável, a quantidade de mídia é boa para uso posterior.
- Dispense 5mL de mídia em tubos de 15 ml de falcão e armazene a 4 ° C. Essa mídia é boa para usar por 8 meses.

## **ANEXO C: POP CONTROLE DE QUALIDADE PARA CRESCIMENTO DA LEPTOSPIRA**

### **PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP**

#### **❖ Controle de qualidade para o crescimento de Leptospira**

- Obtenção de 19 cepas (em duplicata) de Leptospira provenientes do Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose (Coleção de Leptospira – CLEP) do Instituto Oswaldo Cruz – RJ/Brasil, armazenadas em tudo com meio EMJH semi-sólido e mantidas em temperatura ambiente.
- Visualizar em microscópio de campo escuro cada cepa para verificar se estão bem crescidos, se não tem autoaglutinação, dedris
- Na cabine, distribuir 5 mL do meio EMJH líquido em tubo falcon estéril (devidamente identificado), seguido do repique de 1 mL da cepa e incubar na estufa por 7 dias (28° a 30°C).
- No 7° dia, visualizar o crescimento novamente em microscópio de campo escuro. Em seguida fazer a troca do meio pegando 500 uL e colocar em outro tubo falcon estéril com meio EMJH líquido.  
Obs.: se o crescimento já estiver bom pode-se expandir fazendo o repique de 500 uL em 2 ou 3 tubos, deixar crescer por 1 semana e congelar em glicerol ou DMSO.
- Para o congelamento é necessário adicionar 1 mL de cultura em 125 uL de DMSO e congelar em – 70° C (não demorar muito para congelar, pois DMSO é tóxico para Leptospira)

ANEXO D: CEPAS DE REFERÊNCIA DE *LEPTOSPIRA* SPPCepas de referência de *Leptospira* spp.

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SOROGRUPO</b>	<b>SOROVAR</b>	<b>CEPA</b>
CLEP 00001	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGa
CLEP 00002	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
CLEP 00003	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
CLEP 00004	<i>L. kirshneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
CLEP 00005	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
CLEP 00006	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
CLEP 00007	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
CLEP 00008	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
CLEP 00009	<i>L. kirshneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
CLEP 00010	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
CLEP 00011	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
CLEP 00012	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
CLEP 00013	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
CLEP 00014	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
CLEP 00015	<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc I
CLEP 00016	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepeletsin
CLEP 00017	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
CLEP 00018	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
CLEP 00019	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705

## ANEXO E: Procedimento operacional padrão – POP Microaglutinação para amostras do soro inquérito

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

Data da Emissão: Mar 2013 Emissor: Janet Lindow, PhD	Data da Vigência: 26 abr 2014	Aprovação: Janet Lindow, PhD
Data Revisão: 10 out 2021 Revisor (es): Jaqueline Cruz	Versão: 06	

### HISTÓRICO

VERSÃO	DATA	PÁGINA	MUDANÇA	IDENTIFICAÇÃO
01	Fevereiro 2004	1-6	Criação do POP	FIOCRUZ / GR 07
02	Julho 2010	1-7	Revisão	CPqGM-LEPTO-07
03	Abril 2013	1-7	Revisão (Leitura placa)	CPqGM-LEPTO-07
04	Agosto 2015	1-9	Revisão	CPqGM-LEPTO-07
05	Março 2016	1-9	Revisão	
06	Outubro 2021		Revisão	

### CÓPIAS DISTRIBUIDAS

LOCAL	DATA	Nº DE CÓPIAS

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

### 1. OBJETIVO

O teste de Microaglutinação (MAT) é o teste sorológico padrão-ouro para diagnóstico e classificação da Leptospirose, que visa detectar a presença de anticorpos que reagem contra antígenos de culturas vivas de Leptospiras em microplacas.

### 2. DIVULGAÇÃO

Eletrônica em arquivo denominado “POP Microaglutinação para amostras do soroinquérito na pasta “POP’s Lepto” no servidor <\\lgm-fs\neb\Laboratório\MRC2\Protocolos>.

### 3. ABREVIACÕES

S/A

### 4. PROCEDIMENTOS

#### 4.2. Cuidados

- ✓ A bateria de cepas de Leptospiras a ser usada como antígeno deve conter sorovares representativos dos sorogrupos mais predominantes do local de estudo. Uma ou mais cepa isolada no local deve fazer parte da bateria sempre que possível. Caso não saiba qual o sorogrupo predominante no local de estudo deve-se usar a bateria recomendada pela OMS;
- ✓ Antígenos derivados de culturas velhas e/ou com altas concentrações de leptospiras, reduz a sensibilidade, que pode ser otimizada com antígenos com baixa densidade de leptospiras;
- ✓ O repique das culturas deverá ser feito de 5 a 7 dias antes do uso. Ver bateria das culturas em anexo (Tabela 1);

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

- ✓ Antes de iniciar o experimento, verificar se as culturas estão com bom crescimento (>80 leptospiras no campo) e se estão com boa motilidade;
- ✓ Verificar se as culturas estão livres de contaminantes;
- ✓ As culturas deverão ser manipuladas em uma capela de fluxo laminar;
- ✓ Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco em todas as etapas do teste;
- ✓ Desprezar ponteiros, pipetas Pasteur, etc, em solução de hipoclorito de sódio a 2% ou álcool a 70%;
- ✓ Desprezar tubos de culturas em sacos de autoclave.

#### **4.3. Vidraria**

- ✓ Utilizar tubos e placas rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

#### **4.4. Equipamentos**

- ✓ Microscópio de campo escuro adaptado com objetiva de 5x, 10x, 20x;
- ✓ Fluxo laminar para manipulação das culturas;
- ✓ Estufa bacteriológica BOD de 28°C a 30°C para incubação das culturas e das microplacas;
- ✓ Microcentrífuga de alta rotação;
- ✓ Vortex adaptado para placa.

#### **4.5. Materiais**

- ✓ PBS 10x (pH 7.4);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Amostra de soro do participante do estudo;
- ✓ Bateria de cepas adequadas para o local de estudo (ver em anexo tabela com relação dos antígenos utilizados);
- ✓ Luvas;
- ✓ Lâminas de vidro (Corning) novas;
- ✓ Pipetas Pasteur descartáveis de 3 mL;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

- ✓ Pipetas sorológicas descartáveis de 2,5 e 10 mL;
- ✓ Pipetador monocanal ajustáveis de 2-20 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL;
- ✓ Pipeta automática multicanal 30-300 µL;
- ✓ Dispensador Multipette plus (Eppendorf);
- ✓ Combipip para dispensador Multipette plus (Eppendorf);
- ✓ Ponteiras amarelas estéreis com capacidade 20 a 200 µL;
- ✓ Ponteiras azuis estéreis com capacidade 200 a 1000 µL;
- ✓ Ponteiras com capacidade para 300 µL;
- ✓ Canaletas para pipetas multicanal;
- ✓ Tubos de 1,5 mL;
- ✓ Placa alta 96 poços;
- ✓ Estante para tubos de 1,5 mL;
- ✓ Microplacas de ELISA de 96 poços com fundo chato;
- ✓ Alça de platina adaptada para fazer bolinhas;
- ✓ Álcool a 70% para assepsia;
- ✓ Hipoclorito de sódio a 2% para descarte dos materiais contaminados;
- ✓ Saco de autoclave;
- ✓ Papel toalha;
- ✓ Papel absorvente de bancada;
- ✓ Caneta para tubos de ponta grossa e fina;
- ✓ Gases para limpeza das lâminas;
- ✓ Balde para descarte de lâminas e pipetas.

##### **5. DESINFECÇÃO**

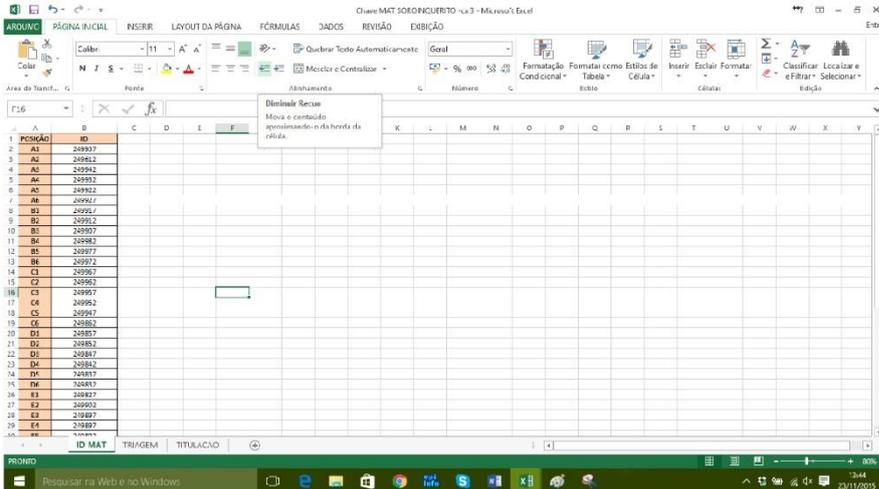
- ✓ Utilizar álcool 70% para esterilizar o fluxo, todo material que entrar no fluxo deve ser borrifado com álcool 70%. Caso retire as mãos de dentro do fluxo durante o procedimento, ao retornar troque de luva ou borrife as mãos com álcool 70% para evitar contaminação.

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA</p>	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

## 6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

### 6.2. Procedimento 1: Confecção dos mapas

- ✓ Retirar os soros da geladeira;
- ✓ Fazer a chave de identificação dos soros utilizando o leitor de código de barras;
- ✓ Abrir a planilha fazendo o seguinte caminho: [\\lgm-dc1\neb\Banco de Dados\BDCONSULTA\](#)
- ✓ A pasta a ser aberta deverá ser a do seguimento, por exemplo, L30, L31, L32 ou L38;
- ✓ Abrir a planilha chamada ID MAT, pegar as amostras e fazer a leitura do código de barras até completar o total de 48 amostras (figura 1);



POSICÃO	ID
A1	249932
A2	249952
A3	249942
A4	249932
A5	249932
A6	249927
A7	249927
A8	249927
A9	249927
A10	249927
A11	249982
A12	249977
A13	249972
A14	249967
A15	249962
A16	249957
A17	249952
A18	249947
A19	249942
A20	249887
A21	249882
A22	249877
A23	249872
A24	249867
A25	249862
A26	249857
A27	249852
A28	249847
A29	249842
A30	249837

Figura 1: Modelo de preenchimento do mapa

- ✓ Seguir “POP de Conversão de Arquivos”, para poder converter os TrackingId em IDNO;
- ✓ Imprimir uma cópia da planilha “ID MAT” e duas da planilha “Triagem” (o número de cópias da planilha triagem vai depender da quantidade de cepas utilizadas, pois é uma planilha para cada cepa).

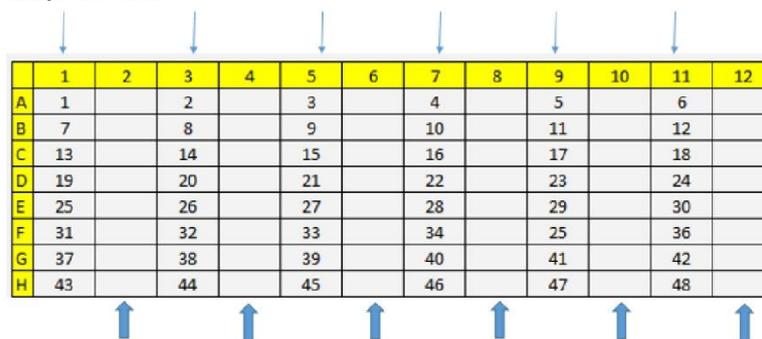
 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

**NOTA:** Esta etapa poderá ser feita no dia anterior a MAT.

### 6.3. Procedimento 2: Diluição dos soros e distribuição na placa

- ✓ Preparar o PBS 1x da seguinte forma: com uma proveta medir 225 mL de água destilada + 25 mL de PBS 10x, completando o volume final para 250 mL;
- ✓ Homogeneizar os soros por dez segundos;
- ✓ Centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm;
- ✓ Organizar os soros nas racks de 6 em 6 de acordo com a chave;
- ✓ Distribuir PBS 1x na placa alta com o auxílio do dispensador (figura 2):
  - Nas fileiras (1, 3, 5, 7, 9, 11), colocar 300 µL.
  - Nas fileiras (2,4,6,8,10,12), colocar 150 µL

300 µL de PBS 1x



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1		2		3		4		5		6	
B	7		8		9		10		11		12	
C	13		14		15		16		17		18	
D	19		20		21		22		23		24	
E	25		26		27		28		29		30	
F	31		32		33		34		35		36	
G	37		38		39		40		41		42	
H	43		44		45		46		47		48	

150 µL de PBS 1x

Figura 2: Distribuição de PBS 1x na placa.

- ✓ Cobrir a placa com papel laminado, passar a mão cuidadosamente em cima para demarcar os poços;
- ✓ Com uma caneta de ponta grossa, fazer um risco nas fileiras 2,4,6,8,10,12, a fim de evitar que esses poços sejam utilizados na primeira diluição dos soros;
- ✓ Diluir o soro na placa conferindo com a chave de identificação;
- ✓ Diluir 12,5 µL do soro nos 300 µL de PBS (1:25 final);

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

- ✓ Com o pipetador multicanal, encaixar as ponteiras de 200 µL, homogeneizar o (PBS 1x + soro) e depois pegar 150 µL da 1ª fileira que tem PBS 1x + SORO e diluir na 2ª fileira, onde tem 150 µL do PBS 1x (figura 3);
- ✓ Diluir homogeneizando 5 vezes. Utilizar a multicanal Gilson ou Thermofisher o qual tem capacidade para 300 µL;
- ✓ Repetir o procedimento para as fileiras 3, 5, 7, 9, 11.

Pipetar 150 µL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1		2		3		4		5		6	
B	7		8		9		10		11		12	
C	13		14		15		16		17		18	
D	19		20		21		22		23		24	
E	25		26		27		28		29		30	
F	31		32		33		34		35		36	
G	37		38		39		40		41		42	
H	43		44		45		46		47		48	

Figura 3: Exemplo da homogeneização.

- ✓ Com a multicanal transferir 30 µL para as placas onde serão colocados os antígenos (preparar uma placa por antígeno).

**NOTA:** Cada placa terá 48 soros, com as duas diluições sequenciais (1:50 e 1:100).

#### 6.4. Procedimento 2: Preparo dos controles do teste

- ✓ Retirar os controles (positivo e negativo) do freezer de leptos que se encontra no LPBM;
- ✓ Deixar descongelar naturalmente;
- ✓ Homogeneizar os controles no vortex;
- ✓ Identificar dois tubos eppendorf de 1,5 mL como CP e CN;
- ✓ Com o auxílio do dispensador, colocar 900 µL de PBS 1x no tubo eppendorf 1,5 mL;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

- ✓ Com o auxílio do pipetador monocanal (5-20  $\mu$ L), pipetar 18,3  $\mu$ L dos soros controles e diluir nos 900 $\mu$ l de PBS 1x , obtendo uma diluição de 1:50;
- ✓ Fechar e homogeneizar os tubos no vortex;
- ✓ Identificar uma placa de ELISA como placa controle. Na linha 1A colocar como CP (controle positivo), na linha 11 A como CN (controle negativo) e na linha 12 A como SS (sem soro);
- ✓ Identificar as linhas de acordo com a quantidade de antígenos a serem testados (atualmente utilizamos duas cepas);
- ✓ Com o auxílio da pipeta multicanal, distribuir 30  $\mu$ L de PBS 1x nas colunas de 2 a 10 e na coluna 12;
- ✓ Com o auxílio do pipetador monocanal (P-200  $\mu$ L), colocar 60 $\mu$ l do soro controle positivo diluído a 1:50 nos poços da coluna 1;
- ✓ Com o auxílio da multicanal, retirar 30  $\mu$ L do soro positivo diluído a 1:50 da primeira coluna e diluir nas demais colunas até a coluna 10, desprezar os 30  $\mu$ L. Diluir usando apenas o primeiro estágio da pipeta, aspirando e desprezando vagarosamente para não formar espuma. Durante a diluição aspirar e desprezar 10 vezes por coluna;
- ✓ Com o auxílio do pipetador monocanal (P-200  $\mu$ L), colocar 60  $\mu$ L do soro controle negativo diluído a 1:50 nos poços da coluna 11;
- ✓ Com o auxílio da pipeta multicanal, colocar 30  $\mu$ L de PBS 1x nos poços.
- ✓ Reservar a placa até colocação do antígeno.

**6.5.Procedimento 3: Preparo dos antígenos, distribuição nas placas e incubação**

- ✓ Para preparo dos antígenos, calcular a quantidade dos antígenos com base na quantidade de soros a serem testados. Para cada soro preparar 30  $\mu$ L de cada antígeno. Para uma placa completa de 96 poços o volume de cada antígeno é de 2,9 mL, e para a placa controle o volume é de 360  $\mu$ L, totalizando um volume final de 3,3 mL por antígeno;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

- ✓ Identificar os tubos de 15 mL com o n° do antígeno;
- ✓ No fluxo laminar preparar uma lamina com gotas de cada antígeno e observar a concentração dos mesmos em microscópio de campo escuro, condensador a seco, objetiva de 10 x;
- ✓ Com a pipeta graduada de 10 mL distribuir PBS 1x nos tubos de antígeno. O volume de PBS 1x irá variar de tubo para tubo a depender da concentração de cada cepa a ser diluída e do volume final de antígeno. Utilizar como base para diluição a tabela 1, e ajustar depois se for necessário;

*Tabela 1: Diluição do antígeno (valor estimado).*

<b>VOLUME DO ANTÍGENO (mL)</b>	<b>PBS 1x (mL)</b>	<b>CEPA (mL)</b>
3,5	2,0	1,5
7,0	4,0	3,0
10	6,0	4,0

- ✓ No fluxo laminar, colocar com pipetas graduadas os antígenos nos respectivos tubos em quantidades equivalentes a sua diluição;
- ✓ Com a alça bacteriológica adaptada, colher uma alçada de cada antígeno diluído, e colocar em uma lâmina limpa para análise;
- ✓ Observar as diluições em microscópio de campo escuro, condensador a seco, objetiva de 10x, para verificar a qualidade das mesmas, ou seja, não deve haver auto aglutinação e as leptospiras devem estar livres, sem o aspecto de massa esbranquiçada (figura 4);

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>



*Figura 4: Concentração ideal do antígeno.*

- ✓ Em caso da cultura estar muito densa, esta deverá ser diluída com PBS 1x, até alcançar a concentração ideal. Em caso da cultura estar auto aglutinada a mesma deverá ser centrifugada a 1.000 rpm por 1 minuto;
- ✓ Com o auxílio da pipeta multicanal, distribuir por coluna 30 µL de cada antígeno nas respectivas colunas identificadas nas placas de ELISA;
- ✓ Incubar a 30°C por 1:30 hs.

**Nota:** Preparar sempre 2 mL a mais de cada antígeno, pois ocorre perda durante a distribuição.

#### **6.6. Procedimento 4: Leitura do Teste**

- ✓ Retirar as placas da estufa;
- ✓ Limpar a placa com uma gases e colocar a mesma no suporte para leitura;
- ✓ Pegar as planilhas de resultados na prateleira da mesa do microscópio (ver modelo em anexo) será uma planilha por antígeno;
- ✓ Realizar a leitura em microscópio de campo escuro acoplado para leitura em placa utilizando a objetiva de 5x;
- ✓ Fazer a leitura primeiramente dos controles. Caso o Controle positivo apresente título de aglutinação inferior a 1:3200 para a cepa L1 130, e/ou controle negativo apresente aglutinação, desconsiderar o teste;
- ✓ Anotar os resultados da leitura dos controles no local indicado nas tabelas de resultados;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

✓ Analisar ao microscópio de campo escuro, condensador a seco, objetiva de 10X, a presença ou ausência de aglutinação, seguindo os critérios abaixo:

+: menos de 50% das Leptospiras estão aglutinadas (figura 05);

++: 50% das Leptospiras estão aglutinadas (figura 06);

+++: mais de 50% das Leptospiras estão aglutinadas (figura 07);



Figura 5: (uma cruz) + de aglutinação

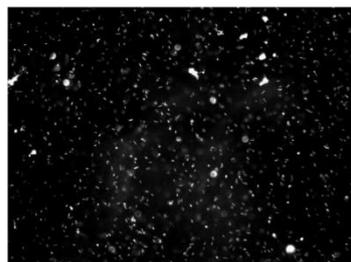


Figura 6: (duas cruces) ++ de aglutinação.

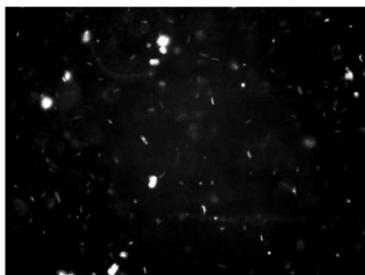


Figura 7: (três cruces) +++ de aglutinação.

✓ Se a placa controle for aprovada dar continuidade com a leitura das amostras;

✓ Anotar os resultados na planilha triagem;

✓ Se as amostras tiverem duas ou três cruces de aglutinação as mesma deverão ser tituladas (**Procedimento 5**). Caso contrário considera-lás como resultado negativo, e liberar os resultados (**Item 7**).

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

## 6.7. PROCEDIMENTO 5: TITULAÇÃO

### 6.7.1. Identificação das amostras a serem tituladas

- ✓ Identificar as amostras a serem tituladas;
- ✓ Imprimir a planilha “Titulação” seguindo o mesmo procedimento 1 do item 6.2;
- ✓ Identificar a placa de ELISA com o n° da chave do indivíduo na parte superior e a cepa, na parte inferior da placa conforme figura 8;

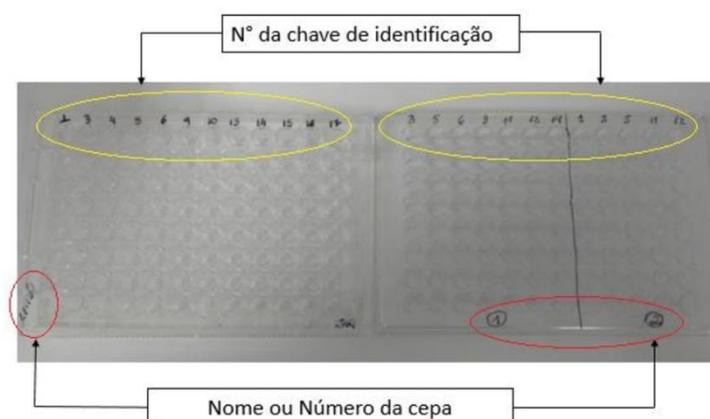


Figura 8: Modelo de como deverá ser a placa par titulação.

### 6.7.2. Preparo dos soros e diluição na placa

- ✓ Diluir em eppendorfs 12,5 µL do soro a ser titulado em 300 µL de PBS;
- ✓ Homogeneizar essa diluição no vortex por 10 segundos e posteriormente colocar 60 µL no 1º poço da placa e sair diluindo nos poços seguintes contendo 30 µL do PBS. Para cada antígeno que o soro será titulado utilizar uma coluna na placa;

### 6.7.3. Distribuição dos Antígenos nas Placas e Incubação

- ✓ No fluxo laminar, colocar cada um dos antígenos previamente diluídos em canaletas para pipetas multicanal, previamente identificadas;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

✓ Com o auxílio da pipeta multicanal, distribuir por coluna 30 µL de cada antígeno nas respectivas colunas identificadas nas placas de ELISA e incubar a placa por 1:30 hs;

#### **6.7.4. Leitura**

- ✓ Retirar as placas da estufa;
- ✓ Limpar a placa com uma gaze e colocar a mesma no suporte para leitura;
- ✓ Analisar ao microscópio de campo escuro, condensador seco, objetiva de 5x, o título encontrado de acordo com o poço até onde houve 50% de aglutinação (utilizar a tabela 2 como base);
- ✓ Fazer a leitura primeiramente dos controles. Caso o Controle positivo apresente título de aglutinação inferior a 1:3200 para a cepa L1 130, e/ou controle negativo apresente aglutinação, desconsiderar o teste;
- ✓ Anotar os resultados dos títulos alcançados na planilha da triagem, dos devidos soros.

**Notas:** Após o teste colocar as placas e tubos de diluição de molho no hipoclorito por 24 horas e encaminhar para a sala de esterilização. Guarda os soros na caixa de origem, em suas devidas posições e congelar novamente.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

Tabela 2: Títulos encontrados de acordo com os poços até onde houve 50% de aglutinação.

POÇOS	TÍTULOS
1	50
2	100
3	200
4	400
5	800
6	1600
7	3200
8	6400

## 7. LIBERAÇÃO DE RESULTADOS

- ✓ Preencher a planilha de resultados que se encontra nas pastas dos projetos do Soroinquérito. O caminho eletrônico para a planilhas é:  
[\\lgm-dc1\neb\Banco de Dados\BDCONSULTA](#)
- ✓ A pasta a ser aberta deverá ser a do seguimento, por exemplo, L30 ou L38;
- ✓ Preencher da seguinte forma:
- ✓ Copiar e colar da planilha de triagem com o nº dos participantes a coluna IDNO;
- ✓ Na coluna EXECUTOR preencher com as iniciais da pessoa que fez a leitura da MAT;
- ✓ Na coluna DATA EXEC preencher com a data da realização do teste;
- ✓ Os demais campos preencher com os títulos encontrados para cada antígeno nas suas respectivas colunas, ou preencher com 0 (zero) quando o resultado for negativo;
- ✓ Na coluna SOROV (provável sorovar infectante) preencher com o código da cepa que apresentar maior título. Ver código das cepas em anexo;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

- ✓ Após digitar e conferir os resultados enviar os resultados para Nivison e Mayara via e-mail (nivisonjr@hotmail.com/maycarvalhods@gmail.com).

#### **8. REFERÊNCIAS**

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

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

## 9. ANEXOS

**Tabela 4:** Lista das cepas utilizadas no MAT.

<b>BATERIA REDUZIDA</b>				
<b>Nº</b>	<b>Species</b>	<b>Serogroup</b>	<b>Serovar</b>	<b>Strain</b>
1	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	L1 130
2	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
3	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
4	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
5	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Duyster
6	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
7	<i>L. santarosai</i>	Shermani		LV 3954
8	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA

**Tabela 5:** Código das cepas para liberação de resultados das amostras do soroinquérito

<b>Código da Cepa</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Serovar</b>	<b>Cepa</b>
0	Negativo		
1	Icterohaemorrhagiae	<i>copenhageni</i>	L1 130
5	Misto		
11	Cynopteri	<i>cynopteri</i>	3522 C

 Ministério da Saúde FIOCRUZ-BA	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>	
	<b>POP MICROAGLUTINAÇÃO PARA AMOSTRAS DO SOROINQUÉRITO</b>	<b>IGM – LEPTO-11</b>

**Eu afirmo que li, entendi, concordo e fui treinado (a) com o presente POP.**

<b>NOME</b>	<b>ASSINATURA</b>	<b>DATA</b>

