

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA
INVESTIGATIVA

TESE DE DOUTORADO

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

Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Salvador - Bahia
2010

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA
INVESTIGATIVA

TESE DE DOUTORADO

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

Ridalva Dias Martins Felzemburgh
Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Co-orientador: Dr. Albert Icksang Ko

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa da Fundação Oswaldo Cruz – Bahia como requisito obrigatório para obtenção do Título de Doutor.

Salvador - Bahia
2010

Aos meus pais e a Maurício: minha vida!
Ao Bola de Pêlo, minha doce companhia dos dias e das noites em claro!
Ao (À) nosso (a) pequenino (a) que vai nascer: você já faz a diferença!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e ao Dr. Albert Icksang Ko pela orientação e incentivo durante todos estes anos.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular que colaboraram para a realização deste estudo, especialmente ao Renato Reis pelo companheirismo durante estes anos de trabalho.

Aos colegas e funcionários da Pós-graduação em Biotecnologia pela atenção e presença constante durante o curso.

À analista de métodos quantitativos Dra. Romy Ravines por toda a disponibilidade, coleguismo e aconselhamento nas análises estatísticas.

Aos membros da banca, Dra. Marília Sá Carvalho, Dra. Joice Neves Reis Pedreira e Dr. Wagner de Souza Tassinari, que colaboraram para o aprimoramento desta tese.

À FIOCRUZ-Bahia e à FAPESB pela concessão da bolsa de doutorado.

Em especial, aos moradores de Pau da Lima, que com sua solicitude possibilitaram a realização deste estudo.

À minha família e aos meus amigos, pessoas muito especiais, sempre tão presentes em minha vida.

RESUMO

A leptospirose tem emergido como um importante problema de saúde pública no mundo. Em Salvador, esta zoonose é responsável por epidemias anuais que acometem principalmente indivíduos residentes em comunidades negligenciadas. Poucos estudos foram realizados no intuito de compreender a carga da doença e os fatores de risco para infecção. Estudos longitudinais são necessários para guiar intervenções de saúde pública voltadas para a prevenção da leptospirose urbana. Objetivos: 1-Determinar a soroprevalência de infecção prévia por *Leptospira* e identificar fatores de risco sociais e ambientais para infecção prévia por *Leptospira*, 2- avaliar a dinâmica nas taxas de infecção para três anos de seguimento da coorte e identificar possíveis fatores de risco para infecção. No presente estudo, foi realizado um estudo de coorte prospectiva com 2.003 residentes selecionados randomicamente em uma comunidade carente em Salvador-Bahia que foram acompanhados por três anos. Entrevistas domiciliares e inquéritos com Sistema de Informação Geográfica foram realizados anualmente para obter indicadores demográfico-comportamentais e geocodificar possíveis fontes ambientais de contaminação, respectivamente. O teste de microaglutinação foi utilizado para avaliar amostras sorológicas obtidas anualmente e identificar infecção por *Leptospira*. Em relação ao primeiro objetivo, 15% dos 3.171 participantes apresentaram evidência sorológica para infecção prévia pela *Leptospira*. Fatores associados de forma independente à infecção prévia por *Leptospira* foram: idade, tendo os indivíduos acima de 45 anos o maior risco entre as faixas etárias, sexo masculino, áreas com risco para alagamento com esgotos abertos, proximidade do domicílio a acúmulo de lixo, ver ratos, presença de galinhas no domicílio, raça negra e baixa renda. Cada acréscimo de 1 dólar na renda familiar per capita reduziu em 11% o risco de infecção prévia (IC 95%, 5%-18%). A respeito do segundo objetivo, 121 indivíduos foram infectados uma ou mais vezes (140 infecções no total) entre 1.300 (65% de 2.003) indivíduos da coorte que completaram os 3 anos de seguimento. A média de incidência anual de infecção foi 35,9 por 1.000 pessoas-ano (IC 95%, 25,8- 46,0), sendo a de infecção primária 32,2. Infecções repetidas foram comuns nesta população, isto se observa pelas taxas de infecção secundária 126,8 e infecção terciária 250,0. Fatores de risco independentes para infecção por *Leptospira* foram: idade, tendo como referência crianças de 5-14 anos, 15-24; 35-44; 45 ou mais; sexo masculino, residir a até 20m de esgoto aberto e a até 20m do ponto mais baixo no vale, raça negra e renda per capita. A cada dólar acrescido à renda familiar per capita foi decrescido em 24% o risco de infecção (IC 95%, 7%-38%). O número de infectados foi muito superior ao de casos graves notificados. Identificamos um grupo de risco nesta comunidade que está sendo infectado por *Leptospira* repetidas vezes. O presente estudo indica que medidas preventivas devem focalizar deficiências de infra-estrutura que servem como fontes de transmissão. Intervenções mais efetivas precisam se concentrar especialmente nos adultos jovens e os mais desfavorecidos nestas comunidades.

Palavras-chave: leptospirose, transmissão, favelas urbanas, fatores de risco

ABSTRACT

Leptospirosis has emerged to become a significant public health problem worldwide. In Salvador this zoonotic disease is responsible for annual epidemics which affect especially residents from neglected communities. Few studies have been performed to understand the disease burden and to identify risk factors for infection. Longitudinal studies are necessary to guide public health interventions to prevent urban leptospirosis. Objectives: 1- to determine the seroprevalence of previous *Leptospira* infection and identify environmental and social risk factors for previous *Leptospira* infection, 2- to evaluate Infection rates dynamics for the three-year of follow-up of the cohort and to identify risk factors for infection. In this present study, a prospective cohort study was performed with 2,003 randomly-selected residents of a slum community in the city of Salvador-Bahia and who were followed for three years. Household interviews and Geographical Information System surveys were performed annually to obtain information on demographics and risk behaviors and geocodify environmental transmission sources, respectively. The microagglutination test was used to evaluate serum samples obtained during annual serosurveys and identify *Leptospira* infection. In relation to the first objective, 15% of the 3,171 study participants had serological evidence for prior *Leptospira* infection. Factors independently associated with *Leptospira* infection were: age, with individuals aged 45 years or more being the at higher risk than the other age groups, male gender, residence in flood-risk regions with open sewers and proximity to accumulated refuse, sighting rats, presence of chickens in the household, black race and low income. An increase of a dollar per day in per capita household income was associated with an 11% (95% CI, 5%–18%) decrease in previous infection risk. With respect to the second objective, 121 individuals were infected one or more times (140 infections in total) among the 1,300 (65% of 2,003) cohort individuals who completed the three-year of follow-up period. The mean annual infection rate was 35.9 per 1,000 person-years (95% CI, 25.8- 46.0), being the primary infection rate 32.2. Repeated infections were common within this population, we can see this because of the secondary infection rate that was 126.8 and the tertiary infection rate which was 250.0. Independent factors for *Leptospira* infection were age, having the age group 5-14 as the reference group, 15-24; 25-34; 35-44; 45 or more; male gender, to reside in proximity (<20m) to open sewers and <20m to flood regions, black race and low income. Each dollar increase per day in per capita household income was associated with a 24% (95% CI, 7%-38%) decrease in infection risk. The number of infected individuals is much higher than the number of severe cases. We identified a high risk group within this community which is susceptible to being repeatedly infected with *Leptospira*. Prevention measures must target infrastructure deficiencies that serve as transmission sources. Effective interventions must focus on the young adults and the most neglected individuals within these communities.

Keywords: leptospirosis, transmission, urban slums, risk factors

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC: Centros para Controle e Prevenção de Doenças, do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Intervalo de confiança

ELISA - IgM: Reação Imunoenzimática de Captura de IgM, do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Epi Info: Programa para gerenciamento e análise estatística de dados

FAPEX: Fundação de Apoio à Pesquisa e à Extensão

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

GAM: Modelo Aditivo Generalizado, do inglês, *Generalized Additive Model*

GEE Model: Modelo de Equações de Estimação Generalizada, do inglês, *Generalized Estimation Equations Model*

GIS: Sistema de Informação Geográfica, do inglês, *Geographical Information System*

IQR: Intervalo interquartil, do inglês *Interquartile Range*

LPBM :Laboratório de Patologia e Biologia Molecular

MAT: Teste de Aglutinação Microscópica ou Microaglutinação, do inglês, *Microagglutination Test*

NEB: Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística

No.: Número

PCR: Reação em cadeia de polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PR: Razão de prevalência, do inglês, *Prevalence Ratio*

R: Programa para análises de dados estatísticos

RR: do inglês, *Risk Ratio*

Real-time PCR: Reação em cadeia de polimerase em tempo real, do inglês, *Real-time Polymerase Chain Reaction*

SECOMP: Secretaria de Combate à Pobreza

SHPL: Síndrome de hemorragia pulmonar grave associada à leptospirose

WHO: Organização Mundial de Saúde, do inglês, *World Health Organization*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1- INTRODUÇÃO	10-23
2- JUSTIFICATIVA.....	24-29
3- OBJETIVOS DO ESTUDO	30
3.1- Objetivo Geral	30
3.2- Objetivos Específicos	30
4- MANUSCRITO 1.....	31-41
5- MANUSCRITO 2.....	42-69
6- DISCUSSÃO	70-76
7- CONCLUSÕES	77-79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80-87

ANEXOS

Anexo I: Termo de consentimento original

Anexo II: Folha comum para menores de idade e adultos

Anexo III: Folha específica para menores de idade

Anexo IV: Termo de consentimento traduzido

Anexo V: Questionário dos seguimentos

Anexo VI: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM – FIOCRUZ

Anexo VII: Parecer do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

Anexo VIII: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cornell –
E.U.A

Anexo IX: Protocolo para os dados epidemiológicos: sumário e partes mais relevantes

Anexo X: Protocolo de Coleta de Sangue

Anexo XI: Protocolo para processamento e recepção das amostras

Anexo XII: Prova de microaglutinação para soroprevalência (MAT)

1- INTRODUÇÃO

Epidemiologia

A Leptospirose, doença que tem como agente etiológico bactéria do gênero *Leptospira*, está presente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, nos países considerados desenvolvidos e nos em desenvolvimento (Vinetz et al., 1996; Bharti et al., 2003; Romero et al., 2003). Entretanto, sua incidência é maior nas regiões tropicais onde encontra condições mais favoráveis para transmissão (Vinetz et al., 1996; Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003), especialmente durante as estações chuvosas que propiciam a ocorrência de surtos (Ko et al., 1999; Tassinari et al., 2008). As atividades ocupacionais e exposições da população em geral durante sua rotina, sobretudo associada à pobreza, aos períodos de chuva (sazonalidade) são de grande importância (Vinetz et al., 1996; Ko et al., 1999; Costa et al., 2001; Vinetz et al., 2001; Bharti et al., 2003; Meites et al., 2004).

Inicialmente, a leptospirose foi considerada uma doença rural (Faine et al., 1999; Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003) ou ocupacional, associada a pessoas que trabalham em lavouras de arroz, em esgotos, açougueiros, pescadores, veterinários e militares (Faine et al., 1999; Kariv et al., 2001; Bharti et al., 2003; Boland et al., 2004; Silva et al., 2004). Nos países em desenvolvimento, ocorrem muitos casos em ambientes urbanos como epidemias associadas às estações chuvosas e enchentes relacionadas às condições precárias de vida e saneamento (bairros pobres; favelas) (Douglin et al., 1997; Ko et al., 1999; Kupek et al., 2000; Barcellos & Sabroza, 2001; Costa et al., 2001; Bharadwaj et al., 2002; Vado-Solís et al., 2002; Covic et al., 2003; Romero, 2003; Riley et al., 2007) ou, em países considerados desenvolvidos, às atividades recreativas que envolvem imersão em água ou enchentes (Galé et al., 1966; Douglin

et al., 1997; CDC, 2001; Haake et al., 2002; Morgan et al., 2002; Perra et al., 2002; Boland et al., 2004; Meites et al., 2004; Silva et al., 2004).

A leptospirose é uma patologia de grande importância social e econômica por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, alto custo hospitalar, perdas na produtividade (dias de trabalho) e também por sua letalidade (Ko et al., 1999; Gouveia et al., 2008). Em termos de custos diretos, o impacto da leptospirose para o setor da saúde está relacionado à gravidade da doença com elevado número de hospitalizações, demandando alto investimento em cuidados de terapia intensiva. Em relação às implicações na produtividade, a população mais acometida é formada por indivíduos do sexo masculino em idade produtiva (20 a 40 anos) levando, portanto, a uma perda na relação produtividade/tempo, citada anteriormente. Também ocorrem perdas na pecuária e morte de animais domésticos de estimação. Em termos de custos indiretos, poderíamos citar o investimento na pesquisa, desenvolvimento, produção e avaliação de vacinas para animais e seres humanos, controle de roedores, ações de vigilância, custos com equipamentos de proteção individual e quimioprofilaxia.

A ocorrência da forma grave, denominada doença de Weil, está relacionada às precárias condições de infra-estrutura sanitária e alta infestação de roedores infectados (Douglin et al., 1997; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Ganoza et al., 2006). As inundações propiciam a disseminação e a persistência do agente causal no ambiente, facilitando a eclosão de surtos. Fatores como reservatório animal, capacidade do ambiente em garantir sobrevivência do organismo, comportamento e hábitos ocupacionais podem ser determinantes da incidência e prevalência da doença (Sarkar et al., 2002). Em geral, dados de incidência de leptospirose são subestimados devido à forma sub-clínica da doença que pode ser confundida com um resfriado

comum e tende a passar despercebida (Katz et al., 2001; Vinetz et al., 2001; Bharti et al., 2003). Sendo assim, o número global de casos fica baseado nos casos graves da doença (Pappas et al., 2008).

A dificuldade de padronização de um teste diagnóstico rápido para leptospirose também colabora para subestimar o número real de casos, sendo o diagnóstico precoce um fator muito importante para o prognóstico do indivíduo que apresenta a forma grave da doença (Katz et al., 2001; Kobayashi et al., 2001; Bharti et al., 2003). A leptospirose pode ocorrer em indivíduos de todas as idades e em ambos os sexos (Kobayashi et al., 2001), porém, entre os casos notificados as maiores frequências (mais de 80% dos casos) têm sido encontradas entre indivíduos do sexo masculino, na faixa etária de 20 a 40 anos, ainda que não seja comprovada uma predisposição de gênero ou de idade para contrair a infecção, (Everard et al., 1995; Ko et al., 1999; WHO, 1999; Arian, 2000; Romero et al., 2003; Lopes et al., 2004; Meites et al., 2004; Tangkanakul et al., 2005; Jansen et al., 2007), sendo a taxa de letalidade crescente de acordo com a idade (Kobayashi et al., 2001).

Além disso, as condições ambientais afetam intensamente a transmissão da leptospirose através da modificação da biologia e comportamento da população e da ecologia das espiroquetas e seus hospedeiros. As fontes mais frequentes de infecção são água superficial, lama e solo contaminados por urina do animal infectado (Vinetz et al., 1996; Vinetz et al., 2001; Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003; Meites et al., 2004).

Alguns estudos apontam a leptospirose como um problema de saúde pública que está emergindo novamente nos centros urbanos, junto com a rápida urbanização e a crescente desigualdade social (Vinetz et al., 1996; Trevejo et al., 1998; Ko et al., 1999, Tangkanakul et

al., 2005). No Brasil, ela é considerada uma doença endêmica com mais de 10.000 casos notificados por ano com surtos relacionados aos períodos de chuvas intensas (Caldas et al., 1979; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Kupek et al., 2000; Barcellos & Sabroza, 2001; Costa et al., 2001; SVS, 2007), semelhante ao que se observa em várias partes do mundo (Meites et al., 2004). Com a migração da zona rural para urbana e o crescimento populacional, ocorreu a formação de favelas, locais desprovidos de infra-estrutura sanitária adequada e com alta infestação de roedores, aumentando o risco para a infecção por *Leptospira* (Douglin et al., 1997; Faine et al., 1999; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Haake et al., 2000; Flannery et al., 2001; Sarkar et al., 2002; Vado-Solís et al., 2002).

As medidas de prevenção disponíveis contra a leptospirose incluem controle de reservatórios, proteção aos que trabalham em atividades consideradas de maior risco, melhoria das condições higiênico-sanitárias da população e medidas corretivas no meio ambiente (Kobayashi et al., 2001). O controle dos reservatórios não é uma medida resolutiva e com boa relação custo-benefício para países em desenvolvimento. No Brasil, a imunização está disponível apenas para animais. Países como Cuba e China desenvolveram vacinas para usarem em seres humanos, porém estas conferem proteção de curta duração e não geram proteção cruzada contra sorovares não presentes na vacina (McBride et al., 2005). Isto exige reforços periódicos, elevando seu custo e impossibilitando sua utilização sistemática nos países em desenvolvimento. Alguns efeitos adversos que levam desconforto aos indivíduos, a exemplo da hipertermia, também colaboram para limitar o uso das vacinas sendo que, em países como França e alguns países europeus, a vacinação é direcionada a grupos de alto risco para aquisição da doença (Nardone et al., 2004). Algumas medidas de prevenção são voltadas para cuidados de higiene e saneamento básico, tais como, cuidados com água e alimentos para

evitar contaminação, drenagem de água pluvial e servida, coleta de lixo, medidas para evitar contato com água e solo contaminados (equipamentos de proteção individual).

O diagnóstico ambulatorial e o início da antibioticoterapia nos primeiros dias de doença podem impedir a progressão de infecção clínica para a forma grave da leptospirose (Katz et al., 2001), doença fulminante, sendo que mais de 50% dos óbitos ocorrem nas primeiras 48 horas de hospitalização. Apesar de medidas de suporte e terapia com penicilina, a letalidade permanece maior que 10%. O quadro clínico inicial inespecífico dificulta a identificação dos casos de leptospirose (Ko et al., 1999; Flannery et al., 2001). A identificação de fatores de risco geográficos, sociais, culturais, climáticos, ocupacionais, aparentemente deveria tornar mais fácil prevenir a leptospirose, porém a dificuldade em controlar ou modificar estes fatores, a complexidade da interação homem e meio ambiente, contribuem para a persistência da alta incidência da doença e das epidemias cíclicas durante o período de chuvas fortes ao redor do mundo (Caldas et al., 1979; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Kupek et al., 2000; Karande et al., 2002; Sarkar et al., 2002; Romero et al., 2003; Tassinari et al., 2004; LaRocque et al., 2005; Sethi et al., 2010). A terapêutica não mostra os resultados esperados, pois o número de casos por ano e a letalidade permanecem elevados, a busca pelo conhecimento e a prevenção ainda se mostram como as grandes armas para reduzir o número de casos (Ko et al., 1999; Flannery et al., 2001; Costa et al., 2001).

O agente

Em relação ao agente causal, o gênero *Leptospira* é classificado em oito espécies genômicas de espiroquetas obrigatoriamente aeróbias, sendo as mais conhecidas: *Leptospira interrogans* (*sensu lato*), patogênica, e *Leptospira biflexa* (*sensu lato*), saprófitas de vida livre e

as primeiras a serem descritas (Faine, 1982; Douglin et al., 1997; Haake et al., 2000; CDC, 2001; Nascimento et al., 2004).

Mais de duzentos sorovares, distribuídos em vinte e quatro sorogrupos foram identificados de acordo com a diversidade antigênica do lipopolissacarideo destas leptospiras patogênicas (Faine, 1982; Faine et al., 1999; Levett, 2001; Bharti et al., 2003). Cada sorovar pode estar associado a uma característica grave ou doença, afinidade por um reservatório ou distribuição geográfica distinta (Vinetz et al., 1996; Faine et al., 1999; Arean, 2000; Flannery et al., 2001). O genoma da *Leptospira*, com seqüenciamento finalizado para os sorovares Lai, Copenhageni e Hardjo, é composto por dois cromossomos circulares (Ren et al., 2003; Nascimento et al., 2004; Bulach et al., 2006).

A grande variação antigênica da *Leptospira* e a diversidade de hospedeiros, a capacidade de sobreviver, persistindo no meio ambiente favorável (umidade, veículo hídrico) por até seis meses são fatores ligados ao agente etiológico que possibilitam a persistência da leptospirose como um importante problema, em termos de saúde pública. Os animais são os reservatórios essenciais para a persistência dos focos da infecção, enquanto os seres humanos são apenas hospedeiros acidentais ou incidentais por contato direto ou indireto com a urina de animais contaminados (Vinetz et al., 1996; Faine et al., 1999; Pereira et al., 2000; Bharti et al., 2003; Jagadishchandra et al., 2003; Meites et al., 2004; Nascimento et al., 2004).

A *Leptospira* é um patógeno que possui a habilidade de induzir um estado de portador em uma gama extensa de animais selvagens e domésticos (Trevejo et al., 1998; Faine et al., 1999; Costa et al., 2001). Teoricamente, todos os mamíferos podem ser reservatórios para a *Leptospira* (WHO, 1999), porém os principais são os roedores domésticos, das espécies *Rattus*

norvegicus; *Rattus rattus* e *Mus musculus*. A identificação do reservatório auxilia a identificar o sorovar predominante em um local, uma vez que determinados reservatórios estão comumente associados a determinados sorovares (Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003). O *Rattus norvegicus*, por exemplo, é o principal portador da *Leptospira Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni (Faine, 1982; Faine et al., 1999; Plank & dean, 2000; Levett, 2001; Vinetz, 2001), a que mais predomina em ambiente urbano e uma das mais patogênicas para o homem (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000; Barocchi et al., 2001; Romero et al., 2003; Tucunduva de Faria et al., 2007). Outros reservatórios do patógeno também importantes são: caninos, suínos, bovinos, eqüinos, ovinos e caprinos.

Patogenia

A leptospirose é mantida pela colonização persistente dos túbulos proximais nos rins dos animais considerados reservatórios, a exemplo dos ratos, podendo um animal infectado apresentar-se assintomático e liberar organismos infectantes na urina durante todo o seu período de vida de forma intermitente ou contínua. A *Leptospira* necessita de um meio alcalino para sobreviver e proliferar (urina alcalina), desta forma, animais que excretam urina alcalina (herbívoros) são portadores mais relevantes que os demais (Faine et al., 1999; Bahrti et al., 2003; Meites et al., 2004).

A interação entre as leptospirosas e o hospedeiro animal é um processo dinâmico que envolve fatores relacionados tanto ao agente etiológico quanto ao hospedeiro. As leptospirosas penetram principalmente através de pequenas lesões na superfície tegumentar (Kobayashi et al., 2001; Phraisuwan et al., 2002; Sarkar et al., 2002), pele e mucosa íntegras imersas em água contaminada por longo período (Binder et al., 1998; Kobayashi et al., 2001; Morgan et al., 2002; Meites et al., 2004). Outras vias são menos comuns: conjuntiva, mucosa nasofaríngea,

inalação de aerossóis, transmissão vertical, ingestão ou inalação de água após imersão, ingestão de alimentos contaminados, contato com sangue, tecidos e excretas animais, mordeduras (Aoki et al., 2001; Kobayashi et al., 2001; Sarkar et al., 2002; Boland et al., 2004).

As leptospiras se disseminam imediatamente da porta de entrada para a corrente sanguínea, circulando por todo o corpo, concentrando-se primeiramente nos pulmões, fígado e baço (Faine, 1962). Leptospiras não virulentas são eliminadas de forma rápida por aglutinação, opsonização ou fagocitose em animais já imunes ou, em animais não imunes, podem se reproduzir e causar danos ao endotélio vascular. Aquelas que sobrevivem crescem exponencialmente na corrente sanguínea e tecidos.

Inicialmente, o número elevado de leptospiras no sangue e tecidos leva ao rompimento da integridade da membrana celular das células endoteliais e pequenos vasos, provavelmente devido ao depósito de imunocomplexos nas paredes dos vasos e órgãos. Este evento pode resultar em extravasamento capilar e hemorragia (Sarkar et al., 2002), originando isquemia local e necrose tubular renal, hepatoesplenomegalia, meningite, icterícia, episódios hemorrágicos.

A imunidade a uma infecção inicial é aparentemente apenas humoral por tratar-se de um patógeno preferencialmente extracelular (Adler & Faine, 1977; Adler & Faine, 1978). A imunidade adquirida pós-infecção, que resulta da maturação e desenvolvimento de uma resposta imunológica mediada por células B, é sorotipo-específica. Ainda não se compreende o motivo de apenas, aparentemente um máximo 10%, dos indivíduos infectados, evoluírem para a forma grave da doença (Berman et al., 1973), enquanto os demais evoluem assintomáticos ou com sintomatologia semelhante à de um resfriado comum (Flannery et al., 2001). As

complicações mais graves surgem após o desenvolvimento de uma resposta adaptativa e alterações funcionais ocorrem mesmo diante do pequeno número de leptospiros encontradas nos tecidos. Falta entender se as lesões têm como causa principal as reações imunológicas, como se acredita que acontece no caso da hemorragia pulmonar (Nally, 2004), ou devido à toxicidade bacteriana, como parece ocorrer no tecido hepático (Bharti, 2003).

A infecção por *Leptospira* patogênica produz uma diversidade de sinais e sintomas clínicos que podem variar desde uma infecção sub-clínica ou auto-limitada, que acomete 90% ou mais dos indivíduos, até a apresentação clássica denominada doença de Weil que representa de 5 a 10% do total de casos (Sarkar et al., 2002; Covic et al., 2003) e é potencialmente letal (Farr, 1995; Kobayashi et al., 2001; Romero et al., 2003). A taxa de letalidade geralmente varia de 5 a 20%, nas formas mais graves, que evoluem com disfunção de múltiplos órgãos e sistemas e sepse, incluindo hemorragia pulmonar, a letalidade pode ser superior a 50% (Gonçalves et al., 1992; Ko et al., 1999; Marotto et al., 1999; Flannery et al., 2001; Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003; Gouveia et al., 2008).

A gravidade da infecção pode estar relacionada a fatores e/ou a interação entre eles, tais como virulência do sorovar de *Leptospira* que o infecta, exposições ambientais que podem influenciar a dose do inóculo infectante, características do hospedeiro como a idade do indivíduo, seu estado nutricional e sua resposta imunológica (Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Barcellos & Sabroza, 2001; Sarkar et al., 2002; Lingappa et al., 2004; Ganoza et al., 2006; Thaipadungpanit et al., 2007;). O período de incubação é usualmente entre sete e doze dias, mas pode durar de dois a trinta dias (Faine et al., 1999; Kariv et al., 2001; Katz et al., 2001). Os quadros discretos (forma anictérica) apresentam sinais e sintomas inespecíficos como febre de início súbito, cefaléia e mialgias, conjuntivite, anorexia, algia abdominal,

náuseas e vômitos, hemorragias: subcutânea (petéquias e púrpuras), gengival e palatar, do trato gastrintestinal, conjuntival, genital, hematúria.

Os sinais de infecção grave (forma ictérica) podem incluir icterícia, hepatoesplenomegalia, meningite asséptica, podendo evoluir para a forma mais grave e potencialmente letal que é a doença de Weil com falência renal (após lesão renal tubular e microvascular e evolução para nefrite) e hepática, miocardite, hemorragia pulmonar maciça e óbito (Binder et al., 1998; WHO, 1999; CDC, 2001; Flannery et al., 2001; Kobayashi et al., 2001; Perra et al., 2002; Covic et al., 2003; Meites et al., 2004; Nardone et al., 2004). Entre os sinais e sintomas neurológicos, podem ocorrer cefaléia intensa, distúrbios da consciência, delírios, rigidez de nuca (Farr, 1995; CDC, 1997; Kobayashi et al., 2001; Meites et al., 2004).

A fase septicêmica ou fase de leptospiremia tem duração provável de quatro a sete dias, e é caracterizada por doença febril aguda (38 a 40°C), cefaléia, calafrios, mialgias, principalmente em panturrilhas, desconforto gastrointestinal, anorexia, sede intensa, icterícia por lesão hepática. A fase seguinte denominada fase imune ou fase de leptospirúria com duração de até um mês, é nela que ocorre a produção de anticorpos aglutinantes IgM que determinam a formação de imunocomplexos circulantes, a diminuição da leptospiremia, localização das leptospiras em locais de difícil acesso para os anticorpos produzidos e a excreção das mesmas pela urina (WHO, 1999).

Pode haver evolução do quadro de leptospirose grave com presença de meningite, meningoencefalite, pneumonia, fenômenos hemorrágicos, icterícia, insuficiências renal e hepática, hepatoesplenomegalia, hemoptise, hemorragia pulmonar maciça, miocardite, podendo levar o paciente ao óbito (Faine et al., 1962; CDC, 1997; Faine et al., 1999;

Kobayashi et al., 2001; Vado-Solís et al., 2002). A ocorrência de insuficiência renal aguda frequentemente leva à falência de múltiplos órgãos e óbito, sendo também a diátese hemorrágica e complicações neurológicas, assim como a insuficiência renal aguda, marcadores de prognóstico sombrio (Covic et al., 2003). A Síndrome de Hemorragia Pulmonar (SHPL) identificada ao redor do mundo desde o surto da Nicarágua em 1995 (Gonçalves et al., 1992; Trevejo et al., 1998; Zaki et al., 1996; Nicodemo et al., 1997; Marotto et al., 1999; Watt et al., 1988; McClain et al., 1984; Levett et al., 2001;), representa um novo padrão clínico com determinantes ainda desconhecidos e elevado número de óbito (acima de 50%) mesmo com suporte ventilatório intensivo (Gonçalves et al., 1992; Marotto et al., 1999; Vado-Solís et al., 2002; Gouveia et al., 2008).

A inespecificidade de sinais e sintomas, faz com que a maior parte dos casos de leptospirose não seja diagnosticada devido à confusão com doenças que vão desde um resfriado comum ou uma gripe, a outras mais graves como meningite, hepatites, malária, dengue, febre amarela, entre outros (Levett et al., 2001). A confirmação do diagnóstico torna-se difícil, pois é laborioso isolar o organismo para realizar os testes laboratoriais (Kariv et al., 2001; Katz et al 2001).

A história clínica, sintomas e achados no exame físico, dados epidemiológicos como relatos de exposições ambientais de risco podem levar a uma suspeita do diagnóstico clínico precoce de leptospirose, porém, é necessária a confirmação laboratorial. Entre os sinais e sintomas que podem ser relatados e levar à suspeita de leptospirose estão: doença febril aguda, cefaléia, rash de mucosa e tegumento, sufusão conjuntival, algia muscular, especialmente em panturrilhas. Proteinúria, leucocitose com neutrofilia e alta sedimentação eritrocitária são achados laboratoriais que auxiliam no diagnóstico precoce (Kobayashi et al., 2001). Os

indivíduos geralmente se recuperam completamente da forma leve. Se ocorre o progresso da leptospirose para sua forma grave com hemorragia de órgãos vitais, falências renal e hepática, tratamento com diálise e suporte podem elevar as chances de sobrevivência, porém complicações pulmonares e cardiológicas podem levar à morte (Daher et al., 1999; Marotto et al., 1999).

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por visualização direta, isolamento do organismo, testes sorológicos ou métodos moleculares (Levett et al., 2001). A visualização direta do organismo em amostras de sangue ou urina é realizada com o uso da microscopia de campo escuro, entretanto, este método tem baixa sensibilidade e especificidade, sendo pouco empregado. A *Leptospira* pode ser identificada na urina, em fluidos corporais e tecidos através de observação microscópica (diagnóstico direto), podendo ser isolada em meios de cultivo e inoculada em animais de laboratório (hamster, cobaio jovem).

Os testes sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico da leptospirose, sendo que a microaglutinação (MAT) é considerada o método de referência ou padrão-ouro na confirmação do diagnóstico de leptospirose (Meites et al., 2004). Na MAT são utilizados antígenos dos sorovares representativos de todos os sorogrupos ou daqueles mais representativos em cada contexto (Meites et al., 2004). Na análise de amostras positivas deve ser considerada a reação cruzada de anticorpos, pois as reações podem não ser específicas para um determinado sorovar (Kobayashi et al., 2001). As dificuldades inerentes ao teste o tornam realizável apenas em laboratórios de referência (Faine, 1982; Faine et al., 1999). Os anticorpos começam a ser detectados na primeira semana da doença (três a dez dias) e alcançam títulos máximos por volta da terceira e quarta semanas quando começam a decair progressivamente por semanas ou meses, podendo persistir por anos (Kobayashi et al., 2001). Por este motivo,

toma-se difícil afirmar, diante de um resultado positivo (reagente), se a infecção está em atividade ou já ocorreu no passado. Uma outra limitação do teste, relacionada à detecção de casos graves, é a necessidade de amostras pareadas para confirmação de diagnóstico (WHO, 1999). Outros testes sorológicos comumente utilizados incluem hemaglutinação indireta e ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Tratamento

O medicamento de eleição para quimioprevenção após exposição por curto período de tempo é a doxiciclina (Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003). Porém, seu uso contínuo como rotina ou prolongado em riscos ocupacionais não é indicado. A terapêutica com antibiótico parece reduzir o avanço dos sintomas (a exemplo de duração da hipertermia, tempo de normalização da função renal e tempo de hospitalização) e a ocorrência de seqüelas, podendo prevenir a ocorrência de infecção sintomática e a evolução para as manifestações mais graves da doença, por isso seu uso é recomendado (McClain et al., 1984; Takafuji et al., 1984; Watt et al., 1988; Sehgal et al., 2000), embora ainda seja um assunto controverso (Guidugli et al., 2000; Katz et al., 2001; Griffith et al., 2006).

O medicamento de escolha para o tratamento da leptospirose grave é a penicilina G cristalina (Faine et al., 1999; Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005). Porém, como ainda permanece controverso se o seu uso traz benefício na redução da letalidade da doença (Guidugli et al., 2000), o tratamento atual concentra-se na quimioterapia sintomática e de suporte (Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005). A realização do balanço hídrico rigoroso para ingestão e perdas é de extrema importância para se indicar a instalação de diálise peritoneal precoce aos primeiros sinais de oligúria, o que reduz o dano

renal e as taxas de letalidade da doença (Aoki et al., 2001), especialmente em indivíduos que apresentam a SHPL (Andrade et al., 2007).

2- JUSTIFICATIVA

Na cidade de Salvador, a leptospirose é a causa de epidemias cíclicas associadas à pobreza, durante o período de chuvas acompanhadas por alagamento de zonas urbanas com baixas condições sanitárias (Caldas et al., 1979; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Barcellos & Sabroza, 2001; Costa et al., 2001). Isto ocorre anualmente, de forma sazonal (meses de março a agosto) afetando principalmente as populações residentes em favelas. A morbi-mortalidade associada às formas clínicas graves é o principal determinante do impacto em saúde pública causado pelas epidemias emergentes. Nos países em desenvolvimento, os custos com o tratamento da leptospirose grave representam uma sobrecarga para o setor público, a exemplo do Brasil cujo gasto anual per capita destinado à saúde é menor que 40 reais (Flannery et al., 2001).

“Salvador apresentou a partir de 1970 um processo de crescimento sempre dinâmico, contínuo e progressivo resultando em uma cidade que se apresenta como "capital" do nordeste brasileiro e tem a imagem forte do turismo e modernos negócios. Este crescimento físico não necessariamente foi acompanhado de desenvolvimento. A cidade dos precariamente incluídos, a cidade dos pobres possui uma extensão e peso considerável na estrutura urbana de Salvador que se apresenta com padrão precário de ocupação, edificações nas encostas, ausência de saneamento básico e infra-estrutura de um modo geral” (Gordilho, 2000). Este cenário reforçou as condições para a leptospirose se perpetuar como um grande problema de saúde pública em Salvador, especialmente nas comunidades consideradas carentes.

Em um estudo realizado na cidade de Salvador, no período de março a novembro de 1996, foram identificados 326 casos de leptospirose grave, destes, 80% eram indivíduos do sexo masculino com média de idade igual a 35,9+/- 15,2. A incidência calculada, para este período, foi de 12,5 casos por 100.000 indivíduos e a letalidade foi de 15% (50 casos) sendo que 50% dos óbitos ocorreram nas primeiras quarenta e oito horas de internação e a *Leptospira interrogans sorovar copenhageni* foi isolada de 87% dos casos, identificando o rato doméstico como o principal reservatório para as leptospirosas em nossa cidade (Ko et al., 1999).

No período entre 2003 e 2005, foram identificados 474 pacientes com leptospirose grave. Destes, 47 (10%) apresentaram SHPL. Esta síndrome, em 2005, foi a causa de 55% das mortes entre os pacientes com leptospirose. A idade mediana dos casos foi de, aproximadamente, 38 anos e 70% dos casos eram do sexo masculino. A taxa de letalidade foi 74% apesar de tratamento de suporte intensivo. Todos os casos com SHPL eram de residentes em favelas e ocorreram durante o mesmo período de chuvas (Gouveia et al., 2008). Padrões de risco demográficos e geográficos similares foram observados durante os 12 anos de vigilância (1996-2008) e permanecem sendo identificados na atualidade, sugerindo que os mesmos riscos de exposição a cada ano são responsáveis pela natureza cíclica dos surtos de leptospirose grave.

Um estudo tipo caso-controle pareado foi conduzido em Salvador durante a epidemia de 2000, objetivando identificar fatores de risco para aquisição de leptospirose. Este estudo demonstrou que residência nas proximidades de um esgoto a céu aberto (OR pareado, 5,15; 95% IC, 1,80-14,74), ver ratos no peridomicílio (4,49; 1,57-12,83), ver grupos de cinco ou mais ratos (3,90; 1,35-11,27) e exposição a ambiente contaminado no trabalho (3,71; 1,35-10,17) foram fatores de risco independentes para leptospirose. Residência nas proximidades (a

menos de cinco metros) de um esgoto aberto foi o fator de risco independente mais forte. (Sarkar et al., 2002).

Durante o surto de 2001, foi realizado um estudo domiciliar de infecção prévia por *Leptospira* com contactantes domiciliares em 22 domicílios contendo casos de leptospirose grave e de contactantes em 52 domicílios de controles da vizinhança, pareados por idade e sexo. Dentre 74 contactantes de casos-índice, 22 (30%) tinham evidência sorológica para infecção prévia por *Leptospira*. Em contraste, 16 (8%) dos 195 contactantes dos controles-índice tinham evidência para infecção prévia. Concluiu-se que, contactantes dos casos-índice tinham, aproximadamente, 5,3 vezes (95% CI, 2,13-13,12) maior risco de ter uma infecção prévia do que contactantes dos controles-índice (Maciel et al 2008). Este estudo confirmou fatores de risco para infecção prévia como os mesmos encontrados no estudo caso-controle para doença grave acima citado. Também foram associados ao risco de adquirir infecção alagamento da rua, contato com lama e água de esgoto.

Investigações tipo caso-controle em ambientes rurais e urbanos ressaltam a relevância de exposições ambientais na aquisição de infecção por *Leptospira* (Bovet et al., 1999; Silva et al., 2004; Vado-Solís et al., 2002) e estudos ecológicos sugerem que regiões com esgotos abertos e propensas a inundações são ambientes que podem servir como fontes de contaminação (Barcellos & Sabroza, 2000; Barcellos & Sabroza, 2001).

Nas áreas urbanas, as populações com baixas condições sócio-econômicas estão mais vulneráveis à aquisição da doença. Elas habitam locais suscetíveis a inundações, carentes de infra-estrutura e saneamento básico, com alta proliferação de roedores (Douglin et al., 1997; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Ganoza et al., 2006). Estes fatores, diante das

fortes chuvas (sazonalidade) e drenagem ineficiente da água, levam às inundações. Isto exemplifica a questão da segregação urbana, descrita por Manuel Castells (Castells, 2006): “A distribuição das residências no espaço produz sua diferenciação social e específica na paisagem urbana, pois as características das moradias e de sua população estão na base do tipo e do nível das instalações e das funções que se ligam a elas”.

Desta forma, no presente estudo, seguimos o seguinte raciocínio para elaboração de hipóteses e objetivos:

As práticas atuais de tratamento não têm obtido êxito na redução da letalidade das formas graves de doença. O amplo espectro de apresentação clínica e não específica da leptospirose inicial dificulta o diagnóstico precoce da doença. **A falta de opções de tratamento efetivas requer que intervenções para leptospirose grave focalizem em prevenção,** de forma a otimizar recursos humanos e materiais, mantendo uma boa relação custo-benefício.

As medidas preventivas atuais contra leptospirose são focalizadas especialmente no controle do reservatório animal (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*). Neste cenário, as medidas utilizadas são a anti-ratização, que objetiva mudar as características ambientais que favorecem a penetração, a instalação e a livre proliferação de roedores, por meio da eliminação dos fatores que propiciam o acesso desses animais a alimento, água e abrigo, e a desratização ou eliminação direta dos roedores através de métodos mecânicos e químicos. **Porém, a alta densidade de ratos no ambiente urbano torna as medidas de controle químico e ecológico**

caras e não sustentáveis nos países em desenvolvimento, especialmente porque os ratos domésticos têm se tornado cada vez mais resistentes aos raticidas comerciais.

Outro fator importante é que a carga da doença parece estar subestimada. A doença em sua forma grave parece representar uma pequena fração das infecções clínicas, a grande maioria das infecções resulta em formas auto-limitadas (Farr et al., 1995; Faine et al., 1999). Sabe-se de estudos prévios em Salvador que as formas leves da doença são comumente diagnosticadas como dengue ou outras causas de doença febril aguda, dificultando o início precoce da antibioticoterapia preconizada (Ko et al., 1999). Dados provenientes do grupo de estudo em Salvador, ainda não publicados, indicam que 8% dos pacientes que procuram as emergências em Salvador com doença febril aguda têm confirmação para leptospirose (Barbosa, 1999, não publicado) e inquérito realizado na cidade de Salvador indica que 12% da população têm evidência de infecção prévia (Dias et al., 2007).

Em relação aos estudos de corte transversal e de caso-controle realizados em Salvador, entende-se que estes estão sujeitos a limitações, tais como viés de mensuração, viés de seleção, viés de memória, o fato de que estamos medindo exposição e desfecho simultaneamente, tudo isto torna difícil estabelecermos relação causal entre exposição e desfecho. **São necessários, portanto, dados prospectivos para confirmar estes achados. Poucos estudos prospectivos foram realizados para compreender a carga da doença, porém todos realizados com grupos específicos, geralmente amostras pequenas** (Everard et al., 1989; Everard et al., 1990; Dastis-Bendala et al., 1996; Vijayachari et al., 2004; Segura et al., 2005; Thai et al., 2008). **Nenhum destes estudos procurou identificar fatores de risco para infecção por *Leptospira*. Estas informações podem auxiliar no desenvolvimento de medidas de saúde pública, focalizadas em grupos de risco para infecção, voltadas para a prevenção da**

leptospirose ao nível de comunidade, otimizando, desta forma, recursos e ações. Portanto, estudos longitudinais para compreender a dinâmica de infecção por *Leptospira* são uma necessidade, especialmente porque a previsão é de que em 30 anos a população mundial residente em favelas irá dobrar para cerca de dois bilhões de habitantes (UN-HABITAT, 2003) e, desta forma, o impacto da leptospirose como problema de saúde pública poderá ser muito maior.

Esta tese foi elaborada de acordo com as regras do curso de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, sendo escolhida a forma de dois manuscritos. No primeiro manuscrito foi apresentado um estudo de corte transvesal denominado Impacto do Gradiente Ambiental e Social na Infecção por *Leptospira* em Favelas Urbanas referente ao primeiro objetivos desta tese. No segundo manuscrito, referente ao segundo objetivo desta tese, foi apresentado um estudo longitudinal denominado História Natural e Transmissão da Leptospirose Urbana: Uma Coorte Prospectiva de Três Anos com Residentes em Favelas no Brasil.

3- OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar a história natural e transmissão da leptospirose em uma comunidade carente na cidade de Salvador e identificar fatores de risco para o desenvolvimento de infecção.

Objetivos Específicos

- 1- Determinar a soroprevalência de infecção prévia por *Leptospira* e identificar fatores de risco sociais e ambientais para infecção prévia por *Leptospira*;
- 2- Avaliar a dinâmica nas taxas de infecção para três anos de seguimento da coorte e identificar possíveis fatores de risco para infecção.

4- MANUSCRITO 1 - REFERENTE AO OBJETIVO 1 DESTA TESE

Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums.

(Impacto do Gradiente Ambiental e Social na Infecção por *Leptospira* em Favelas Urbanas).

Publicado no PLoS Neglected Tropical Diseases, em 23 de Abril de 2008.

Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums

Renato B. Reis^{1,9}, Guilherme S. Ribeiro^{1,9}, Ridalva D. M. Felzemburgh¹, Francisco S. Santana^{1,2}, Sharif Mohr¹, Astrid X. T. O. Melendez¹, Adriano Queiroz¹, Andréia C. Santos¹, Romy R. Ravines³, Wagner S. Tassinari^{3,4}, Marília S. Carvalho³, Mitermayer G. Reis¹, Albert I. Ko^{1,5*}

1 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil, **2** Secretária Estadual de Saúde da Bahia, Salvador, Brazil, **3** Escola Nacional da Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, United States of America

Abstract

Background: Leptospirosis has become an urban health problem as slum settlements have expanded worldwide. Efforts to identify interventions for urban leptospirosis have been hampered by the lack of population-based information on *Leptospira* transmission determinants. The aim of the study was to estimate the prevalence of *Leptospira* infection and identify risk factors for infection in the urban slum setting.

Methods and Findings: We performed a community-based survey of 3,171 slum residents from Salvador, Brazil. *Leptospira* agglutinating antibodies were measured as a marker for prior infection. Poisson regression models evaluated the association between the presence of *Leptospira* antibodies and environmental attributes obtained from Geographical Information System surveys and indicators of socioeconomic status and exposures for individuals. Overall prevalence of *Leptospira* antibodies was 15.4% (95% confidence interval [CI], 14.0–16.8). Households of subjects with *Leptospira* antibodies clustered in squatter areas at the bottom of valleys. The risk of acquiring *Leptospira* antibodies was associated with household environmental factors such as residence in flood-risk regions with open sewers (prevalence ratio [PR] 1.42, 95% CI 1.14–1.75) and proximity to accumulated refuse (1.43, 1.04–1.88), sighting rats (1.32, 1.10–1.58), and the presence of chickens (1.26, 1.05–1.51). Furthermore, low income and black race (1.25, 1.03–1.50) were independent risk factors. An increase of US\$1 per day in per capita household income was associated with an 11% (95% CI 5%–18%) decrease in infection risk.

Conclusions: Deficiencies in the sanitation infrastructure where slum inhabitants reside were found to be environmental sources of *Leptospira* transmission. Even after controlling for environmental factors, differences in socioeconomic status contributed to the risk of *Leptospira* infection, indicating that effective prevention of leptospirosis may need to address the social factors that produce unequal health outcomes among slum residents, in addition to improving sanitation.

Citation: Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, et al. (2008) Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. PLoS Negl Trop Dis 2(4): e228. doi:10.1371/journal.pntd.0000228

Editor: Ricardo E. Gurtler, Universidad de Buenos Aires, Argentina


Received: January 22, 2008; **Accepted:** March 27, 2008; **Published:** April 23, 2008

Copyright: © 2008 Reis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the US National Institutes of Health (grants NIAID R01 AI052473, FIC D43 TW00919), Brazilian National Research Council (grants 300861/1996, 473082/2004, 420067/2005, 305723/2006, 150176/2007), and Oswaldo Cruz Foundation (grant 0250.250.102). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: aik2001@med.cornell.edu

 These authors contributed equally to this work.

Introduction

At present, one billion of the world's population resides in slum settlements [1]. This number is expected to double in the next 25 years [1]. The growth of large urban populations which are marginalized from basic services has created a new set of global health challenges [2,3]. As part of the Millennium Development Goals [4], a major priority has been to address the underlying poor sanitation and environmental degradation in slum communities which in turn, are the cause of a spectrum of neglected diseases which affect these populations [2,3,5].

Leptospirosis is a paradigm for an urban health problem that has emerged due to recent growth of slums [6,7]. The disease,

caused by the *Leptospira* spirochete, produces life-threatening manifestations, such as Weil's disease and severe pulmonary hemorrhage syndrome for which fatality is more than 10% and 50%, respectively [7–9]. Leptospirosis is transmitted during direct contact with animal reservoirs or water and soil contaminated with their urine [8,9]. Changes in the urban environment due to expanding slum communities has produced conditions for rodent-borne transmission [6,10]. Urban epidemics of leptospirosis now occur in cities throughout the developing world during seasonal heavy rainfall and flooding [6,11–18]. There is scarce data on the burden of specific diseases that affect slum populations [2], however leptospirosis appears to have become a major infectious disease problem in this population. In Brazil alone, more than

Author Summary

Leptospirosis, a life-threatening zoonotic disease, has become an important urban slum health problem. Epidemics of leptospirosis now occur in cities throughout the developing world, as the growth of slum settlements has produced conditions for rat-borne transmission of this disease. In this prevalence survey of more than 3,000 residents from a *favela* slum community in Brazil, Geographical Information System (GIS) and modeling approaches identified specific deficiencies in the sanitation infrastructure of slum environments—open sewers, refuse, and inadequate floodwater drainage—that serve as sources for *Leptospira* transmission. In addition to the environmental attributes of the slum environment, low socioeconomic status was found to independently contribute to the risk of infection. These findings indicate that effective prevention of leptospirosis will need to address the social factors that produce unequal health outcomes among slum residents, in addition to improving sanitation.

10,000 cases of severe leptospirosis are reported each year due to outbreaks in urban centers [19], whereas roughly 3,000, 8,000 and 1,500 cases are reported annually for meningococcal disease, visceral leishmaniasis and dengue hemorrhagic fever, respectively, which are other infectious disease associated with urban poverty [20–22]. Case fatality (10%) from leptospirosis [19] is comparable to that observed for meningococcal disease, visceral leishmaniasis and dengue hemorrhagic fever (20%, 8% and 10%, respectively) in this setting [20,23,24]. Furthermore, leptospirosis is associated with extreme weather events, as exemplified by the El Niño-associated outbreak in Guayaquil in 1998 [25]. Leptospirosis is therefore expected to become an increasingly important slum health problem as predicted global climate change [26,27] and growth of the world's slum population [1] evolves.

Urban leptospirosis is a disease of poor environments since it disproportionately affects communities that lack adequate sewage systems and refuse collection services [6,10,11]. In this setting,

outbreaks are often due to transmission of a single serovar, *L. interrogans* serovar Copenhageni, which is associated with the *Rattus norvegicus* reservoir [6,28–30]. Elucidation of the specific determinants of poverty which have led to the emergence of urban leptospirosis is essential in guiding community-based interventions which, to date, have been uniformly unsuccessful. Herein, we report the findings of a large seroprevalence survey performed in a Brazilian slum community (*favela*). Geographical Information System (GIS) methods were used to identify sources for *Leptospira* transmission in the slum environment. Furthermore, we evaluated whether relative differences in socioeconomic status among slum residents contributed to the risk of *Leptospira* infection, in addition to the attributes of the environment in which they reside.

Methods

Study site and population

The study was conducted in the Pau da Lima community (Figure 1A) which is situated in the periphery of Salvador, a city of 2,443,107 inhabitants [31] in Northeast Brazil. Pau da Lima is a region of hills and valleys, which was a sparsely inhabited area of Atlantic rain forest in the 1970s and subsequently transformed into a densely-populated slum settlement (Figure 1B) due to immigration of squatters. In total, 67% of the population of Salvador and 37% of the urban population in Brazil reside in slum communities with equal or greater levels of poverty as that found in Pau da Lima [32,33].

A study site was established which comprised of four valleys in an area of 0.46 km² (Figure 1A). Active hospital-based surveillance found that the mean annual incidence of severe leptospirosis was 57.8 cases per 100,000 population at the study site between 1996 and 2001 (unpublished data). The study team conducted a census during visits to 3,689 households within the site in 2003 and identified 14,122 inhabitants. Households were assigned sequential numbers. A computer-based random number generator was used to select a list of 1,079 sample households from a database of all enumerated households. Eligible subjects who resided in sample households and had five or more years of age were invited to be a



Figure 1. Slum community site in the city of Salvador, Brazil. (A) The yellow line in the aerial photograph is the boundary of the study site in the Pau da Lima community. The map in the bottom left corner shows the location of Salvador in Brazil and the study site (red) within the city. (B) Photograph of the typical environment at the community study site, which shows a valley in which households is situated and the proximity of households to open sewers and refuse. (C) Close-up view of the orthomosaic used to georeference households (red and black dots) and environmental attributes, such as open sewers (blue line) and refuse deposits, for the region marked as a yellow box in Panel A. The red arrow represents the direction from which the photograph in Panel B was taken.

doi:10.1371/journal.pntd.0000228.g001

study participant. Subjects were enrolled into the study between April 2003 and May 2004 according to written informed consent approved by the Institutional Review Boards of the Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian National Commission for Ethics in Research, and Weill Medical College of Cornell University.

Household survey

The study team of community health workers, nurses and physicians conducted interviews during house visits and administered a standardized questionnaire to obtain information on demographic and socioeconomic indicators, employment and occupation, and exposures to sources of environmental contamination and potential reservoirs in the household and workplace. Responses reported by subjects were used to obtain information on race. The study team evaluated literacy according to the ability to read standardized sentences and interpret their meaning. Informal work was defined as work-related activities for which the subject did not have legal working documents. The head-of-household, defined as the member who earned the highest monthly income, was interviewed to determine sources and amounts of income for the household. Subjects were asked to report the highest number of rats sighted within the household property and the site of work-related activities. The study team surveyed the area within the household property to determine the presence of dogs, cats and chickens.

Geographical Information System (GIS) survey

An ArcView version 8.3 software system (Environmental Systems Research Institute) database was constructed with georeferenced aerial photographs and topographic maps provided by the Company for Urban Development of the State of Bahia (CONDER). Photographs of the study site, which had a scale of 1:2,000 and spatial resolution of 16cm, were taken in 2002. During the census, the study team identified households within the study site and marked their positions onto hard copy 1:1,500 scale maps (Figure 1C), which were then entered into the ArcView database. A survey was conducted during the seasonal period of heavy rainfall between April and August 2003 to geocode the location of open sewage and rainwater drainage systems. During three time points within this period, the study team mapped the sites of open accumulated refuse and measured the area of these deposits. Mean values for areas of refuse deposits were calculated and used for the analyses.

Serological analysis

Sera were processed from blood samples collected from subjects during house visits. The microscopic agglutination test (MAT) was performed to evaluate for serologic evidence of a prior *Leptospira* infection [34]. A panel of five reference strains (WHO Collaborative Laboratory for Leptospirosis, Royal Tropical Institute, Holland) and two clinical isolates [6] were used which included *L. interrogans* serovars Autumnalis, Canicola and Copenhageni, *L. borgspetersenii* serovar Ballum, and *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa. The use of this panel had the same performance in identifying MAT-confirmed cases of leptospirosis during surveillance in Salvador [6,16] as did the WHO recommended battery of 19 reference serovars [34]. Screening was performed with serum dilutions of 1:25, 1:50 and 1:100. When agglutination was observed at a dilution of 1:100, the sample was titrated to determine the highest titer.

Statistical methods

Information for subjects was double entered into an EpiInfo version 3.3.2 software system (Centers for Diseases Control and

Prevention) database. Chi-square and Wilcoxon rank sum tests were used to compare categorical and continuous data, respectively, for eligible subjects who were and were not enrolled in the study. A P value ≤ 0.05 in two sided testing was used as the criterion for a significant difference. Preliminary analyses evaluated a range of MAT titers as criteria for prior *Leptospira* infection and found that the use of different cut-off values (1:25–1:100) identified similar associations with respect to the spatial distribution of seropositive subjects and risk factors for acquiring *Leptospira* antibodies. A titer greater or equal to 1:25 was therefore used to define the presence of *Leptospira* antibodies in the final analyses. The presumptive infecting serovar was defined as the serovar against which the highest agglutination titre was directed [34]. Crude prevalence rates were reported since age and gender-adjusted values did not differ significantly from crude values. Ninety-five percent confidence intervals (CI) were adjusted for the cluster sampling of households.

Kernel density estimation analysis was performed with a range of bandwidths (10–120 meters) to evaluate smoothed spatial distributions of subjects with *Leptospira* antibodies and all subjects. The R version 2.4.1 statistical package (R Foundation for Statistical Computing) was used to obtain estimates which were adjusted for boundary effects. The ratio of the Kernel density estimators for subjects with *Leptospira* antibodies and all subjects was measured to determine the smoothed population-adjusted risk distribution. A digital terrain model of topographic data was used (ArcGIS 3D Analyst Extension software) to obtain continuous estimates of altitude for the study area. The distances, calculated in three-dimensional space, of households to nearest open drainage systems and refuse deposits were evaluated as proxies of exposure to these sources of environmental attributes. Elevation of households with respect to the lowest point in the valley in which they were situated was used as a surrogate for flood risk. Generalized additive models (GAM) [35] were used to evaluate the functional form of the association between continuous variables and the risk of acquiring *Leptospira* antibodies. When indicated, continuous variables were categorized in multivariate analyses according to the x-intercept value observed in the plots of fitted smoothed values.

We used Poisson regression [36] to estimate the effect of demographic, socioeconomic, household and workplace-related factors on the prevalence of *Leptospira* antibodies. A Bayesian inference approach was used which incorporated two random effects in order to account for overdispersion and cluster sampling within households. This approach has been used to estimate parameters in complex models [37] and is less sensitive to sparse data [38]. Standard non-informative prior distributions were used in models which were fitted with WinBUGS version 1.4.2 (MRC Biostatistics Unit). In multivariate analysis, all variables which had a P value below 0.10 in univariate analyses were included in the initial model. In order to address co-linearity among variables, we identified sets of covariates with the high Spearman correlation coefficients (>0.3 or <-0.3). Highly correlated variables were aggregated in a single variable when indicated, and evaluated in the model. The final model was obtained which used backward variable selection with an inclusion rule of P value <0.05 .

Results

Among 3,797 eligible residents from the slum community site, 3,171 (84%) were enrolled in the study. Study subjects had a higher proportion of females (56% of 3,171 subjects versus 37% of 626 subjects, respectively; $P<0.05$) and younger mean age (25.8 ± 15.2 versus 28.1 ± 14.6 years, respectively; $P<0.05$) than eligible residents who did not participate in the study. The kernel

distribution of enrolled subjects according to place of residence was similar on visual inspection to that of residents who did not participate (data not shown). The majority (85%) of subjects were squatters who did not have legal title to their domiciles. Subjects belonged to mostly mixed (*pardo*, 66%) or black (28%) racial groups. Median household per capita income for study subjects was US\$ 1.30 per day. Among the subjects, 76% had not completed elementary school education and 23% were illiterate. Among 2,077 subjects ≥ 18 years of age, 77% did not have formal employment and 35% engaged in informal work.

Among the 3,171 subjects, 489 had *Leptospira* agglutinating antibodies, as determined by the presence of MAT titer $\geq 1:25$ (Figure 2). Highest titers were directed against *L. interrogans* serovar Copenhageni in 436 (89.2%) of the 489 subjects with *Leptospira* antibodies. For the 22 subjects (4.5%) who had highest titers against two or more serovars, agglutination reactions recognized Copenhageni as one of the serovars. Copenhageni was the predominant serovar (88–100%) recognized for the range of highest reciprocal titers (Figure 2).

The overall prevalence of *Leptospira* antibodies was 15.4% (95% CI 14.0–16.8). The crude prevalence among enrolled subjects was not significantly different from the prevalence (15.9%, 95% CI 14.6–17.1) which was adjusted for the age and gender distribution of eligible subjects in the study population. Prevalence was highest among adolescents and adults (16.2% and 21.2% for age groups 15–24 and >44 years, respectively). However, 8.3% (95% CI 6.2–10.5) of children 5–14 years of age had evidence for a prior exposure to *Leptospira*. The prevalence was higher in males than females (17.8 versus 13.6%, respectively; PR 1.32, 95% CI 1.10–1.57) (Table 1). Similar associations with age and gender were observed when MAT titers of $\geq 1:50$ and $\geq 1:100$ were used to define subjects with *Leptospira* antibodies.

Panels A and B in Figure 3 show smoothed spatial distributions of subjects with *Leptospira* antibodies and all subjects, respectively, according to place of residence. The population-adjusted distribution (Figure 3C) showed that risk of acquiring *Leptospira* antibodies clustered in areas occupied by squatters at the bottom of valleys (Figure 3D). Similar spatial distributions were observed in analyses that used higher titer values to define subjects with *Leptospira* antibodies (Figure S1).

Univariate analysis found the risk of acquiring *Leptospira* antibodies to be associated with increasing age, male gender, indicators of low socioeconomic level, occupations that entail contact with contaminated environments, informal work, time of residence in the study household, and environmental attributes and the presence of reservoirs in the household (Table 1). Significant risk associations were not found for formal employment and reported sighting of rats in the workplace environment. Open rainwater drainage structures and refuse deposits were distributed throughout the site; yet open sewers were more frequently encountered at the bottom of valleys (Figure 3). The distance of household to the nearest open sewer was a risk factor, whereas a significant association was not observed for distance to an open rainwater drainage system.

GAM analysis showed that the risk of acquiring *Leptospira* antibodies had an inverse linear association with the distance of the subject's household to an open sewer and elevation of the household from the lowest point in the valley, a proxy for flood risk (Figure 4). Increased risk was observed among subjects who resided less than a threshold distance of 20 meters to these attributes (Figure 4B and C). The risk of acquiring *Leptospira* antibodies had an inverse non-linear association with distance of the subject's household to an open refuse deposit (results not shown). We explored a range of dichotomization criteria and

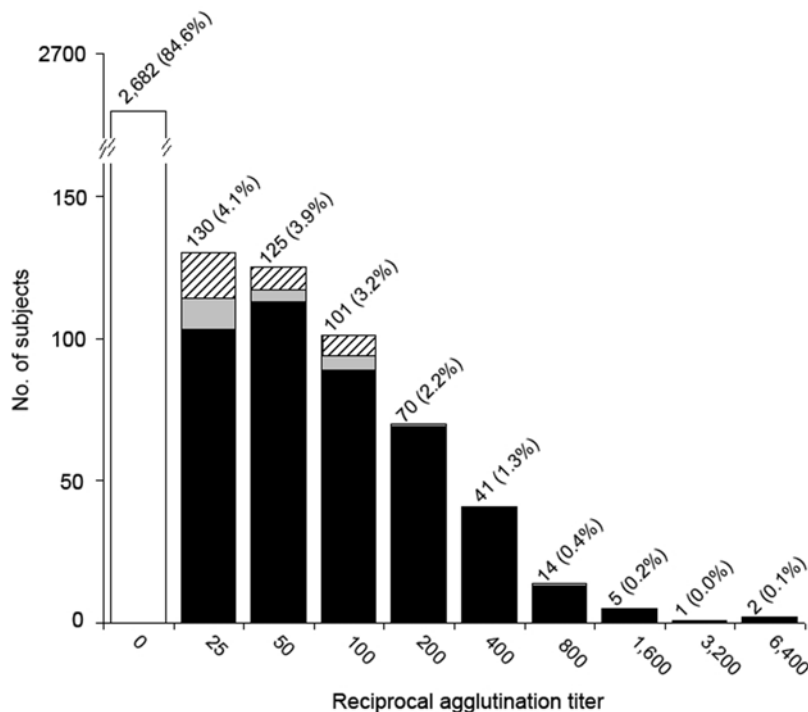


Figure 2. Distribution of reciprocal microscopic agglutination test titers for 3,171 subjects from the slum community site. Labels above the bars indicate the number of subjects (% of total), according to their highest reciprocal titer. The open bar represents seronegative subjects. Subjects with highest reciprocal titres against *L. interrogans* serovar Copenhageni, multiple serovars and serovars other than Copenhageni are shown as black bars, grey bars and crosshatched bars, respectively. doi:10.1371/journal.pntd.0000228.g002

Table 1. Risk factors for *Leptospira* antibodies among subjects at the slum community site.

Variables	<i>Leptospira</i> antibodies		PR (95% CI)	
	Yes (n = 489)	No (n = 2,682)	Univariate ^a	Multivariate ^b
	No. (%) or median (IQR) ^c			
Demographic				
Age, years				
05–14	71 (15)	781 (29)	1.00	1.00
15–24	136 (28)	704 (26)	1.98 (1.47–2.61)	2.02 (1.50–2.69)
25–34	122 (25)	524 (20)	2.31 (1.71–3.07)	2.54 (1.86–3.41)
35–44	73 (15)	350 (13)	2.11 (1.50–2.88)	2.24 (1.59–3.08)
≥45	87 (18)	323 (12)	2.60 (1.88–3.51)	2.92 (2.10–4.00)
Male gender	247 (51)	1140 (43)	1.32 (1.10–1.57)	1.38 (1.14–1.64)
Socioeconomic indicators				
Black race ^d	169 (35)	724 (27)	1.35 (1.11–1.62)	1.25 (1.03–1.50)
Household per capita income, US\$/day	1.14 (0.39–1.88)	1.30 (0.61–2.20)	0.91 (0.85–0.97) ^e	0.89 (0.82–0.95) ^e
Did not complete primary school	394 (81)	2018 (75)	1.32 (1.04–1.65)	-
Household factors				
Time of residence in household, years	8 (3–17)	7 (3–12)	1.02 (1.01–1.03) ^e	-
Level above lowest point in valley, meters	18.78 (8.59–31.05)	24.71 (13.00–36.04)	0.99 (0.98–0.99) ^e	-
Distance from an open sewer, meters	14.95 (7.34–31.00)	21.04 (8.99–38.11)	0.99 (0.99–1.00) ^e	-
Distance of household from an open sewer/lowest point in valley				
≥20 m/≥20 m	158 (32)	1198 (45)	1.00	1.00
≥20 m/<20 m	38 (8)	211 (8)	1.32 (0.89–1.83)	1.19 (0.81–1.67)
<20 m/≥20 m	73 (15)	360 (13)	1.46 (1.09–1.91)	1.30 (0.97–1.71)
<20 m/<20 m	220 (45)	913 (34)	1.68 (1.36–2.05)	1.42 (1.14–1.75)
Distance from an open refuse deposit, meters	60.59 (38.48–107.54)	64.90 (42.56–103.16)	1.00 (1.00–1.00) ^e	-
<20 meters from open refuse deposit	51 (10)	174 (6)	1.53 (1.12–2.02)	1.43 (1.04–1.88)
Vegetation ^f	373 (76)	1,822 (68)	1.45 (1.17–1.79)	-
Reservoirs present in household				
Sighting of >2 rats	256 (52)	1039 (39)	1.60 (1.33–1.91)	1.32 (1.10–1.58)
Dog	231 (47)	1028 (38)	1.36 (1.14–1.62)	-
Chicken	227 (46)	988 (37)	1.40 (1.17–1.66)	1.26 (1.05–1.51)
Cat	106 (22)	406 (15)	1.44 (1.15–1.77)	-
Work-related exposures				
Informal work	157 (32)	637 (24)	1.42 (1.17–1.71)	-
Contact with contaminated environment ^g	83 (17)	284 (11)	1.57 (1.22–1.96)	-
Risk occupation ^h	49 (10)	127 (5)	1.90 (1.37–2.51)	-

^aUnivariate prevalence ratios (PR) and 95% confidence intervals (CI) are shown for variables which were significant ($P < 0.05$) in the univariate analyses.

^bMultivariate PR and 95% CI are shown for covariates which were included in the final best fit Poisson regression model.

^cNumbers and percentages are shown for categorical variables. Median and interquartile range (IQR) are shown for continuous variables of per capita household income, time of residence in study household, level above lowest point in valley and distance from an open sewer and refuse deposit.

^dData is missing for two non-infected subjects.

^ePR and 95% CI are shown for continuous data.

^fData is missing for one infected and two non-infected subjects.

^gReported exposure to mud, refuse, flooding water or sewage water in the workplace.

^hOccupation as construction worker, refuse collector or mechanic, which is associated with a workplace environment characterized by high rat infestation.

doi:10.1371/journal.pntd.0000228.t001

found significant risk associations when subjects resided less than 20 meters from an open refuse deposit (Table 1). This association was not influenced by the size of the refuse deposit. Subjects who reported sighting two or more rats in the household environment had increased risk of acquiring *Leptospira* antibodies (Figure 4D). Household per capita income had an inverse linear association with the presence of *Leptospira* antibodies (Figure 4A). Of note, the distance of the household to an open sewer was highly correlated

(Spearman correlation coefficient = 0.71) with household elevation (Figure S2A) since open sewers drain into the bottom of valleys. An aggregate variable, distance of household located less than 20 meters from an open sewer and lowest point in a valley, was therefore used to examine the association between open sewer and flood-related exposure and infection risk (Table 1). In contrast household per capita income was not highly correlated (Spearman correlation coefficient = 0.16) with the elevation of the household (Figure S2B).

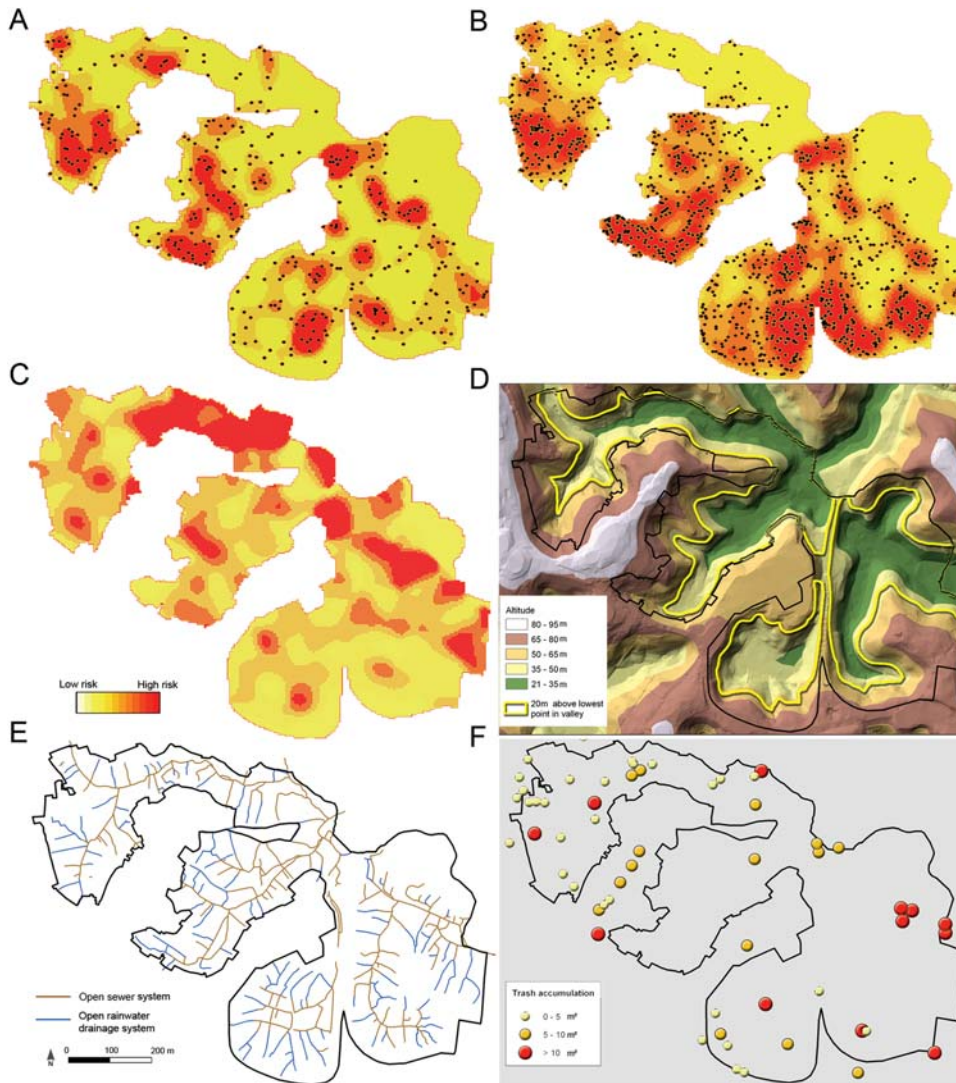


Figure 3. Spatial distribution of subjects with *Leptospira* antibodies and all enrolled subjects, according to place of residence, and environmental attributes of the community site. Panels A and B show the smoothed Kernel density distribution of subjects with *Leptospira* antibodies (N=489) and all (N=3,171) subjects, respectively, according to place of residence. The yellow-to-red gradient represents increasing density in smoothing analyses which used 40 meters as the bandwidth. Black circles show the location of subject households. Panel C shows the distribution of the population-adjusted Kernel density estimator for subjects with *Leptospira* antibodies which was calculated as the ratio of the estimators for subjects with *Leptospira* antibodies and all subjects. Panel D shows a topographic map generated by the digital terrain model. The yellow line is the level that is 20 meters above the lowest point in the four valleys within the community site. Panels E and F show the distribution of, respectively, open rainwater and sewage drainage systems and accumulated refuse according to size (m²). doi:10.1371/journal.pntd.0000228.g003

Multivariate analyses found that the risk for acquiring *Leptospira* antibodies was associated with exposures in the household environment and not in the workplace setting (Table 1). Subjects who resided less than 20 meters from an open sewer and the lowest point in the valley had a 1.42 times (95% CI 1.14–1.75) increased risk for acquiring *Leptospira* antibodies than those who lived 20 meters or more from these attributes. Residence less than 20 meters from accumulated refuse was associated with a 1.43 times (95% CI 1.04–1.88) increased risk. Sighting of two or more rats and presence of chickens, a marker for rat infestation, in the household were significant reservoir-associated risk factors. After controlling for age, gender and significant environmental exposures, indicators of low socioeconomic level, household per capita income (PR 0.89 for an increase of US\$1.00 per day, 95% CI 0.82–0.95) and black race (PR 1.25, 95% CI 1.03–1.50) were risk factors for acquiring *Leptospira* antibodies (Table 1).

Discussion

Efforts to identify interventions for urban leptospirosis have been hampered by the lack of population-based information on transmission determinants. In this large community-based survey of a slum settlement in Brazil, we found that 15% of the residents had serologic evidence for a prior *Leptospira* infection. The prevalence rate of *Leptospira* antibodies in the study slum community was similar to that (12%) found in a city-wide survey performed in Salvador [39]. Risk factors for acquiring *Leptospira* antibodies were associated with exposures in the household environment. Interventions therefore need to target the environmental sources of transmission - open sewers, flooding, open refuse deposits and animal reservoirs - in the places where slum inhabitants reside. After controlling for the influence of poor environment, indicators of low socioeconomic status were found to be independently associated with the risk of

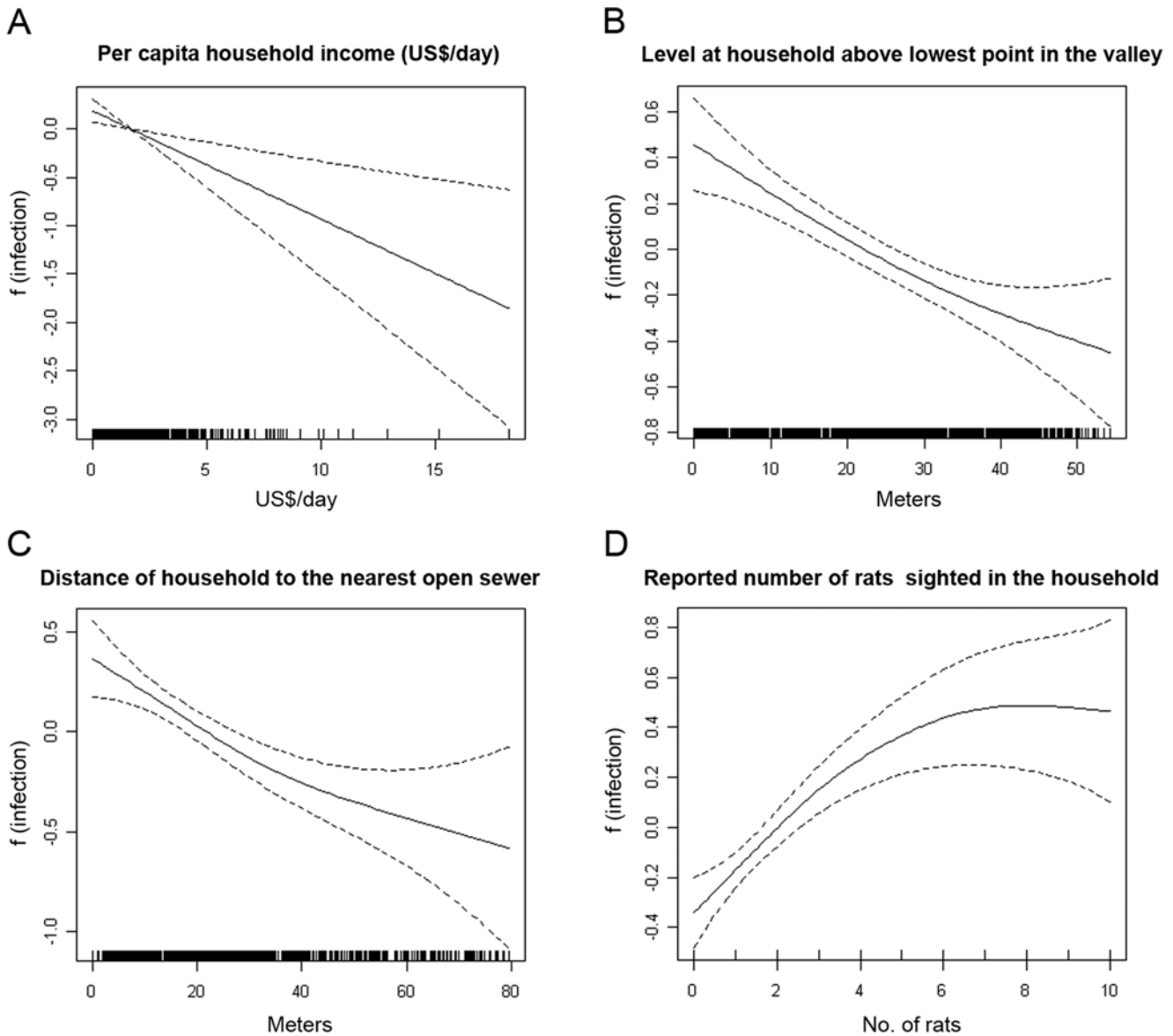


Figure 4. Generalized additive models (GAM) of the association between the risk of acquiring *Leptospira* antibodies and continuous variables of (A) per capita daily household income, (B) level of household in meters above the lowest point in valley, and (C) distance in meters to the nearest open sewer, and (D) reported number of rats sighted in the household environment. The coefficient, $f(\text{infection})$, in the GAM model is a measure for the risk of acquiring *Leptospira* antibodies. In Panels A, B, C and D, the x axis intercept values, where $f(\text{infection})$ equals zero, were US\$1.70/day, 22 meters, 22 meters and 2 rats, respectively.
doi:10.1371/journal.pntd.0000228.g004

acquiring *Leptospira* antibodies. This finding suggests that in slum communities with overall high levels of absolute poverty, relative differences in socioeconomic level contribute to unequal outcomes for leptospirosis.

Leptospirosis has been traditionally considered an occupational disease, since work-related activities are frequently identified as risk exposures [9]. However slum inhabitants reside in close proximity to animal reservoirs and environmental surface waters which contain *Leptospira* [10]. We previously found that *Leptospira* infection clusters within households in slum communities in Salvador [40]. In this study, we found that after controlling for confounding, significant risk exposures were those associated with the household environment rather than workplace. As a caveat, interview-elicited responses were used to evaluate work-related exposures since GIS surveys were not performed at the sites where

subjects worked. It is possible that slum residents may have had work-related risk exposures which were not detected by our survey. Nevertheless, our findings support the conclusion that the slum household is an important site for *Leptospira* transmission and provides the rationale for interventions that target risk exposures in this environment.

The study's findings indicate that the domestic rat was the principal reservoir for *Leptospira* transmission in the study community. Highest agglutination titers among 89% of the subjects were directed against *L. interrogans* serovar Copenhageni, the serovar associated with the *R. norvegicus* reservoir. Reported sighting of rats is considered to be an unreliable marker of rat infestation. However we found that the number of rats sighted by residents was correlated with their risk of acquiring *Leptospira* antibodies (Figure 4D), indicating that rat sightings may be a useful

marker of infection risk in slum communities where inhabitants are accustomed to the presence of rats. Although dogs were not found to be a risk factor, detailed investigations of *Leptospira* carriage in urban reservoirs need to be performed. Of note, the presence of chickens in households was a risk factor, although they in of themselves are not reservoirs. This association may reflect a rat-related exposure not accounted for by reported sightings, since rats are attracted to chicken feed and waste. Raising chickens is a widespread practice in slum communities—48% (519) of the 1079 study households raised chickens. Control of rodent reservoir populations may therefore need to incorporate measures that directly address this practice.

Our findings confirm hypotheses raised by previous ecologic studies [6,10,11] that infrastructure deficiencies related to open sewers, flooding and open refuse deposits are transmission sources for leptospirosis in the slum environment. Furthermore, there appears to be defined areas of risk associated with open sewers and refuse deposits, which serve as habitats and sources of food for rats. Home range radius of the domestic rat varies from 30–150 meters [41,42], but home range use decreases from the centre to the edge. GAM analysis demonstrated that slum residents had a positive risk for acquiring *Leptospira* antibodies when households were situated within 20 meters from open sewers and refuse deposits. In addition, infection risk increased as distances from an open sewer or refuse deposit decreased, suggesting that households which are situated closer to these foci have a higher degree of environmental contamination with *Leptospira* and inhabitants of these households are exposed to higher inoculum doses during infection. Molecular approaches to quantify *Leptospira* in environmental samples [10] will be useful in answering this question and guiding recommendations for environmental decontamination and barrier control measures which can be implemented in slum communities.

In addition, GAM analysis found that residents had positive risk for *Leptospira* infection when their households were situated within 20 meters from the lowest point in the valley (Figure 4B). In Salvador [6,12,16,40] and other urban centers [11,13,15,17,18], outbreaks of leptospirosis occur during heavy rainfall and flooding events. Slum communities are built on the poor land quality and often in areas susceptible to frequent flooding. At the study site and other slum settlements in Salvador, the water table rises up to one meter during flooding events because of inadequate rainwater drainage and blockage of drainage systems with silt and refuse. The finding that subjects had increased infection risk when their households were located within 20 meters from the lowest point in the valley suggests that this distance was a proxy for the degree of contact which residents encounter flood-related exposures in the peri-domiciliary environment.

We found that in addition to attributes of the environment where slum inhabitants reside, low per capita household income and black race, an indicator of health inequality in Brazil [43,44], were independent risk factors for *Leptospira* infection. The social gradient in health is a widespread phenomenon [45,46]. Our findings, although not unexpected, are noteworthy since they suggest that differences in status contribute to unequal health outcomes in a slum community where the household per capita income was less than US\$1 per day for 44% of the inhabitants. Although errors in the measurement of risk exposures and residual confounding were a possibility, the strength of the association indicates a role for social determinants in *Leptospira* transmission. These factors may relate to risky behaviors, such as cleaning open sewers after flooding events, or limited use of protective clothing which reduce the risk of abrasions that facilitate entry of the *Leptospira* spirochete [47]. Low status and lack of access to amenities and social support are features of disadvantaged

communities [45] which conceivably influence risk behaviors for leptospirosis. Further research is needed to evaluate the role of social factors such that effective interventions, including health education, can be implemented at the community level.

A limitation of our study was the cross-sectional design which used serologic evidence for a prior *Leptospira* infection as the outcome. The MAT is the standard assay used in prevalence surveys [9], yet there is not an established titer criterion for defining seropositive reactions. We previously found that a MAT titer of $\geq 1:25$ was a specific marker for prior *Leptospira* infection among slum residents from Salvador and when applied, identified household clustering of infection risk [40]. In this study, cutoff titers from 1:25 and above identified similar risk associations. In Salvador, leptospirosis is due to transmission of a single agent, *L. interrogans* serovar Copenhageni [6,28]. Titers of 1:25, as well as higher titers, were directed against this serovar (Figure 1), indicating that this cutoff was a specific and more sensitive criteria for identifying prior infections in a region where a single serovar agent is circulating. In the study, there were more men and younger subjects among non-participating subjects than participating subjects. Crude prevalence was not different from the prevalence of *Leptospira* antibodies which was adjusted by the age and gender distribution of the overall study population, indicating that differences between participating and non-participating subjects may not have introduced a significant bias in the estimates. Infections may have occurred up to five years prior to the survey since agglutinating antibodies may persist for this period [48,49]. Major interventions to improve basic sanitation were not implemented in the study community, yet the possibility that environmental exposures were modified over time can not be excluded. Migration may have affected our ability to estimate prevalence and risk associations. An on-going cohort investigation of subjects enrolled in this study found that the annual out-migration rate is approximately 12% (unpublished data). The study's findings therefore need to be confirmed in prospective studies.

We found that *Leptospira* transmission was due to the interaction of factors associated with climate, geography and urban poverty. Since the study was performed in a single community in Salvador, Brazil, our findings may not be generalizable to other slum settings. However, a large proportion of the world's slum population resides in tropical climates similar to that in Salvador. Moreover, similar conditions of poverty and environmental degradation encountered at the study site (Figure 1B) are found in many slum settlements. In Brazil, 37% of the urban population resides in slums with equal or greater levels of poverty as found in the study community [33]. Our findings may therefore be relevant to other slum communities where leptospirosis is endemic and have increasing significance as global climate change [26,27] and growth of the world's slum population occur in the future [1,33].

The infrastructure deficiencies which were found to be transmission factors for *Leptospira* in this study can be readily addressed by improving sanitation in slum communities. Investment in sanitation is a cost-effective health intervention [50,51]. In Salvador, a city-wide sanitation program (*Bahia Azul*) was recently shown to have a major beneficial impact for diarrheal disease [52]. However, as frequently encountered with large-scale sanitation projects, the *Bahia Azul* program did not provide coverage to the study community and many of the slum settlements in the city's periphery. Equitable access to improved sanitation is therefore essential in reducing the burden of the large number of environmentally-transmitted infectious diseases, including leptospirosis, which affects slum populations. Furthermore, the finding that the social gradient within slum communities, in addition to the unhealthy environment, contributes to the risk of *Leptospira* infection suggests that prevention of urban leptospirosis will need

to combine approaches for improving sanitation with approaches that identify and address the social determinants which produce unequal health outcomes.

Supporting Information

Figure S1 Smoothed Kernel density distribution of subjects with microscopic agglutination test titres of $\geq 1:25$ (A), $\geq 1:50$ (B) and $\geq 1:100$ (C), according to place of residence at the study site. The yellow-to-red gradient represents increasing density in smoothing analyses which used 40 meters as the bandwidth.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000228.s001 (2.61 MB TIF)

Figure S2 Spot plots of the relationship between elevation of household level from the lowest point in valley and distance of the household to the nearest open sewer (A) and household per capita daily income (B). Closed and open dots represent houses with at least one seropositive subject and without a seropositive subject, respectively.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000228.s002 (1.02 MB TIF)

Alternative Language Abstract S1 Abstract translated into Portuguese by Dr. Guilherme Ribeiro.

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000228.s003 (0.03 MB DOC)

References

1. United Nations Human Settlements Programme (2003) The challenge of slums: Global report on human settlements 2003. London: Earthscan Publications Ltd. 310 p.
2. Riley LW, Ko AI, Unger A, Reis MG (2007) Slum health: Diseases of neglected populations. *BMC Int Health Hum Rights* 7: 2.
3. Sclar ED, Garau P, Carolini G (2005) The 21st century health challenge of slums and cities. *Lancet* 365: 901–903.
4. The General Assembly of United Nations (2000) United Nations Millennium Declaration. Available: <http://www.un.org/millennium/>. Accessed 11 Mar 2008.
5. Bartram J, Lewis K, Lenton R, Wright A (2005) Focusing on improved water and sanitation for health. *Lancet* 365: 810–812.
6. Ko AI, Reis MG, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Salvador Leptospirosis Study Group*. *Lancet* 354: 820–825.
7. McBride AJ, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386.
8. Bharti AR, Nally JE, Riccardi JN, Matthias MA, Diaz MM, et al. (2003) Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
9. Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
10. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, et al. (2006) Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 3: e308. doi:10.1371/journal.pmed.0030308.
11. Barcellos C, Sabroza PC (2000) Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: A geographical approach. *Int J Environ Health Res* 10: 301–313.
12. Caldas EM, Sampaio MB (1979) Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brazil: A case-control seroepidemiologic study. *Int J Zoonoses* 6: 85–96.
13. Karande S, Kulkarni H, Kulkarni M, De A, Varaiya A (2002) Leptospirosis in children in Mumbai slums. *Indian J Pediatr* 69: 855–858.
14. LaRocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, et al. (2005) Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 11: 766–769.
15. Romero EC, Bernardo CC, Yasuda PH (2003) Human leptospirosis: A twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 245–248.
16. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, et al. (2002) Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 66: 605–610.
17. Tassinari W de S, Pellegrini D da C, Sabroza PC, Carvalho MS (2004) [Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996–1999]. *Cad Saude Publica* 20: 1721–1729.
18. Kupek E, de Sousa Santos Favarsani MC, de Souza Philippi JM (2000) The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991–1996. *Braz J Infect Dis* 4: 131–134.
19. Health Surveillance Secretary, Brazilian Ministry of Health (2007) [Leptospirosis case notification records, Brazil].
20. Health Surveillance Secretary, Brazilian Ministry of Health (2008) [Dengue epidemiological report, January–December 2007]. Available: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf. Accessed 11 Mar 2008.
21. Health Surveillance Secretary, Brazilian Ministry of Health (2007) [Confirmed cases of meningococcal disease, Brazil, major regions and federal units, 1990–2006]. Available: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_meningites_brasil.pdf. Accessed 11 Mar 2008.
22. Health Surveillance Secretary, Brazilian Ministry of Health (2007) [Visceral leishmaniasis case notification records, Brazil].
23. Health Surveillance Secretary, Brazilian Ministry of Health (2007) [Meningococcal disease deaths, Brazil, major regions and federal units, 1990–2006]. Available: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_obitos_dm_brasil.pdf. Accessed 11 Mar 2008.
24. Health Surveillance Secretary, Brazilian Ministry of Health (2007) [Visceral leishmaniasis case fatality rate, Brazil, major regions and federal units, 2000–2006]. Available: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_lv_letalidade.pdf. Accessed 11 Mar 2008.
25. Ministerio de Salud Pública, Organización Panamericana de la Salud (1998) El fenómeno El Niño en Ecuador. In: Organización Panamericana de la Salud, editor. *El Niño, 1997–1998*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. pp 175–230.
26. Epstein PR (1999) Climate and health. *Science* 285: 347–348.
27. Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA (2005) Impact of regional climate change on human health. *Nature* 438: 310–317.
28. Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG, et al. (2001) Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol* 39: 191–195.
29. Pereira MM, Matsuo MG, Bauab AR, Vasconcelos SA, Moraes ZM, et al. (2000) A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J Clin Microbiol* 38: 450–452.
30. Romero EC, Yasuda PH (2006) Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: A public health tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 373–378.
31. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002) Censo demográfico 2000 - resultados do universo. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
32. Secretaria de Combate à Pobreza e às Desigualdades Sociais/SECOMP (2005) *Mapamento da pobreza em áreas urbanas do estado da Bahia*. CD-ROM 2005.
33. UN-HABITAT (2003) *Slums of the world: The face of urban poverty in the new millennium?* Nairobi: UN-HABITAT. 94 p.
34. World Health Organization (2003) *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta: World Health Organization. 122 p.
35. Hin LY, Lau TK, Rogers MS, Chang AM (1999) Dichotomization of continuous measurements using generalized additive modelling—application in predicting intrapartum caesarean delivery. *Stat Med* 18: 1101–1110.

Acknowledgments

We would like to thank team members from the Urban Health Council of Pau da Lima and Oswaldo Cruz Foundation, Rosan Barbosa, Reinaldo Barreto, Jorge Costa, Maria Raimunda da Cruz, Ana Carla Duarte, Leila Gouveia, Analéa Lima, Simone Nascimento, Osmar Paixão, Amaro Silva and Érika Sousa who participated in the data collection for the study. We would also like to thank the Company for Urban Development of the State of Bahia (CONDER) for providing digital maps of the study site, Elves Maciel and Alicia Chang for their assistance in designing the study; Claudio Pereira da Sá (*in memoriam*) and Edilane Gouveia for assistance with the statistical analysis; Earl Francis Cook Jr. for critical advice during data analysis and manuscript preparation; and Lee Riley, Art Reingold and Maurício Barreto for reviewing the final manuscript. Finally, this work could not be accomplished without the joint collaborative effort of the resident associations that comprise the Urban Health Council of Pau da Lima and community leaders and residents.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RBR RF FS SM AM RRR MR AK. Performed the experiments: RBR RF FS SM AM AQ AS MR AK. Analyzed the data: RBR GR RF RRR WT MC AK. Contributed reagents/materials/analysis tools: AK. Wrote the paper: RBR GR RF RRR MC AK. Reviewed and revised the final version of the manuscript: RBR GR RF FS AM AQ AS RRR WT MC MR.

36. Barros AJ, Hirakata VN (2003) Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: An empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol* 3: 21.
37. Ashby D (2006) Bayesian statistics in medicine: A 25 year review. *Stat Med* 25: 3589–3631.
38. Greenland S, Schwartzbaum JA, Finkle WD (2000) Problems due to small samples and sparse data in conditional logistic regression analysis. *Am J Epidemiol* 151: 531–539.
39. Dias JP, Teixeira MG, Costa MC, Mendes CM, Guimaraes P, et al. (2007) Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 499–504.
40. Maciel EAP, Carvalho ALF, Nascimento SF, Matos RB, Gouveia EL, et al. (2008) Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e154. doi:10.1371/journal.pntd.0000154.
41. Jackson WB (1982) Norway rat and allies. In: Chapman JA, Feldhamer GA, eds. *Wild mammals of North America*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. pp 1077–1088.
42. Nowak RM (1991) *Walker's mammals of the world*. Baltimore: The John Hopkins University Press.
43. Barros FC, Victora CG, Horta BL (2001) Ethnicity and infant health in Southern Brazil. A birth cohort study. *Int J Epidemiol* 30: 1001–1008.
44. Travassos C, Williams DR (2004) The concept and measurement of race and their relationship to public health: A review focused on Brazil and the United States. *Cad Saude Publica* 20: 660–678.
45. Marmot M (2001) Inequalities in health. *N Engl J Med* 345: 134–136.
46. Marmot M (2005) Social determinants of health inequalities. *Lancet* 365: 1099–1104.
47. Phraisuwan P, Whitney EA, Tharmaphornpilas P, Guharat S, Thongkamsamut S, et al. (2002) Leptospirosis: Skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg Infect Dis* 8: 1455–1459.
48. Cumberland P, Everard CO, Wheeler JG, Levett PN (2001) Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989. *Eur J Epidemiol* 17: 601–608.
49. Lupidi R, Cinco M, Balanzin D, Delprete E, Varaldo PE (1991) Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 29: 805–809.
50. Hutton G, Haller L, Bartram J (2007) Global cost-benefit analysis of water supply and sanitation interventions. *J Water Health* 5: 481–502.
51. Laxminarayan R, Chow J, Salles S, Maslen P (2006) Intervention cost-effectiveness: Overview of general messages. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M et al., eds. *Disease control priorities in developing countries*. New York: Oxford University Press. pp 35–86.
52. Barreto ML, Genser B, Strina A, Teixeira MG, Assis AM, et al. (2007) Effect of city-wide sanitation programme on reduction in rate of childhood diarrhoea in northeast Brazil: Assessment by two cohort studies. *Lancet* 370: 1622–1628.

5- MANUSCRITO 2 - REFERENTE AO OBJETIVO 2 DESTA TESE

Natural History and Transmission of Urban Leptospirosis: A Three-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil.

(História Natural e Transmissão da Leptospirose Urbana: Uma Coorte Prospectiva de Três Anos com Residentes em Favelas no Brasil).

A ser submetido.

NATURAL HISTORY AND TRANSMISSION OF URBAN LEPTOSPIROSIS: A THREE-YEAR PROSPECTIVE COHORT STUDY OF SLUM RESIDENTS IN BRAZIL

Running Title: A Three-Year Community-Based Cohort for *Leptospira* Infection in an Urban Slum

Ridalva DM Felzemburgh¹, Guilherme S Ribeiro¹, Renato B Reis¹, Astrid XTO Melendez¹, Francisco S Santana^{1,2}, Sharif Mohr¹, Federico Costa¹, Deborah Fraga¹, Balbino L dos Santos¹, Adriano Q Silva¹, Andréia C Santos¹, Romy R Ravines³, Wagner S Tassinari^{3,4}, Marília S Carvalho³, Mitermayer G Reis¹, and Albert I Ko^{1,5}

1 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil, **2** Secretária Estadual de Saúde da Bahia, Salvador, Brazil, **3** Escola Nacional da Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA

Correspondence to: Dr. Albert Icksang Ko, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, Bahia, Brasil; Tel.: (55 71) 3176-2200 x302; Fax: (55 71) 3176-2200 x350; e-mail: aik2001@med.cornell.edu

ABSTRACT

Background: Leptospirosis has become a significant health problem for slum communities worldwide. In Salvador (pop. 2.9 million), a city in Northeast Brazil, this zoonotic disease causes annual epidemics of severe leptospirosis which primarily affect urban slum populations within the city. However cases with severe clinical manifestations, such as Weil's disease and pulmonary hemorrhage syndrome, likely account for a fraction of the overall disease burden attributable to leptospirosis. Few community-based prospective studies were performed to determine the disease burden, identify risk factors for infection and provide information to guide effective interventions.

Methods: We performed a prospective longitudinal study of 2,003 randomly-selected residents of a slum community in the city of Salvador. A cohort was recruited during a community-wide census in 2003 and followed for a three-year period. Household interviews and Geographical Information System surveys were performed annually to evaluate risk behaviors and geocodify environmental transmission sources, respectively. Serum samples, obtained during annual serosurveys, were evaluated with the microagglutination test. Serologic evidence for a *Leptospira* infection was defined as the presence of seroconversion or a four-fold increase in agglutinating titer. Generalized Estimation Equations Model was used to account for the time dependence of repeated measure data in risk factor analysis.

Results: We identified 121 infected individuals (140 infections in total) among a closed cohort of 1,300 individuals (65% of 2,003) which completed three-years of follow-up. The infection rate was 35.9 per 1,000 person-years (95% CI 30.3-42.2). The risk of re-infection was high during follow-up of subjects after they were found to have acquired an initial infection: the secondary and tertiary infection rates were 126.8 and 250.0 per 1,000 person-years, respectively, whereas the primary infection rate was 32.2 per 1,000 person-years. Independent factors for *Leptospira* infection were increasing age, male gender (RR, 1.77;

95% CI, 1.22-2.56), black race (1.63; 1.12-2.38); and low per capita daily household income (0.76 per each US\$; 0.62-0.93). Furthermore inhabitants residing in proximity (<20m) to open sewers and flood regions had an 89% (RR, 1.89; 95% CI 1.23-2.90) increased risk for acquiring infection.

Conclusions: Findings from this prospective investigation suggest that annual epidemics of urban leptospirosis impart a much larger burden at community level than is indicated by surveillance data. At the cohort site, 3.6% of the urban slum residents were infected each year with *Leptospira* based on serologic evidence. Within slum communities characterized by absolute poverty, there are high-risk groups which are susceptible to being repeatedly infected with *Leptospira*. Furthermore, our findings indicate that defined infrastructure deficiencies, such as open sewerage and inadequate rainfall drainage, serve as transmission sources. Prevention of urban leptospirosis will therefore require providing adequate sanitation systems to slum communities and targeting the social and behavioral factors that contribute to inequitable outcomes in these populations.

Keywords: leptospirosis, transmission, urban slums, risk factors

INTRODUCTION

Leptospirosis emerged as a major urban health problem in the developing world due to the rapid and disorganized expansion of urban centers, which created ecological conditions for rat-borne transmission [McBride, 2005]. The infection is caused by a spirochete from the genus *Leptospira* and produces clinical manifestations that range from asymptomatic or mild febrile illness to severe disease [Levett, 2001; Bharti, 2003]. Fatality for severe forms, such as Weil disease and leptospirosis pulmonary hemorrhage syndrome, is higher than 10% and 50%, respectively [McBride, 2005]. Infections in the urban setting are largely due to a single serovar, *L. interrogans* serovar Copenhageni, which is acquired during contact with soil or water contaminated with urine of the *Rattus norvegicus* reservoir [Ko, 1999; Pereira, 2000; Barrochi, 2001; Romero, 2006].

Leptospirosis urban epidemics are associated with heavy rainfall events and predominantly affect slum inhabitants [Ko, 1999; McBride, 2005]. Previous cross-sectional and case-control studies of leptospirosis have identified occurrence of severe cases and infections in association with defined sanitation deficiencies in slums, such as household location proxy to open sewers and accumulated refuse, in flood-risk areas, and infested by rats [Sarkar, 2002; Maciel, 2008; Reis, 2008]. We have also shown that lower socioeconomic status among slum residents contributes to the risk of having previously acquired antibodies against *Leptospira* independent of sanitation deficiencies at household environment [Reis, 2008].

However, cross-sectional and case-control studies are subjected to design limitations, such as exposure measurement bias, selection bias and recall bias, which difficult establishment of causal association. In addition, the temporal relation between the occurrence of risk exposures and the measured outcome is not always obvious because presence of antibodies

against *Leptospira* may be detected up to four or more years after the infection [Lupidi, 1991; Cumberland, 2001]. The use of prevalent antibodies as the outcome measurement may underestimate the true infection risk since *Leptospira* infections may occur repeatedly in individuals living in endemic areas where leptospirosis transmission is high. Furthermore, factors that influence first-time *Leptospira* infection may differ from those of subsequent infections.

Therefore, longitudinal studies to determine the dynamics of *Leptospira* transmission in slums are largely warranted as in the next 30 years the current one billion of people living in slums will double [United Nations Human Settlements Programme, 2003)]. Herein, we report findings from a three-year community-based prospective investigation of risk factors for *Leptospira* infection among slum dwellers.

MATERIALS AND METHODS

Study site and population

The cohort study was conducted in the Pau da Lima slum, a community situated in the periphery of Salvador (population, 2,892,625 inhabitants) [IBGE, 2007], Brazil. The study site has been previously described [Reis, 2008]. Briefly, it comprised a four-valley area of 0.46 Km². In 2003, the study team performed a census in the study site and identified 14,122 inhabitants residing in 3,689 households. The majority (85%) of inhabitants were squatters who did not have legal title to their domiciles. Median household per capita income was US\$ 1.30 per day. Within the site, the mean annual incidence of severe leptospirosis between 1996 and 2002 were 57.8 cases per 100,000 population (unpublished data) and a seroprevalence study conducted in 2003 found that 15.4% of the subjects had antibodies against *Leptospira*. [Reis, 2008]

A sample of 684 (18%) households from a database of all enumerated households within the study site was selected using a computer-based random number generator. All subjects who slept three or more nights per week in the sampled households and had five or more years of age were eligible for enrolment in the cohort study. Subjects were enrolled between February 2003 and May 2004, according to written informed consent procedures approved by the Institutional Review Boards of the Oswaldo Cruz Foundation and Brazilian National Commission for Ethics in Research, Brazilian Ministry of Health, and Weill Medical College of Cornell University.

Epidemiological data collection

During cohort enrollment and again once a year during the epidemic season, the study team of community health workers, nurses and physicians administered at households visits a standardized questionnaire to obtain information on demographic and socioeconomic indicators, employment and occupation, exposures to sources of environmental contamination and presence of potential reservoirs in the household and workplace. Information on race was self-reported and interpreted as a marker of socioeconomic status. The study team evaluated literacy according to the ability to read standardized sentences and interpret their meaning. Informal work was defined as work-related activities for which the subject did not have legal working documents. Exposure to contaminated environment was defined as frequent contact with mud, floodwater, garbage or sewage. Subjects were asked to report the highest number of rats sighted within the household property and workplace site in the preceding one-month period. The head-of-household, defined as the member who earned the highest monthly income, was interviewed to determine sources and amounts of income for the household. The study team surveyed the area within <10 meters of the household to determine the presence of dogs, cats, chickens and vegetation.

Once a year during the epidemic season, the study team surveyed the study site to record the location of open sewage and rainwater drainage systems. We also mapped the sites of accumulated refuse and measured the area of these deposits. Mean values for areas of refuse deposits were calculated and used for the analyses. Geographic Information Systems (GIS) was used to obtain tridimensional and one-dimensional distance from the household to the nearest drainage systems and accumulated refuse, and to the lowest point in the valley, respectively.

Serologic evaluation

The study team collected blood samples from participants during household visits for cohort enrollment and once a year during the non-epidemic season for the three-year of follow-up. Microagglutination test (MAT) was performed on sera to determine level of antibodies against *Leptospira*. A panel of five reference strains (WHO Collaborative Laboratory for Leptospirosis, Royal Tropical Institute, Holland) and two clinical isolates (3) were used which included *L. interrogans* serovars Autumnalis, Canicola and Copenhageni, *L. borgspetersenii* serovar Ballum, and *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa. Screening was performed with serum dilutions of 1:25, 1:50 and 1:100. When agglutination was observed at a dilution of 1:100, the sample was titrated to determine highest agglutination titer. A positive control serum with a known titer and a negative control were always included in the panel.

Study outcomes

The outcome of interest was the serological detection of *Leptospira* infection among the cohort subjects. Serologic evidence for a *Leptospira* infection was defined as the presence of seroconversion or a four-fold increase in agglutinating titer between paired samples. Infection was then categorized in primary, secondary or tertiary infection, defined as the number and

order of infections an individual had during the three-year of follow-up (one/first, two/second or three/third, respectively).

Data management and statistical analysis

Epidemiological and laboratory data were double-entered and validated using the Epi-Info for Windows software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Data for individual subjects were linked by location of residence to spatially coded information for households and environmental attributes within the study site. We used Chi-square Mantel-Haenszel 2-tailed p and Wilcoxon Two-Sample Test to compare categorical and continuous data, respectively, between subjects who were and were not selected to participate in the cohort, between subjects who consented and did not consent to be enrolled in the cohort and between cohort subjects who completed and who did not complete the three-year of follow-up. A p -value of 0.05 or less in two sided testing was used as criteria for a statistically significant difference.

We calculated incidence rates and 95% confidence intervals *Leptospira* infection. Only subjects who completed all the three-year of follow up were included in the analysis. Rates were expressed as the number of infections per 1,000 person-years of follow-up.

Generalized Additive Models [Reis, 2008] were used to evaluate the functional form of the association between continuous variables and the risk of acquiring *Leptospira* antibodies. When indicated, continuous variables were categorized in multivariate analyses according to the x-intercept value observed in the plots of fitted smoothed values. Generalized Estimation Equations (GEE) Model was used to account for the time dependence of repeated measure data in risk factor analysis. Interpretation of results was based on the Risk Ratio and 95%

confidence intervals. Confounding and interaction between independent study variables were evaluated by subgroup analyses prior to performing the GEE model.

Variables that presented significant association at a $P \leq 0.10$ in the univariate GEE model were selected to be incorporated into the GEE multivariate model. The variables were grouped into four blocks; the first block contained socioeconomic variables, such as race, and per capita daily household income. The second block contained household variables, such as household distances to the lowest point in valley and to nearest open sewer and distance from the domicile to the garbage deposit. The third block included the reservoirs: seeing two or more rats and presence of chicken in the domicile. The fourth block comprised of the individual-level variables: sex and age.

A backward elimination strategy was then performed for each block. Variables that reached a $p\text{-value} \leq 0.10$ in each of the four blocks were then selected and grouped into a final block. GEE backward elimination was pursued on the final block of variables and those reaching a $p\text{-value} \leq 0.05$ were considered associated with *Leptospira* infection.

RESULTS

Participants' characteristics

Of the 14,122 inhabitants within the study site, 12,651 (90%) were eligible to participate in the cohort and 2,419 (19%) were household-based randomly selected to be enrolled. Subjects who were selected to compose the cohort were similar to subjects who were not selected in regards to median age (23 versus 24 years, respectively; $P: 0.38$) and proportion of males (47% versus 48%, respectively; $P: 0.18$). Among the 2,419 selected subjects, 2,003 (83%)

consented to join the cohort. Those who agreed to be a cohort member were younger than those who refused to participate (median age in years, 23 vs. 25, respectively, P: 0.02) and were less likely to be male (44% versus 61%, respectively; P: <0.001).

Of the 2,003 enrolled participants, 1,300 (65%) completed the three-year of follow-up evaluation being 13.4% the mean annual lost-to-follow-up. The major reason for loss to follow-up was moving to a household outside the study site (67% of the loss-to-follow-up subjects). Subjects who completed follow up differed from subjects who did not in that they had a lower proportion of males (42% versus 48%, respectively; P: 0.002) but were not different with respect to age, socioeconomic level and exposure to environmental risks identified in the baseline survey.

Overall *Leptospira* infection rate

Overall, 121 individuals among the 1,300 participants who completed the three-year of follow-up presented serological evidence for acquisition of *Leptospira* infection giving a total of 140 infections during the three-year of follow-up: 53 infections in the first year; 44 infections in the second year, 43 in the third year. The serovars Copenhageni, Autumnalis, Grippotyphosa, were the presumptive serovars associated with the infections for 132 (94.3%), 4 (2.9%), 2 (1.4%), 1 (0.7%) Ballum and 1 (0.7%) Mixed (Autumnalis and Grippotyphosa) of the 140 infections, respectively.

The overall *Leptospira* infection rate was 35.9 infections per 1,000 person-years (95% CI: 25.8 - 46.0) (Table 1). Infection rates were higher among the age groups 15 to 24 years old (41.2 infections per 1,000 person-years; 95% CI: 30.4-52.0) and 25 to 34 years old (60.9 infections per 1,000 person-years; 95% CI: 47.9-73.9). Males had 1.48 (95% CI: 1.08- 2.03) times greater risk of infection than females (135.9 infections per 1,000 person-years (95% CI:

117.3-154.5) versus 87.8 infections per 1,000 person-years (95% CI: 72.4-103.2), respectively). This difference between the rates for males compared to females can be particularly observed in the age group 5-14 years old in which males had 3.77 (95% CI: 1.27-11.16) times greater risk of infection than females [81.5 infections per 1,000 person-years (95% CI: 66.6-96.4) versus 20.4 infections per 1,000 person-years (95% CI: 12.7-28.1), respectively]. Incidences adjusted for age and sex of the eligible population did not significantly differ from the crude infection rates (data not shown).

Primary secondary and tertiary infection rates

Among the 140 identified infections (121 individuals), 121 were primary infections (103 individuals), 18 were secondary infections (17 individuals) and 1 was a tertiary infection (1 individual). The incidence rate for primary *Leptospira* infection was 32.2 (95% CI: 22.6 - 41.8). The risk of repeated *Leptospira* infection was high during the follow-up of the cohort subjects after they were found to have acquired an initial infection: the secondary infection rate was 126.8 per 1,000 person-years and the tertiary infection rate was 250.0 per 1,000 person-years (Tables 1 and 2).

The highest rate for primary infection was in the age group 25-34 (48.7 per 1,000 person-years). Analyzing together the secondary and tertiary infection rates as a multiple infection rate, we found that the highest rate occurred in the age group 25-34 (333.3 per 1,000 person-years).

Although *Leptospira* secondary and tertiary infections, analyzed together as multiple infections, occurred in similar rates between males and females (RR: 1.02; 95% CI: 0.42-2.46), *Leptospira* primary infections were significantly more common among males (RR:

1.52; 95% CI: 1.07-2.16). This gender distinction was most considerable in the age group 5-14 years of age, for which males presented a *Leptospira* primary infection rate more than six times greater than females (RR: 6.12; 95% CI: 1.75-21.43).

Univariate risk factors for *Leptospira* infection

As expected due to the highest rates observed for the age group 25-34, the univariate GEE Model identified as risk factor for *Leptospira* infection the age groups: 15-24 (RR: 2.72, 95% CI: 1.48 - 5.00); 25-34 had the highest risk (RR: 3.55, 95% CI:1.88 - 6.71); 35-44 (RR: 2.16, 95% CI: 1.04 - 4.46) and >44 (RR: 2.38, 95% CI: 1.20 - 4.70), compared to age group 5-14 and male gender (RR: 1.57, 95% CI: 1.08- 2.29) (Table 3). Socioeconomic factors associated with *Leptospira* infection were: black race (RR: 1.86, 95% CI: 1.28 - 2.71) and per capita household income. For each one-dollar increase in the daily per capita household income, the risk of *Leptospira* infection decreased by 20% (95% CI: 4%-34%). Environment attributes, such as to reside less than 20m from the sewer and less than 20m from the lowest point in valley. (RR: 2.15, 95% CI: 1.41 - 3.29) and distance from the garbage deposit (RR: 1.00, 95% CI: 1.00 - 1.01). In relation to reservoirs, seeing two or more rats (RR: 1.73, 95% CI: 1.19 - 2.51) and presence of chicken in the domicile (RR: 1.57, 95% CI: 1.08 - 2.28) were both factors associated to *Leptospira* infection. (Table 3). Significant risk associations were not found for occupations that entail contact with contaminated environments, informal or formal work, and reported sighting of rats and presence of animal reservoirs in the workplace.

Multivariate risk factors for *Leptospira* infection

The multivariate GEE Model identified as independent risk factors for *Leptospira* infection: age groups: 15-24 (RR: 3.26, 95% CI: 1.77 - 6.02); 25-34 (RR: 4.55, 95% CI:2.40 - 8.60); 35-44 (RR: 2.71, 95% CI: 1.33 - 5.55) and >44 (RR: 3.48, 95% CI: 1.72 - 7.02), compared to

age group 5-14 and .male gender (RR: 1.77, 95% CI: 1.22 - 2.56) (Table 4). Black race (RR: 1.63, 95% CI: 1.12 - 2.38) and per capita household income were socioeconomic independent risk factors for *Leptospira* infection. For each one dollar increase in the daily per capita household income, the risk of secondary *Leptospira* infection decreased by 24% (95% CI: 7% - 38%). The only environment attribute identified as an independent factor associated with infection was to reside less than 20m from the sewer and less than 20m from the lowest point in valley (Table 4)..

DISCUSSION

We presented findings from the largest prospective community-based study to determine rates and risks for *Leptospira* infection acquisition in an urban slum where severe leptospirosis is endemic. We found that *Leptospira* infection is a frequent event among slum dwellers. Irrespective of whether the *Leptospira* infection was primary, secondary or tertiary, *L. interrogans* serovar Copenhageni was the presumptive infecting serovar in >95% of cases. The overall incidence of *Leptospira* infection among the slum cohort was 35.9 infections per 1,000 person-years. This rate is more than 62 times greater than the mean annual incidence for severe leptospirosis within the study site between 1996 and 2002, which was 57.8 cases per 100,000 population (unpublished data), indicating that the ratio between cases of *Leptospira* infection and severe leptospirosis in this slum community may be greater than 62 to 1. A prior study in Belem, an urban slum in Iquitos, Peru, estimated the incidence rate of *Leptospira* seroconversion as 288 per 1,000 people per year (Johnson EID 2004). The higher incidence in Belem may be due to the use of different serological method to detect infection or to the circulation of *Leptospira* serovars or strains of greater virulence. Alternatively, it

may reflect true differences in frequency of *Leptospira* infection occurrence among slums that present distinct geographical, climate, socio-economical and cultural characteristics.

Based on the estimation that 65% of the 2.892.625 inhabitants of Salvador, Brazil live in the same environment and poverty conditions as the residents of Pau da Lima community [SECOMP, 2005], we can estimate that more than 67,000 *Leptospira* infections occur each year in Salvador. Although, the fraction of infections that progress to develop an acute febrile illness is not well known, the leptospirosis burden in Salvador may be much higher than the 100 cases of severe leptospirosis annually identified (Ko, 1999; Gouveia, 2008).

The Infection rates in 2004, 2005 and 2006 did not differ significantly (40.8, 33.8 and 33.1 per 1000 persons, respectively). Among 322 and 71 subjects who completed only one and two follow-up years, respectively, the annual infection rate was 40.8 and 14.1 per 1000 persons, respectively. These rates did not differ significantly from those for the closed cohort, suggesting that loss-to-follow-up may not have affected the rate estimates.

The study found that the incidence for secondary and tertiary *Leptospira* infection were almost 4 times greater and almost 8 times greater than the incidence for primary *Leptospira* infection, respectively, indicating that repeated *Leptospira* infections occur frequently in an environment of endemic transmission of leptospirosis. It remains unclear whether *Leptospira* infection confers natural immunity in humans capable to protect from development of severe leptospirosis in subsequent episodes of infection. In addition, there is no evidence for a role of a prior *Leptospira* infection in the development of more severe disease presentations in subsequent infections, as is seen in dengue hemorrhagic fever, where repetitive infections by different serotypes appear to predispose to severe forms of disease [Pineiro, 1997; Rigau-Pérez, 1998; Guzmán, 2000]. Further studies to determine how natural *Leptospira* infections

influence the immunopathogenesis of subsequent infections are warranted and will have obvious impact on strategies for development of *Leptospira* vaccines.

GEE Model identified male sex as an independent risk factor for *Leptospira* infection as it happens for severe disease. We also see that women and children are exposed to *Leptospira* infection and it still be an important issue the reason why they do not progress to severe disease like men do. Also, young adults had the highest risk for infection, especially individuals from the age group 25-34. Further research to identify what are the risk behaviors is needed such that effective interventions can be implemented.

The GEE model also found environmental and social exposures associated with *Leptospira* infection, which can suggest why population groups within the slum are predisposed to *Leptospira* infection during life. Household flooding typically occurs during periods of heavy rainfalls when the water drainage systems do not support the high volume of water and overflow, reaching the most susceptible households located in the bottom of the valleys and in proximity to the open sewers and rainwater drainage systems. Furthermore, this finding corroborates results from previous cross-sectional and case-control studies [Sarkar, 2002; Reis, 2008], which have indicated that proximity of household to open sewers is associated with both *Leptospira* infection and severe leptospirosis. These findings show that prevention measures need to directly address the infrastructure deficiencies in marginalized slum communities, which serve as environmental transmission sources.

In addition, low per capita household income was strongly associated with *Leptospira* infection. Each one-dollar increase in the daily per capita household income decreased the risk of *Leptospira* infection by 24%. This finding is noteworthy because confirms results

from the previous cross-sectional study conducted in the same community [Reis, 2008], which have shown that in addition to environment attributes, low per capita household income markedly influence the risk of having antibodies against *Leptospira*. Furthermore, they indicate the existence of a social gradient within slums that place the most vulnerable population in the bottom of this gradient in increased risk for *Leptospira* infection. Poverty may determine infection risk by diverse mechanisms including risky behaviors, such as limited use of protective clothing, which reduce the risk of abrasions that facilitate entry of the *Leptospira* spirochete [Phraisuwan, 2002], low status and lack of access to amenities and social support [Marmot 2001] and improper sanitation conditions of household. Therefore, efforts to prevent leptospirosis in slums will have to address the most neglected inhabitants in order to be effective. More research is needed to determine how social gradient within slum populations influences infection risk.

Limitations of this study must be considered. The proportion of males among the enrolled individuals was lower than among non-participants. In addition, 35% of the enrolled participants did not complete follow up. Migration to other communities or cities is common among slum residents who achieve financial improvement. In our cohort, subjects who did not complete follow up had a higher proportion of males in comparison to those who completed follow up, they did not differ with respect to age, educational level, income or environment attributes. However, *Leptospira* infection rates adjusted by gender distribution of the eligible population did not differ from crude rates, infection rates also did not differ between subjects who were followed for one or two years and those who completed three-year follow-up suggesting that differences between enrolled and non-enrolled participants may have not introduced a significant bias in the estimates. Although the loss-to-follow-up may have introduced bias in the *Leptospira* infection rates and risks, our estimates should be valid for the most neglected population who continuously lives in slums for long periods.

Use of serology to identify infection occurrence may also introduced bias in the *Leptospira* infection rate. Although the date of infection acquisition may be anytime between the baseline and the follow up serological evaluation, as it is not feasible to determine the exact date of infection we considered as the infection date of the follow up collection of blood. Therefore, the use of the whole period between the serological exams may have lead to an underestimation of the infection rates. In addition, if a study subject had acquired *Leptospira* infection more than once during the follow up period; the second test would not be able to differentiate the infection episodes as more than one.

In the multivariate model, we found no association between *Leptospira* infection with a previously recognized risk factor for *Leptospira* infection in slums named rats' infestation. We have reasons to believe that the non-identification of this associations may have resulted from the small number of infections and the limited power to detect it rather than its nonexistence. First, the highest MAT titer was directed against *L. interrogans* serovar Copenhageni in 94% of the participants who acquired *Leptospira* antibodies and serovar Copenhageni is characteristically associated with the *Rattus norvegicus* reservoir in urban slums [Ko,1999; Pereira, 2000; Levett, 2001; Bharti, 2003]. Furthermore, 76% of the subjects who did not acquired *Leptospira* infection reported sighting rats near household compared to 87% of those who acquired *Leptospira* infection, respectively ($P>0.05$).

We chose the GEE model in order to identify risk factors for *Leptospira* infection but it is necessary to discuss some of this model's advantages and limitations. Many statistical models assume the independence among the observations. But it is not what happens in real life, due to the study planning or to the outcome of interest. When there are multiple measurements of the same variable for one unit (individual) it is necessary to use a method that takes into

account the real data structure (dependence among the observations) in order to obtain efficient analysis results. The GEE parameter estimates are efficient provided the most correct correlation structure is closely approximated. Modules for GEE are widely available in many statistical software applications (like R, STATA, SAS, SPSS) and the GEE parameter estimates are consistent irrespective of the covariance structure chosen, as long as the linear predictor and link function are correctly specified. On the other hand, the GEE has some limitations: it considers just with the average effect of all individuals and does not take into account the random effect of each individual during time. The GEE have solutions which are consistent and asymptotically Gaussian even when the time dependence is misspecified as we often expect. GEE assumes that the chosen model is correctly specified and it is often difficult to assess the goodness-of-fit of models built using GEE due to lack of an inference function like the likelihood ratio test. Also, GEE parameter estimates are not efficient if the correlation structure is misspecified.

We did not find association between *Leptospira* infection and occupational factors, this confirms the peridomiciliary environment as the risk scenario for infection and the place we can focus public health interventions as we had already found in our previous studies. These findings also reflect the transition of leptospirosis from a rural and occupational disease to an urban health problem in our city and calls our attention to socioeconomic problems like unemployment and informal work in a community where just 13% of the individuals have a formal work. The unemployed individuals or informal workers tend to stay in the peridomiciliary environment for longer periods of time and when they get a temporary job it usually is not dissociated from peridomiciliary environment and they are exposed to risk conditions for *Leptospira* infection, such as contact with contaminated sources without protection equipment, skin cuts or abrasions.

Current, one billion of the world population lives in slum and estimations predict that this number will double in the next 30 years [United Nations Human Settlements Programme, 2003]. Although climate and geography may vary among slums situated in different cities, urban poverty and deprived sanitation infrastructure is present as a hallmark of slums everywhere. In Brazil, 37% of the urban population resides in slums with equal or greater levels of poverty as found in the study community [Slums of the World - UN-HABITAT, 2003]. Our findings may therefore be valid to other slum communities where leptospirosis is endemic and the socioeconomic and environment profile is similar.

The study's findings indicate that, even within an overall poor slum settlement, environmental and social differences among slum residents may produce a gradient of risk for *Leptospira* infection, which pushes those in the bottom of this gradient to multiple episodes of *Leptospira* infection. It is probable that other infectious diseases that occur repeatedly during life, such as diarrhea, worm infections, respiratory and skin infectious, were also more common among the most neglected population within slums. Therefore, improving sanitation, and identifying and addressing the mechanisms by which social determinants influence the acquisition of *Leptospira* should be priority to prevent un-healthy outcomes in slums.

Acknowledgments

We would like to thank team members from the Urban Health Council of Pau da Lima and Oswaldo Cruz Foundation, Rosan Barbosa, Reinaldo Barreto, Jorge Costa, Maria Raimunda da Cruz, Ana Carla Duarte, Leila Gouveia, Analéa Lima, Simone Nascimento, Osmar Paixão,

Amaro Silva and Érika Sousa who participated in the data collection for the study. We would also like to thank the Company for Urban Development of the State of Bahia (CONDER) for providing digital maps of the study site, Elves Maciel and Alicia Chang for their assistance in designing the study; Claudio Pereira de Sá (in memorium) Finally, this work could not be accomplished without the joint collaborative effort of the resident associations that comprise the Urban Health Council of Pau da Lima and community leaders and residents.

REFERENCES

- Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG, et al., (2001) Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol* 39: 191–195.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, et al., (2003) Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3:757–771.
- Cumberland P, Everard CO, Wheeler JG, Levett PN (2001) Persistence of antileptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989. *Eur J Epidemiol* 17: 601–608.
- Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires, TSF, Villasboas-Bisneto, JC et al., (2008) Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14(3): 505–508. doi: 10.3201/eid1403.071064.
- Guzmán MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M et al., (2000) Epidemiologic Studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 152: 793-799.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2007) Censo demográfico 2007.
- Johnson MA, Smith H, Joseph P, Gilman RH, Bautista CT et al., (2004) Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis* 10:1016-22
- Ko AI, Reis MG, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354: 820–825.
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Lupidi R, Cinco M, Balanzin D, Delprete E, Varaldo PE (1991) Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 29: 805–809.
- Maciel EAP, Carvalho ALF, Nascimento SF, Matos RB, Gouveia EL, et al., (2008) Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e154. doi:10.1371/journal.pntd.0000154.
- Marmot M (2001) Inequalities in health. *N Engl J Med* 345: 134–136.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386.
- Pereira MM, Matsuo MG, Bauab AR, Vasconcelos SA, Moraes ZM, et al., (2000) A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J Clin Microbiol* 38: 450–452.
- Phraisuwan P, Whitney EA, Tharmaphornpilas P, Guharat S, Thongkamsamut S, et al., (2002) Leptospirosis: Skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg Infect Dis* 8: 1455–1459.

- Pinheiro FP, Corber SJ. (1997) Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Américas. *Rapp. trimest. statist. sanit. mond.*, 50.
- Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, et al., (2008) Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLOS Negl Trop Dis.* 2 e228: doi:10.1371/journal.pntd.0000228.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ et al., (1998) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 352 971-977.
- Romero EC, Yasuda PH (2006) Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: A public health tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 373–378.
- Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, et al., (2002) Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 66: 605–610.
- Secretaria de Combate à Pobreza e às Desigualdades Sociais/SECOMP (2005) *Mapamento da pobreza em áreas urbanas do estado da Bahia*. CD-ROM 2005.
- Tassinari W de S, Pellegrini D da C, Sabroza PC, Carvalho MS (2004) [Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996–1999]. *Cad Saude Publica* 20: 1721–1729.
- United Nations Human Settlements Programme (2003) *The challenge of slums: Global report on human settlements 2003*. London: Earthscan Publications Ltd. 310 p.
- UN-HABITAT (2003) *Slums of the world: The face of urban poverty in the new Millennium*. Nairobi: UN-HABITAT. 94 p.

TABLE 1. *Leptospira* infection rates among 1,300 participants who completed the three year of follow-up of the cohort. Salvador, Brazil, 2003-2006.

Infection	No. Infections*	Individuals	Mediam annual rates†	CI 95%*
Total	140	3,900	35.9	25.8- 46.0
Primary	121	3,754	32.2	22.6 - 41.8
Secondary	18	142	126.8	108.7 - 144.9
Tertiary	1	4	250.0	226.5 - 273.5

*No., Number of infections; CI, confidence intervals.

†.Number of infections divided by the number of individuals followed expressed as per 1,000 person-years.

TABLE 2. Number of episodes of *Leptospira* infection among 1,300 participants of the cohort for three-year follow-up. Salvador, Brazil, 2003-2006.

Type of Infection	First year of follow-up			Second year of follow-up			Third year of follow-up			Total		
	No. Inf.*	No. ind. tested*	Rate†	No. Inf.	No. ind. tested	Rate†	No. Inf.	No. ind. tested	Rate†	No. Inf.	No. py.*	Rate†
Any infection	53	1,300	40.8	44	1,300	33.8	43	1,300	33.1	140	3,900	35.9
Primary infection	53	1,300	40.8	40	1,247	32.1	28	1,207	23.2	121	3,754	32.2
Secondary infection	-	-	-	4	53	75.5	14	89	157.3	18	142	126.8
Tertiary infection	-	-	-	-	-	-	1	4	250.0	1	4	250.0

*No., Number of infections; ind., individuals; inf., infections; py., person-years.

† Rate calculated per 1,000 population.

TABLE 3. Univariate risk factors for leptospirosis infection among the 1,300 participants who completed the three-year of follow-up of the cohort, Salvador, Brazil, 2003-2006*.

Characteristics	Infected (N=121)	Non infected (N=1,179)	Univariate RR† (IC 95%)
	No. or Median (% or IQR)	No. or Median (% or IQR)	
Age: 5-14	16 (13)	367 (31)	1.00
15-24	38 (31)	282 (24)	2.72 (1.48 - 5.00)
25-34	31 (26)	194 (16)	3.55 (1.88 - 6.71)
35-44	16 (13)	165 (14)	2.16 (1.04 - 4.46)
>44	20 (17)	171 (15)	2.38 (1.20 - 4.70)
Male gender	64 (53)	477 (40)	1.57 (1.08- 2.29)
Black race	52 (43)	319 (27)	1.86 (1.28 - 2.71)
Daily per capita household income (dollar/day)#	0.9 (0.3 – 1.6)	1.4 (0.6 – 2.1)	0.80 (0.66 - 0.96)
m from the sewer and m from the lowest point in valley			
>20 e >20	38 (31)	521 (44)	1.00
<20 e <20	20 (17)	172 (15)	1.62 (0.92 - 2.84)
>20 e <20	5 (4)	105 (9)	0.72 (0.27 - 1.92)
<20 e <20	58 (48)	381 (32)	2.15 (1.41 - 3.29)
Distance from the garbage deposit#	71.9 (44.6 – 116.7)	63.2 (41.9 – 102.6)	1.00 (1.00 - 1.01)
Seeing 2 or more rats	66 (54)	470 (40)	1.73 (1.19 - 2.51)
Chicken in the domicile	58 (48)	444 (38)	1.57 (1.08 - 2.28)

* Generalized Estimation Equation Model was used to account for the time dependence of repeated measure data in risk factor analysis.

† No., number; %, percentage; IQR, interquartile range; RR, Risk Ratio; CI, Confidence Interval

Incorporated in the model as continuous variables.

TABLE 4 Multivariate risk factors for leptospirosis infection among cohort subjects, Salvador, Brazil, 2003-2006*.

Characteristics	Multivariate RR (CI 95%)†
Age: 5-14	1.00
15-24	3.26 (1.77 - 6.02)
25-34	4.55 (2.40 - 8.60)
35-44	2.71 (1.33 - 5.55)
>44	3.48 (1.72 - 7.02)
Male gender	1.77 (1.22 - 2.56)
Black race	1.63 (1.12 - 2.38)
Daily per capita household income (dollar/day) #	0.76 (0.62 - 0.93)
m from the sewer and m from the lowest point in valley	
>20 e >20	1.00
<20 e >20	1.50 (0.84 - 2.68)
>20 e <20	0.66 (0.24 - 1.76)
<20 e <20	1.89 (1.23 - 2.90)

* Generalized Estimation Equation Model was used to account for the time dependence of repeated measure data in risk factor analysis.

† RR, Risk Ratio; CI, Confidence Interval

Incorporated in the model as continuous variables.

6- DISCUSSÃO

A leptospirose, em Salvador, ocorre em epidemias anuais que acometem principalmente indivíduos residentes em comunidades desprovidas de infra-estrutura sanitária (Caldas et al., 1979; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Barcellos & Sabroza, 2001). Poucos estudos foram realizados no intuito de compreender a carga da doença e os fatores de risco para infecção, informações que podem auxiliar no desenvolvimento de medidas preventivas focalizadas em locais/grupos de risco que possibilitem otimizar recursos públicos.

O primeiro manuscrito desta tese refere-se a um estudo de corte transversal realizado na comunidade de Pau da Lima, na cidade de Salvador-Bahia. Entre os 3.171 participantes do estudo, 15% apresentaram evidência sorológica de infecção prévia por *Leptospira*. Este achado corrobora com dados de inquérito sorológico realizado em Salvador que encontrou uma prevalência de anticorpos contra *Leptospira* em 12% da população de Salvador (Dias et al., 2007). O sorovar Copenhageni foi identificado como provável sorovar infectante em mais de 89% das infecções prévias, confirmando o rato como principal reservatório para a *Leptospira* na citada cidade, semelhante ao que já foi demonstrado em estudos anteriores realizados para doença grave em ambiente urbano (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000; Barrochi et al., 2001; Romero et al., 2006).

A transmissão da *Leptospira*, incluiu fatores demográficos como idade, tendo os indivíduos com 45 anos ou mais um maior risco que as demais faixas etárias, e sexo masculino, já sabidos para doença grave (Ko et al., 1999; Romero et al., 2003; Meites et al., 2004; Gouveia et al., 2008). Além disso, ela também correu por interação de fatores associados à

geografia, clima e pobreza que foram identificados como independentemente associados à infecção prévia por *Leptospira*: deficiências em saneamento, identificadas com o auxílio de Sistema de Informação Geográfica e modelagem, tais como, áreas com risco para alagamento com esgotos abertos, proximidade do domicílio a acúmulo de lixo, ver ratos, fatores esses anteriormente encontrados em estudos sobre a transmissão da leptospirose (Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Sarkar et al., 2002; Ganoza et al., 2006; Maciel et al., 2008). Estes dados confirmam o que se conhece a respeito das epidemias de leptospirose em ambientes urbanos que ocorrem diante das grandes chuvas e inundações (Caldas et al., 1979; Douglin et al., 1997; Faine et al., 1999; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2000; Kupek et al., 2000; Barcellos & Sabroza, 2001; Costa et al., 2001; Sarkar et al., 2002; Bharadwaj et al., 2002; Phraisuwan et al., 2002; Vado-Solís et al., 2002; Romero et al., 2003; Covic et al., 2003; Tassinari et al., 2004; Maciel, 2008; Sethi et al., 2010). Fatores como presença de galinhas no domicílio, marcador para a presença de ratos e raça negra, indicador de condição sócio-econômica (Barros et al., 2001; Travassos et al., 2004), foram identificados. Outro fator sócio-econômico, baixa renda, esteve associado de forma independente à infecção prévia por *Leptospira*. Cada acréscimo de 1 dólar na renda familiar per capita reduziu em 11% o risco de infecção prévia (IC 95%, 5%-18%), apontando para a existência de um gradiente social que estaria influenciando o risco de infecção prévia nesta comunidade em questão e que é algo já discutido em todo o mundo (Marmot et al., 2001; Marmot et al., 2005). Este achado pode estar relacionado a atividades de risco como limpeza de esgotos abertos sem o uso de equipamentos de proteção individual, possibilitando a ocorrência de ferimentos na pele e, fornecendo assim, a entrada das leptospirosas (Phraisuwan et al., 2002).

Este estudo de soroprevalência apresentou algumas limitações. Os indivíduos que não participaram do estudo apresentaram maior proporção de homens e indivíduos jovens,

quando comparados aos participantes. A prevalência ajustada por idade e sexo não diferiu da não ajustada, então foi mantida a não ajustada. Além disso, existe a possibilidade das infecções terem ocorrido há alguns anos antes do inquérito ser realizado, considerando que os anticorpos aglutinantes podem persistir por longo período.

Outra limitação relevante foi o fato de, por se tratar de um estudo de corte transversal, não há possibilidade de estabelecer causalidade entre exposição e desfecho, por não ser possível precisar a temporalidade entre a ocorrência de ambos. Tornava-se necessário, portanto, prosseguir através do acompanhamento da coorte nesta comunidade para conseguir obter informações a respeito da carga da doença e confirmar longitudinalmente os achados para o corte transversal realizado.

Desta maneira, para confirmar os achados do estudo de soroprevalência sem as citadas limitações do corte-transversal e também para auxiliar na focalização de medidas de saúde pública, a partir da identificação de grupos de risco, no segundo manuscrito desta tese, foram apresentados os resultados do maior estudo prospectivo sobre leptospirose realizado em comunidade. Este estudo possibilitou estimar taxas de infecção e identificar fatores de risco para infecção por *Leptospira* em indivíduos selecionados randomicamente e seguidos por três anos. A taxa de incidência média anual foi 35,9 infecções por 1.000 pessoas-anos de seguimento. Uma taxa muito superior à taxa de doença grave nesta área estudada que é de 57,8 casos graves por 100.000 indivíduos. Considerando que 65% dos habitantes de Salvador vivem sob condições de pobreza semelhantes às da comunidade de Pau da Lima, estima-se mais de 67.000 infecções por *Leptospira* por ano em Salvador.

As infecções repetidas foram muito comuns nesta comunidade, com taxas de infecções secundária e terciária de 126,8 e 250,0 por 1.000 pessoas-anos de seguimento, enquanto a taxa de infecção primária foi de 32,2 por 1.000 pessoas-anos de seguimento. Estes achados apontam para grupos de risco nesta comunidade que são expostos anualmente, talvez às mesmas fontes e/ou comportamentos de risco. Independente do tipo de infecção, primária, secundária ou terciária, a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi o provável sorovar infectante em mais de 95% das infecções. Este achado confirma estudos anteriores (Ko et al., 1999; Pereira et al., 2000; Barrochi et al., 2001; Romero, 2006), inclusive o corte transversal apresentado nesta tese, que apontam o *Rattus norvegicus* como o principal reservatório neste ambiente.

Homens e, especialmente, adultos jovens (com maior força de associação para 25-34 anos de idade), o que reforça os resultados de maiores taxas de infecção total, primária, secundária e terciária nesta faixa etária, foram identificados como grupos de risco nas análises multivariadas, semelhante ao que ocorre na doença grave (Ko et al., 1999; Gouveia et al., 2008). Porém, os resultados demonstram que mulheres e crianças são expostas, entretanto, ainda é desconhecido o motivo destas não estarem evoluindo para a forma grave, na mesma proporção que os homens. Hipóteses que poderiam ser levantadas: Diferenças na resposta imune após a infecção por *Leptospira* podem ser determinadas por fatores relacionados à idade e/ou ao sexo, a exemplo de níveis hormonais ou maturidade imunológica. Outro fator importante é que exposições repetidas à infecção por *Leptospira* e a possível conseqüente aquisição de anticorpos contra *Leptospira* podem ser influenciadas pela idade e o sexo e também podem estar relacionadas ao desenvolvimento de leptospirose grave. Um outra questão relevante é que a dose do inóculo durante exposição à *Leptospira* pode ser

influenciada por questões comportamentais que diferem entre indivíduos de diferentes faixas etária e sexo.

Ainda utilizando o GEE Model, os demais fatores de risco identificados nas análises multivariadas para os três anos de seguimento da coorte foram: residir a até 20m de esgoto aberto e a até 20m do ponto mais baixo do vale que também confirmam dados encontrados em estudos anteriores para doença grave (Sarkar et al., 2002; Maciel et al., 2008). Fatores sócio-econômicos também foram identificados, tais como, raça negra e, apesar de controlar para fatores demográfico-comportamentais e ambientais, baixa renda per capita foi um fator fortemente associado à infecção por *Leptospira*. A cada dólar acrescido à renda familiar per capita o risco de infecção esteve reduzido em 24%. Estes achados confirmam os achados encontrados para o estudo de soroprevalência e realmente nos indicam que existe um gradiente social nesta comunidade e em comunidades carentes em geral, que coloca os indivíduos na parte baixa deste gradiente em maior risco para infecção. Ainda é necessário compreender quais os comportamentos de risco executados por este grupo com maior risco para infecção, desta forma, poderemos ajudar no desenvolvimento de intervenções de saúde pública para combate à leptospirose urbana. Os fatores de risco encontrados neste estudo não incluíram variáveis ocupacionais, este estudo aponta para o ambiente peridomiciliar como local onde há maior probabilidade de ocorrer a transmissão.

Em relação a este estudo de incidência para os três anos de seguimento da coorte, algumas limitações precisam ser discutidas. Em relação ao possível viés de seleção, a proporção de indivíduos do sexo masculino entre os participantes foi menor que entre os não participantes, no recrutamento. A perda de seguimento é uma característica inerente aos estudos de coorte, e, por se tratar de uma coorte a ser realizada na população localizada em

área de risco, locais onde ocorrem inundações constantes durante as chuvas, o estudo esteve susceptível a apresentar perdas. Sendo assim, 35% dos indivíduos recrutados não completaram todos os três anos de seguimento. Apesar dos indivíduos seguidos diferirem em proporção de homens em relação ao não seguidos, eles não diferiram em relação à idade, nível de escolaridade, renda ou fatores ambientais. Apesar das diferenças citadas, as taxas ajustadas por gênero não diferiram daquelas não ajustadas, da mesma forma, as taxas não diferiram para indivíduos seguidos por um ou dois anos e aqueles seguidos por três anos. Isto indica que as diferenças encontradas não parecem ter introduzido viés nas estimativas apresentadas. Foram mantidas, portanto, as taxas não ajustadas.

Os inquéritos sorológicos apenas anuais para identificar infecção por *Leptospira* podem ter sido uma fonte de viés, por não ser possível prever exatamente quando ocorreu a infecção, considerando assim no cálculo todo o período entre as coletas inicial e final de cada seguimento. Isto pode ter subestimado as taxas de infecção e também não nos permitiu identificar a ocorrência de mais de um episódio de infecção no mesmo ano. Os títulos de anticorpos aglutinantes na microaglutinação podem ter decrescido no período entre as avaliações inicial e final de cada seguimento, mas para identificar as mudanças seriam necessárias avaliações mais periódicas em um ano para cada um dos participantes, isto seria financeiramente complexo de executar. Outra limitação é ter havido provavelmente um ajuste incompleto para alta correlação entre variáveis, a exemplo de cota acima da cota mínima e distância do domicílio a esgoto aberto.

Em relação à validade externa dos dois estudos apresentados nesta tese, sabe-se que 37% da população brasileira (UN-HABITAT, 2003) e 65% da população de Salvador, vivem em condições de pobreza semelhantes às da população estudada. Acredita-se também que

estes resultados se aplicam a muitas comunidades no mundo nas quais a leptospirose é endêmica e as condições de vida se assemelham às da comunidade do estudo. Desta forma, no futuro, medidas de saúde pública que se mostrarem efetivas nesta população poderão ser implementadas e avaliadas em diferentes comunidades carentes.

As medidas de prevenção e combate à leptospirose devem ser estabelecidas de acordo com a realidade local, para isto é necessário identificar as áreas críticas (com maior incidência) e exposições ambientais de risco para infecção através do acompanhamento em tempo real dos indivíduos residentes nestas áreas e isto foi o que se procurou fazer com este estudo.

Os dois manuscritos apresentados confirmam muitos achados de estudos anteriores realizados em relação à doença grave (Ko et al., 1999; Gouveia et al., 2008; Maciel et al 2008) e abrem novas descobertas e questionamentos. Chama a atenção que, nesta comunidade, apesar de controlarmos para fatores demográficos e ambientais, existe um gradiente social que também influencia no risco para infecção por *Leptospira*. Desta forma, a melhoria das condições sanitárias e sociais deve ser considerada como prioridade na prevenção à leptospirose em favelas urbanas cuja população tende a dobrar nos próximos 30 anos (UN-HABITAT, 2003).

7- CONCLUSÕES:

Primeiro manuscrito da tese (prevalência de infecção prévia por *Leptospira*, estudo de corte transversal):

1- Uma proporção significativa (15%) da população estudada na comunidade de Pau da lima possui evidência de infecção prévia por *Leptospira*.

2- O sorovar Copenhageni foi identificado como provável sorovar infectante em mais de 89% das infecções prévias, este fato confirma o rato como principal reservatório para a *Leptospira* na comunidade estudada.

3- Fatores de risco encontrados para infecção prévia por *Leptospira* foram idade, tendo os indivíduos com 45 anos ou mais um maior risco que as demais faixas etárias, sexo masculino, áreas com risco para alagamento com esgotos abertos, proximidade do domicílio a acúmulo de lixo, ver ratos, presença de galinhas no domicílio (marcador para infestação por roedores), raça negra (marcador sócio-econômico). Baixa renda foi um dos determinantes de maior risco, cada acréscimo de 1 dólar na renda familiar per capita reduziu em 11% o risco de infecção prévia (5%-18%).

Segundo manuscrito da tese (infecção por *Leptospira*, estudo longitudinal para três anos de seguimento):

4- Em relação à média de infecção anual, aproximadamente, 3,6% da população estudada foram infectados por *Leptospira* durante três anos de seguimento da coorte. Esta taxa é muito superior à encontrada para doença grave nesta comunidade estudada.

5- O sorovar Copenhageni foi identificado como provável sorovar infectante em mais de 95% das infecções, confirmando o resultado do estudo de prevalência este de que o rato é o principal reservatório para a *Leptospira* na comunidade estudada.

6- As infecções repetidas foram muito comuns nesta comunidade, com taxas de infecção secundária e terciária de 126,8 e 250,0 por 1.000 pessoas-anos de seguimento, enquanto a taxa de infecção primária foi de 32,2 por 1.000 pessoas-anos de seguimento. Estes achados indicam que existem grupos de risco nesta comunidade que são expostos anualmente, talvez às mesmas fontes e/ou comportamentos de risco.

7- Homens e, especialmente, adultos jovens (25-34 anos de idade, o que reforça os resultados de maiores taxas de infecção total, primária, secundária e terciária nesta faixa etária) foram identificados como grupos de risco nas análises multivariadas, semelhante ao que ocorre na doença grave. Porém, foi demonstrado que mulheres e crianças são expostas mas ainda permaneceu desconhecido o motivo destas não estarem evoluindo para a forma grave, na mesma proporção que os homens.

8- Os demais fatores de risco identificados nas análises multivariadas para os três anos de seguimento da coorte foram: residir a até 20m de esgoto aberto e a até 20m do ponto mais baixo do vale, raça negra e, apesar de controlar para fatores demográfico-comportamentais e ambientais, baixa renda per capita foi um fator fortemente associado à infecção por

Leptospira, estes achados auxiliam na identificação de prováveis grupos de risco. Ainda é necessário investigar quais são os comportamentos de risco praticados por estes grupos específicos e também compreender de que forma o gradiente social está influenciando a ocorrência de infecção por *Leptospira*.

9- Os fatores de risco encontrados neste estudo não incluíram variáveis ocupacionais, este estudo aponta para o ambiente peridomiciliar como local onde há maior probabilidade de ocorrer a transmissão.

10- As conclusões dos manuscritos apresentados confirmam muitos achados de estudos anteriores realizados em relação à doença grave e abrem novas descobertas e questionamentos. Além de fatores demográficos e ambientais, existe um gradiente social dentro desta comunidade que também influencia no risco para infecção por *Leptospira*. Através destes resultados para esta coorte com base populacional, espera-se colaborar na identificação de medidas preventivas não só para esta como para outras comunidades com o mesmo perfil de pobreza da que estamos estudando.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER B, FAINE S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. **Infect Immun.**, 17:67-72, 1977.
- ADLER B, FAINE S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. **Med Microbiol.**, 11: 387-400, 1978.
- ANDRADE L, CLETO S, SEGURO AC. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: Impact on mortality. **Clin J Am Soc Nephrol.**, 2(4):739-44, 2007.
- AOKI T, KOIZUMI N, WATANABE H. A case of leptospirosis probably caused by drinking contaminated well-water after an earthquake. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 54:243-244, 2001.
- AREAN VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's Disease), **Am. J. Pathol.**, 40:393-415.
- BARCELLOS C, SABROZA PC. Sócio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in Western Rio de Janeiro: a geographical approach. **Int. J. Environ. Health Res.**, 10:301-313, 2000.
- BARCELLOS C, SABROZA PC. The Place behind the case: leptospirosis risks and associated environment conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Públ.**, 59:59-67, 2001.
- BAROCCHI MA, KO AI, FERRER SR, FARIA MT, REIS MG, RILEY LW. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. **J. Clin. Microbiol.**, 39:191-195, 2001.
- BARROS FC, VICTORA CG, HORTA BL. Ethnicity and infant health in Southern Brazil. A birth cohort study. **Int J Epidemiol.**, 30: 1001-1008, 2001.
- BERMAN SJ, TSAI CC, HOLMES K, FRESH JW, WATTEN RH. Sporadic anicteric leptospirosis in South Vietnam. A study in 150 patients. **Ann Intern Med.** 79: 167-173, 1973.
- BHARADWAJ R, BAL AM, JOSHI SA, KAGAL A, POL SS, GARAD G, ARJUNWADKAR V, KATTI R. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 55:194-196, 2002.
- BHARTI AR, ALLY JE, ICALDI JN, MATHIAS MA, DIAZ MM, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, 3:371-375, 2003.
- BINDER WD, MERMEL LA. Leptospirosis in an urban setting: Case report and review of an emerging infectious disease. **J. Emerg. Med.**, 16:851-856, 1998.

BOLAND M, AYERS G, OLEMAN T, ERGIN C, HEEHAN N, REAMER E, CONNELL M, ONES L, OCHOWSKI W. A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. **Epidemiol. Infect.**, 132: 95-200, 2004.

BOVET P, YERSIN C, MERIEN F, DAVIS CE, EROLAT P. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean) **Int. J. Epidemiol.**, 28:583-590, 1999.

BULACH DM, ZUERNER RL, WILSON P, SEEMANN T, McGRATH A, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 26;103(39):14560-5, 2006.

CALDAS EM, SAMPAIO MB, COSTA E, MIRANDA G. Estudo epidemiológico de um surto de leptospirose ocorrido na cidade do Salvador, Bahia em maio e junho de 1978. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 39:85-94, 1979.

CASTELLS M. **A Questão Urbana**. Paz e Terra, São Paulo, 2006.

CDC. Centers of Disease Control and Prevention. United States of America. Department of Health & Human Services. Leptospirosis: case definitions for infectious conditions under public health surveillance. **MMWR, Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, 46(RR-10):49, 1997.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Update: outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000—Borneo, Malaysia, 2000. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, 50:21–24, 2001.

COSTA E, COSTA YA, LOPES AA, SACRAMENTO E, BINA JC. [Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais]. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, 34:1-12, 2001.

DAHER E, ZANETTA DM, CAVALCANTE MB, ABDULKADER RC. Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61:630- 634, 1999.

DIAS JP, TEIXEIRA MG, COSTA MC, MENDES CM, GUIMARAES P, et al., [Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in Northeastern Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 40: 499–504, 2007.

DOUGLIN CP, JORDAN C, ROCK R, HURLEY A, LEVETT P. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. **Emerg. Infect. Dis.**, 3:78-80, 1997.

DASTIS-BENDALA C, VILLAR-CONDE E, MARIN-LEONE I, MANZANARES-TORNE L, PEREZ-LOZANO MJ et al. Prospective serological study of leptospirosis in Southern Spain. **European Journal of Epidemiology**, 12:257-262, 1996.

EVERARD COR, HAYES RJ, EDWARDS CN. Leptospiral infection in schoolchildren from Trinidad and Barbados. **Epidemiol Infect.**, 103: 143–156, 1989.

- EVERARD COR. Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 3, 255–266, 1990.
- EVERARD CO, EDWARDS CN, EVERARD JD, CARRINGTON DG. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. **Eur J Epidemiol.**, 11(3):311-20, 1995.
- FAINE S. Factors affecting the development of the carrier state in leptospirosis. **J. Hyg., Camb.**, 60, 427, 1962.
- FAINE S. **Guidelines for the Control of Leptospirosis**. WHO Offset Publ: 1-171, 1982.
- FAINE S. **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: CRC Press, MedSci, 1999.
- FARR WR. Leptospirosis. **Clin. Infect Dis.**, 21:1-8, 1995.
- FLANNERY B, PEREIRA MM, VELLOSO LF, CARVALHO CC, CODES LG, ORRICO GS, DOURADO CMR, RILEY LW, REIS MG, KO AI. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65:657-663, 2001.
- GALÉ NB, ALEXANDER AD, EVANS LB, YAGER RH, MATHENEY RG. An outbreak of leptospirosis among U.S. army troops in the canal zone. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 15:64-70, 1966.
- GANOZA CA, MATTHIAS MA, COLLINS-RICHARDS D, BROUWER KC, CUNNINGHAM CB, et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Med.**, 3: e308. doi:10.1371/journal.pmed.0030308, 2006.
- GONÇALVES AJ, DE CARVALHO JE, GUEDES E SILVA JB, ROZEMBAUM R, VIEIRA AR. [Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the causes of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomicopathological patterns.] **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 25:261-270, 1992.
- GORDILHO AS. **Limites do Habitar: Segregação e Exclusão na Configuração Urbana Contemporânea de Salvador e Perspectivas no Final do Século XX** EDUFBA, Salvador, 2000.
- GOUVEIA EL, METCALFE J, DE CARVALHO ALF, AIRES TSF, VILLASBOAS-BISNETO JC et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, 14(3): 505–508. doi: 10.3201/eid1403.071064, 2008.
- GRIFFITH ME, HOSPENTHAL DR, MURRAY CK. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis.**, 19(6):533–7, 2006.
- GUIDUGLI F, CASTRO A A, ATALLAH AN. Antibiotics for treating leptospirosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, 2000(2):CD001306.
- HAAKE DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, 146:1491-1504, 2000.

HAAKE DA, DUNDOO M, CADER R, KUBAK BM, HARTSKEERL RA, SEJVAR JJ, ASHFORD DA. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin. Infect. Dis.**, 34:40-43, 2002.

JAGADISHCHANDRA K, PRATHB AG, RAO SP. Clinical and epidemiological correlation of leptospirosis among patient attending KMCH, Manipal. **Indian Journal of Medical Sciences**, 57: 101-104,2003.

JANSEN A, STARK K, SCHNEIDER T, SCHÖNEBERG I. Sex differences in clinical leptospirosis in Germany: 1997-2005. **Clin Infect Dis.**, 1;44(9):e69-72, 2007.

KARANDE S, KULKARNI H, KULKARNI M, DE A, VARAIYA A Leptospirosis in children in Mumbai slums. **Indian J Pediatr.**, 69: 855–858, 2002.

KARIV R, KLEMPFNER R, BARNEA A, SIDI Y, SCHWARTZ E. The changing epidemiology of leptospirosis in Israel. **Emerg. Infect. Dis.**, 7:990–992, 2001.

KATZ AR, ANSDELL VE, EFFLER P V, MIDDLETON CR, SASAKI DM. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974–1998. **Clin. Infect. Dis.**, 33:1834–1841, 2001.

KO AI, GALVAO REIS M, RIBEIRO DOURADO CM, JOHNSON JUNIOR WD, RILEY LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, 354:820-825, 1999.

KOBAYASHI Y. Clinical Observations and Treatment of Leptospirosis. **J. Infect. Chemother.**, 7:59-68, 2001.

KUPEK E, FAVERSANI MC DE S S, PHILIPPI JM DE S. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. **Braz. J. Infect. Dis.**, 4:131-134, 2000.

LAROCQUE RC, BREIMAN RF, ARI MD, MOREY RE, JANAN FA, et al. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. **Emerg Infect Dis.**, 11: 766–769, 2005.

LEVETT PN. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14:296–326, 2001.

LINGAPPA J, KUFFNER T, TAPPERO J, WHITWORTH W, MIZE, A, et al. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. **Genes Immun.**, 5:197-202, 2004.

LOPES AA, COSTA E, COSTA YA, SACRAMENTO E, OLIVEIRA JÚNIOR ARR, et al. Comparative study of the in-hospital case-fatality rate of leptospirosis between pediatric and adult patients of different age groups. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, 46(1):19-24, 2004.

MACIEL EAP, DE CARVALHO ALF, NASCIMENTO SF, DE MATOS RB, GOUVEIA EL, et al. Household Transmission of *Leptospira* Infection in Urban Slum Communities. **PLoS Negl Trop Dis.**, 2008 ;2 e154 doi:10.1371/journal.pntd.0000154.

- MARMOT M. Inequalities in health. **N Engl J Med.**, 345: 134–136, 2001.
- MARMOT M. Social determinants of health inequalities. **Lancet**, 365:1099–1104, 2005.
- MAROTTO PC, NASCIMENTO CM, ELUF-NETO J, MAROTTO MS, ANDRADE L, SZTAJNBOK J, SEGURO AC. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clin. Infect. Dis.**, 29:1561-1563, 1999.
- MCBRIDE AJ, ATHANAZIO DA, REIS MG, KO AI. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis.**, 18(5):376-86, 2005.
- MCCLAIN J BL, WR BALLOU, HARRISON SM, STEINWEG DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. **Ann Intern Med.**, 100(5):696-8, 1984.
- MEITES E, JAY MT, DERESINDKI S, SHIEH WJ, ZAKI SR, TOMPKINS L, SMITH DS. Reemerging leptospirosis, California. **Emerg. Infect. Dis.**, 10:406-412, 2004.
- MORGAN J, BORNSTEI SL, KARPATI AM. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin. Infect. Dis.**, 34:1593-1599, 2002.
- NARDONE A, CAPEK I, BARANTON G, CAMPÈSE C, POSTIC D, VAILANT V, LIÈNARD M, DESENCLOS JC. Risk Factors for Leptospirosis in metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 1999-2000. **Brief Rep.**, 39:751-753, 2004.
- NASCIMENTO ATLO, KO AI, MARTINS EAL, MONTEIRO-VITORELLO CB, HO P.L, HAAKE DA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, 186:2164-2172, 2004.
- NICODEMO AC. Lung lesions in human leptospirosis: Microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia **Am J Trop Med Hyg.**, 56:181-187, 1997.
- PAPPAS G, CASCIO A. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. **Int J Antimicrob Agents.**,28(6):491–6, 2006.
- PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, SIOZOPOULOU V, CHRISTOU L, AKRITIDIS N. The globalization of leptospirosis: Worldwide incidence trends. **Int J Infect Dis.**,12(4):351-7, 2008.
- PEREIRA MM, MATSUO MG, BAUAB AR, VASCONCELOS SA, MORAES ZM, BARANTON G, SAINT GIRON I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, 38:450-452, 2000.
- PERRA A, SERVAS V, TERRIER G, POSTIC D, BARANTON G, ANDRE-FONTAINE G, VAILLANT V, CAPEK I. Clustered cases of leptospirosis in Rochefort, France, June 2001. **Eur. Surveill.**, 7:131-136, 2002.

PHRAISUWAN P, WHITNEY EAS, THARMAPHORNPILAS P, GUHARAT S, THONGKAMSAMUT S, ARESAGIG S, LIANGPHONGPHANTHU J, JUNTHIMA K, SOKAMPANG A, ASHFORD DA. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. **Emerg. Infect. Dis.**, 8:1455-1459, 2002.

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

REN S X, FU G, JIANG XG., ZENG R, MIAO YG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, 24;422(6934):888-93, 2003.

RILEY LW, KO A I, UNGER A, REIS MG. Slum health: Diseases of neglected populations. **BMC Int Health Hum Rights**,7(2), 2007.

ROMERO EC, BERNARDO CC, YASUDA PH. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 45:245-248, 2003.

ROMERO EC, YASUDA PH. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: A public health tool. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101: 373–378, 2006.

SARKAR U, NASCIMENTO SF, MATOS RB, MARTINS R, NUEVO H, et al. A population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 66:605-610, 2002.

SEGURA ER, GANOZA CA, CAMPOS K, RICALDI JN, TORRES S, et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clinical Infectious Diseases**, 3:343-351, 2005.

SEHGAL SC, SUGUNAM AP, MURHEKAR MV, SHARMA S, VIJAYACHARI P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. **Int J Antimicrob Agents**. 13:249-255, 2000.

SETHI S, SHARMA N, KAKKAR N, TANEJA J, CHATTERJEE SS, et al. Increasing Trends of Leptospirosis in Northern India: A Clinico-Epidemiological Study. **PLoS Negl Trop Dis** 4(1): e579. doi:10.1371/journal.pntd.0000579, 2010.

SILVA HR, TAVARES-NETO J, BINA JC, MEYER R. Leptospirose- infecção e forma subclínica em crianças em Salvador, Bahia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 46:1, 2004.

Secretaria de Vigilância Sanitária , Ministério da Saúde do Brasil. Leptospirose: Arquivos de Casos Notificados, Brasil, Brazil, 2007.

THAI KTD, NGA TTT, PHUONG HL, GIAO PT, HUNG LQ et al. Seroepidemiology and serological follow-up of anti-leptospiral IgG in children in Southern Vietnam. *Acta Tropica* 106: 128-131, 2008.

TAKAFUJI ET, KIRKPATRICK JW, MILLER RN, KARWACHI JJ, KELLEY PW, et al. Na efficacy Trial od doxycyclinechemoprophylaxis against leptospirosis. **N Eng J Med.** 310: 497-500, 1984.

TANGKANAKUL W, SMITS HL, JATANASEN S, ASHFORD DA. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 36, 2, 281-288, 2005.

TASSINARI W DE S, PELLEGRINI D DA C, SABROZA PC, CARVALHO MS. Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996–1999. **Cad Saude Publica**, 20: 1721–1729, 2004.

TASSINARI WS, PELLEGRINI DC, SÁ CB, REIS RB, KO AI, et al. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. **Trop Med Int Health.** 13(4):503-12, 2008.

THAIPADUNGPANIT J, WUTHIEKANUN V, CHIERAKUL W, SMYTHE LD, PETKANCHANAPONG W, et al. A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. . **PLoS Negl Trop Dis** 2007; 1:e56 doi:10.1371/journal.pntd.0000056.

TRAVASSOS C, WILLIAMS DR. The concept and measurement of race and their relationship to public health: A review focused on Brazil and the United States. **Cad Saude Publica** 20: 660–678, 2004.

TREVEJO RT, RIGAU-PEREZ JG, ASHFORD DA, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicarágua, 1995. **J. Infect. Dis.**, 178:1457-1463, 1998.

TUCUNDUVA DE FARIA M, ATHANAZIO DA, RAMOS EAG, SILVA EF, REIS MG, et al. Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental leptospira infection. **J Comp Pathol.**, 137(4):231-8, 2007.

UN-HABITAT. The challenge of the slums: Global report on human settlements. N. U. Nations, editor.; 2003.

VADO-SOLÍS I, CÁRDENAS-MARRUFO MF, JIMÉNEZ-DELGADILLO B, ALZINALÓPEZ A, LAVIADA-MOLINA H, SUAREZ-SOLÍS V, ZAVALA-VELÁZQUEZ JE. Clinical-Epidemiological Study of Leptospirosis in Humans and Reservoirs in Yucatán, México. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, 44: 1-14, 2002.

VIJAYACHARI P, SUGUNAN AP, MURHEKAR MV, SHARMA S, SEHGAL SC. Leptospirosis among schoolchildren of the Andaman & Nicobar Islands, India: low levels of morbidity and mortality among pre-exposed children during an epidemic. **Epidemiol Infect.** 132(6):1115-20, 2004.

VINETZ JM. Leptospirosis. **Curr. Opin. infect. Dis.**, 14: 527-538, 2001.

VINETZ JM, GLASS G.E, FLEXNER C.E, MUELLER P, KASLOW DC. Sporadic urban leptospirosis, **Ann. Intern. Med.**, 125:794–798, 1996.

WATT G, PADRE LP, TUAZON ML, CALUBAQUIB CM, SANTIAGO E, et al. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. **Lancet**. 27;1(8583):433-5, 1988.

WHO. World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. **WHO Recommended Surveillance Standards**. 1999.

ZAKI SR, SHIEH WJ. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua. **Lancet**; 347:535-6, 1996.

Anexo I: Termo de consentimento original

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

IRB APPROVED

Approved: 1-24-05

Expires: 5-16-05

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

Participant's Name: _____

Participant's House Number: _____

Participant Identification Number: _____

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

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

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

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

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

Anexo II: Folha comum para menores de idade e adultos

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

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

Participant's name: _____

Participant's House Number: _____

Participant Identification Number: _____

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

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

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

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

Signature of Research Study Participant _____

_____ Date _____

_____ Time

Thumbprint of research study participant

Signature of Witness _____

_____ Date _____

_____ Time

Signature of Interviewer _____

_____ Date _____

_____ Time

IRB APPROVED

Approved: 1/29/05

Expires: 5/6/05

Anexo IV: Termo de consentimento traduzido

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

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

Nome do Participante: _____

Nº. da casa do participante: _____

Nº. de identificação do participante: _____



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

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

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

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

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

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

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

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

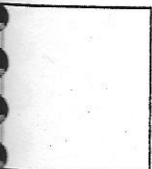
Assinatura do participante do estudo

Data

Hora


Impressão Digital do Participante do Estudo

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


Impressão Digital dos Pais ou Responsável

Assinatura dos Pais ou Responsável Legal

Data

Hora

Assinatura da Testemunha

Data

Hora

Assinatura do Investigador

Data

Hora

Anexo V: Questionário dos seguimentos

História Natural da Leptospirose Urbana

L23: Inquérito das Exposições a Nível Domiciliar

Etiqueta	Codificado DCD23 NCD23	1ª Digitação DDD23 NDD23	2ª Digitação DDSD23 NDS23
-----------------	-------------------------------------	---------------------------------------	--

Data da Entrevista:	DATA23 ____/____/____
Iniciais do Entrevistador:	ENT23 ____
Nº Identificação CASANO:	CASANO16 _ _ _ _

I. DENSIDADE DOMICILIAR: Por entrevista

1. 1	Informações fornecidas por: Chefe de família: <input style="width: 20px;" type="text"/> 1 Dona de casa: <input style="width: 20px;" type="text"/> 2 Outros: <input style="width: 20px;" type="text"/> 3	INFO23 _
1. 2	Número de pessoas que moram no domicílio: _ _	PESS23 _ _

II. RENDA: Por entrevista

2.1	A sua família recebe a bolsa-família? <input style="width: 20px;" type="text"/> 0 Não: <input style="width: 20px;" type="text"/> 1	BOLSAF23 _
-----	---	----------------

2.2	Qual é a renda mensal de sua família? (<u>renda atual</u> de todos moradores do domicílio que
-----	--

Indivíduos				Indivíduos			
1				8			
2				9			
3				10			
4				11			
5				12			
6				13			
7				14			
Bolsa-Família				Alguma outra bolsa/auxílio do Governo			

Renda total: (somatório da renda de todos indivíduos, mais bolsa-família ou outras bolsas)	RENDT23 _ _ _ _ _ _
---	-------------------------

III. CARACTERÍSTICAS DO DOMICÍLIO: Por entrevista

3.1	Tem título/escritura da casa? Não:	0	Sim:	1	TIT23 _
3.2	A casa é alugada? Não:	0	Sim:	1	ALUG23 _
3.3	Paga conta de água (embasa)? Não:	0	Sim:	1	AGUA23 _
3.4	Paga conta de luz (coelba)? Não:	0	Sim:	1	LUZ23 _

IV. RESERVATÓRIOS: Por entrevista

4.1	Tem cachorro no domicílio? Não:	0	Sim:	1	CACH23 _
4.2	Tem gato no domicílio? Não:	0	Sim:	1	GAT23 _
4.3	Cria galinha? Não:	0	Sim:	1	GALC23 _

V. EXPOSIÇÕES: Por entrevista

5.1	Desde a última coleta de sangue, houve alagamento dentro do domicílio durante a época de chuvas? Não:	0	Sim:	1	ALAD23 _
5.2	Desde a última coleta de sangue, houve alagamento na rua em frente do domicílio durante a época de chuva? Não:	0	Sim:	1	ALAR23 _
5.3	Desde a última coleta de sangue, houve alagamento no quintal durante a época de chuvas? Não:	0	Sim:	1	ALAQ23 _

VI. INQUERITO: Por observação

6.1	Tem esgoto a céu aberto próximo (≤ 10 metros) da casa? Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1 Se sim: A Qual a distância? (em metros) _ _ . _ _ _ B Qual a largura? (em metros) _ _ . _ _ _	EESG23 _ DEESG23 _ _ . _ _ _ LEESG23 _ _ . _ _ _
6.2	Tem material acumulado próximo da casa (≤ 10 m) da casa? Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1 Se sim: A Material em desuso	LXCA23 _

	<p>Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1 NSA: <input type="checkbox"/> 8</p> <p>B Material de construção</p> <p>Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1 NSA: <input type="checkbox"/> 8</p> <p>C Lixo</p> <p>Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1 NSA: <input type="checkbox"/> 8</p>	<p>LXMT23 _ </p> <p>LXCN23 _ </p> <p>LX23 _ </p> <p>VEG23 _ </p> <p>BANA23 _ </p> <p>QBANA23 _ _ </p>
6.3	<p>Tem vegetação / mato próximo (≤ 10 metros) da casa?</p> <p>Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1</p>	
6.4	<p>Tem bananeiras próximo (≤ 10 metros) da casa?</p> <p>Não: <input type="checkbox"/> 0 Sim: <input type="checkbox"/> 1</p> <p>Se sim, Quantas? _ _ </p>	

HISTORIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA: Questionário sobre dados sensíveis em nível individual

<p>Etiqueta IDNO16</p>	<p>Codificado DCOD23 NCOD23</p>	<p>1ª Digitação DD23 ND23</p>	<p>2ª Digitação DDS23 NDS23</p>
----------------------------	---	---------------------------------------	---

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PARTICIPANTE, ESTE QUESTIONARIO DEVERÁ SER DESTACADA PELO GESTOR DO PROJETO OU INVESTIGADOR PRINCIPAL DEPOIS DA ENTREVISTA E ANTES QUE OS DADOS SEJAM DIGITADOS. TODOS OS QUESTIONARIOS DO MESMO PACIENTE DEVEM TER UM NUMERO DE IDENTIFICAÇÃO UNICO (IDNO16)

<p>Data da Entrevista: ___/___/___</p>	<p>DATA23: ___/___/___</p>
<p>Iniciais do Entrevistador: _____</p>	<p>ENT23: ____</p>

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	<p>Nº Identificação: _ _ _ _ _ . _ _ </p>	<p>IDNO16 _ _ _ _ _ . _ _ </p>
1.2	<p>Data de Nascimento (dd/mm/aa): ___/___/___</p>	<p>DATNAS23: ___/___/___</p>
1.3	<p>Sexo: <input type="checkbox"/> 1 Masculino <input type="checkbox"/> 0 Feminino</p>	<p>SEX23 _ </p>
1.4	<p>Seguimento:</p> <p><input type="checkbox"/> 1 Consentiu <input type="checkbox"/> 2 Recusou <input type="checkbox"/> 3 Não encontrado</p> <p><input type="checkbox"/> 4 Mudou-se <input type="checkbox"/> 5 Faleceu <input type="checkbox"/> 6 Mentalmente incapaz</p>	<p>SOROA23 _ </p>

<p>A. Em caso de mudança, Mudou-se para casa localizada dentro da área de estudo? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA <input type="checkbox"/> 9 NS</p> <p>B. Se sim, Novo endereço: _____</p> <p>Achou a casa dentro da área? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>Casano16 _ _ _ _ _ </p>	<p>SEG23 _ </p> <p>ACH23 _ </p> <p>NEWID23 _ _ _ _ </p>
--	--

**HISTÓRIA NATURAL DA LEPTOSPIROSE URBANA:
Questionário sobre exposições a nível individual**

Etiqueta	Codificado	1ª Digitação	2ª Digitação
	DCOD23 NCOD23	DD23 ND23	DDS23 NDS23
Data da Entrevista: ___/___/___		DATA23: ___/___/___	
Iniciais do Entrevistador: _____		ENT23: ___	

I. Dados demográficos:

1.1	Nº Identificação: _ _ _ _ _ . _ _	IDNO16 _ _ _ _ . _ _
1.2	<p>Até que série você estudou?</p> <p><input type="checkbox"/> 0 Nunca foi à escola <input type="checkbox"/> 1 1º grau incompleto</p> <p><input type="checkbox"/> 2 1º grau completo <input type="checkbox"/> 3 2º grau incompleto</p> <p>Série: _____</p> <p><input type="checkbox"/> 4 2º grau completo <input type="checkbox"/> 5 Universidade</p> <p>Grau: _____</p>	<p>ESTUDO23 _ </p> <p>SERIE23 _ </p> <p>GRAU23 _ </p>
1.3	Você tem carteira de identidade (RG)? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim	RG23 _

1.4	Você tem CPF?	<input type="checkbox"/> 0 Não	<input type="checkbox"/> 1 Sim	CPF23 _
-----	---------------	--------------------------------	--------------------------------	-------------

II. História de FEBRE:

2.1	Quantos episódios de febre alta você teve desde a última coleta ? ___/___/___ _ _ número de episódios	VEZ23	_ _
2.2	Procurou atendimento médico em algum dos episódios? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA Se sim, A. Em quantos episódios? _ _ B. Onde procurou atendimento para o episódio mais grave? Emergência <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim qual _____? Posto de Saúde <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim qual _____? Hospital <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim qual _____? Clínica Particular <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim qual _____? <input type="checkbox"/> 8 NSA C. Qual foi o diagnóstico final? <input type="checkbox"/> 1 Dengue <input type="checkbox"/> 2 Gripe ou outra virose <input type="checkbox"/> 3 Leptospirose <input type="checkbox"/> 4 Outro <input type="checkbox"/> 8 NSA <input type="checkbox"/> 9 NS D. Quantos dias O Sr(a) ficou de cama? _ _	PAPO23	_
		QTAT23	_ _
		LOCALEM23	_
		LOCALPOS23	_
		LOCALHOS23	_
		LOCALCLIN23	_
		FDXL23	_
		CAMA23	_ _

III. História de Leptospirose

3.1 O Sr (a) teve leptospirose ou a “doença do rato” desde a última coleta de sangue (___/___/___) ? 0

Não 1 Sim

Se Sim:

A. Mês: |

Ano: |

B. O Sr (a) foi hospitalizado?

0 Não 1 Sim

8 NSA

C. Nome do hospital: _____

D. N° LVIGI ||

(NÃO PREENCHER)

ANTES23

ANTESQ23 /___/___

ANTHO23

LVIGI: |

3.2 Alguém em sua casa teve **leptospirose** desde a última coleta de sangue?

0 Não 1 Sim

Se Sim:

A. Quem?

B. Mês: |

Ano: |

C. N° LVIGI ||

(NÃO PREENCHER)

D. N° L16 ||

(NÃO PREENCHER)

CAANT23

CAANTQ23 /___/___

LVIGI: |

NL1623: |

IV. História de dengue

4.1 O Sr(a) teve dengue depois da última coleta de sangue? Não Sim

Se Sim:

A. Mês: |_|_|

Ano: |_|_|_|_|

B. Procurou atenção médica?
 Não Sim NSA

Se Sim:

A. Qual foi o diagnóstico?

B. Qual local?

DEN23

ADEN23 |_|_|/|_|/|_|

DENMED23

DXDEN23 _____

LOCDEN23 _____

IDNO16 |_|_|_|_|_|_|.|_|_|

V. História de vacinação

5.1 O Sr (a) tem o cartão de vacinas para eu verificar as vacinas que o sr. já tomou?
 Não

Sim

Foi vacinado contra febre amarela desde a ultima coleta?
 Não

Sim NS

Se foi visto no cartão, preencher a data da vacina para febre amarela:
 |_|_|/|_|/|_|_|_|

VAC23

FA23

DFA23 |_|_|/|_|/|_|

VI. Ocupação

6.1 Estuda ou estudou desde a última coleta de sangue? Não Sim

É dona de casa? Não Sim

ESTUD23

DCAS23

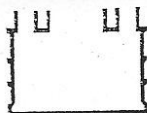
APOS23

	<p>É aposentado? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>O Sr (a) trabalha ou trabalhou COM a carteira de trabalho assinada desde a última coleta? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>O Sr (a) trabalha ou trabalhou SEM a carteira de trabalho assinada desde a última coleta? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>Quanto você ganha por mês? _ _ _ _ reais</p>	<p>CCART23 <input type="checkbox"/></p> <p>SCART23 <input type="checkbox"/></p> <p>REND23 _ _ _ _ _ reais</p>
6.2	<p>Se trabalha ou trabalhou,</p> <p>O local do trabalho é em casa ou em outro lugar? <input type="checkbox"/> 0 Outro lugar <input type="checkbox"/> 1</p> <p>Casa <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>Trabalha ou trabalhou em Pau da Lima? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1</p> <p>Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>TRBCASA23 <input type="checkbox"/></p> <p>TRBAI23 <input type="checkbox"/></p>
6.3	<p>Se trabalha ou trabalhou desde última coleta de sangue, qual atividade desempenhada:</p> <p>A. Trabalha com esgoto <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>B. Pedreiro /construção <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>C. Vendedor ambulante <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>D. Gari <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>E. Mecânico, chapista ou maquinas <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>F. Outro <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>PRESG23 <input type="checkbox"/></p> <p>PEDR23 <input type="checkbox"/></p> <p>VAMB23 <input type="checkbox"/></p> <p>GARI23 <input type="checkbox"/></p> <p>MECAN23 <input type="checkbox"/></p> <p>OUTRO23 <input type="checkbox"/></p>

VII. Exposições		
7.1	<p>Desde o início da época de chuva neste ano, na Semana Santa, o Sr (a) teve contato:</p> <p>Com lama,</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>CLAMD23 _ </p> <p>CLAMT23 _ </p>
7.2	<p>Com lixo,</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>CLXD23 _ </p> <p>CLXT23 _ </p>
7.3	<p>Com água de alagamento na época de chuva,</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>CAALAD23 _ </p> <p>CAALAT23 _ </p>
7.4	<p>Com água de esgoto,</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>CAESGD23 _ </p> <p>CAESGT23 _ </p>
7.5	<p>Cavou dentro do esgoto</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>ESGCAVD23 _ </p> <p>ESGCAVT23 _ </p>
7.6	<p>Retirou lixo de dentro do esgoto</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p><input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>ESGLIXD23 _ </p> <p>ESGLIXT23 _ </p>
7.7	<p>Desentupiu o esgoto da rua? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p>	<p>ESGRUA23 _ </p>
VIII. Reservatórios		
8.1	<p>O Sr (a) vê ratos</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>RATD23 _ </p> <p>RATT23 _ </p>

8.2	<p>Quantos ratos o Sr (a) viu de uma vez só</p> <p>A. Perto de casa? <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>B. No trabalho? <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>RD23 <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p>RT23 <input type="text"/> <input type="text"/></p>
8.3	<p>O Sr (a) vê ratos durante dia</p> <p>A. Perto de casa? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p> <p>B. No trabalho? <input type="checkbox"/> 0 Não <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 8 NSA</p>	<p>QRATD23 <input type="text"/></p> <p>QRATT23 <input type="text"/></p>

Anexo VI: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM
– FIOCRUZ



FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 06/2002

Protocolo : 89

Projeto de Pesquisa: "História Natural da Leptospirose Humana"

Pesquisador Responsável : Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Instituição ou Departamento: CPqGM/Fiocruz/LPBM

Considerações:

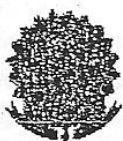
Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas às pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

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

Salvador , Bahia, 11 de abril de 2002

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

Anexo VII: Parecer do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 535/2003

Registro CONEP : 7528 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP = 89

Processo nº 25000.0228410/2003-03

Projeto de Pesquisa : " História Natural da Leptospirose Urbana "

Pesquisador Responsável : Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Instituição: Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ / BA

Área Temática Especial : Pesquisa com cooperação estrangeira

Objetivos

- 1- Determinar o impacto da Leptospirose urbana em nível comunitário e identificar determinantes para a aquisição de infecção e progressão para doença severa.
- 2- Determinar, prospectivamente, se as respostas imunológicas adquiridas durante a infecção anterior protegem contra a re-infecção por cepa de *Leptospira* patogênica.

Sumário

Serão selecionados sete setores considerados de alta incidência de Leptospirose dentro de uma favela (Pau da Lima) na cidade de Salvador, Bahia. Inicialmente será feito um estudo de campo avaliando os riscos populacionais e serão selecionados de 9000 sujeitos numa coorte de base populacional com o propósito de obter um número suficiente de casos severos durante o período de quatro anos. Durante um período de cinco anos, a vigilância epidemiológica do Hospital de referência para a região irá notificar os casos severos de leptospirose dentro da coorte estudada. Será constituído, também, um sub grupo de 600 indivíduos, dentro da coorte estudada, que será submetido a testes (serologias) para leptospiroses quatro vezes ao ano, durante os cinco anos. Por fim, serão comparados todos os indivíduos que foram infectados com aqueles que desenvolveram formas severas da doença. A coorte de sujeitos será escolhida com base nos seguintes critérios: a) vizinhança com casos previamente notificados de leptospirose e, b) uma população predominantemente masculina (80%), dadas às características epidemiológicas da doença. Serão excluídos os pacientes menores de 5 anos de idade, maiores de 95 anos e aqueles que não assinarem o TCLE. Os sujeitos receberão visita domiciliar que irá avaliar as características demográficas, possibilidade de infecções prévias por leptospiroses ou doenças febris agudas, exposições ambientais de risco e fontes de contaminação peri-domiciliar.

Considerações

O presente estudo foi enviado à CONEP em 19/08/2002, com parecer (datado de 07/06/2002) do CEP da Universidade Federal do Rio Grande do Norte cuja cópia foi , também, anexada a este protocolo. Foi apresentado pelo pesquisador daquela universidade que também participa do estudo. O principal óbice ético identificado quando da análise do protocolo (parecer de Nº 1389/2002 em anexo) a falta de ações preventivas com referência à população estudada, apesar de tratar-se de uma oportunidade única de execução de campanhas preventivas. (Res. CNS 196/96 item III.3 n), que assim dispõe:

- m) garantir que as pesquisas em comunidades, sempre que possível, traduzir-se-ão em benefícios cujos efeitos continuem a se fazer sentir após sua conclusão. O projeto deve analisar as necessidades de cada um dos membros da comunidade e analisar as diferenças presentes entre eles, explicitando como será assegurado o respeito às mesmas;
- n) garantir o retorno dos benefícios obtidos através das pesquisas para as pessoas e as comunidades onde as mesmas forem realizadas. Quando, no interesse da comunidade,

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

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

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

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

Os questionamentos foram respondidos sendo o estudo aprovado

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

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

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

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

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

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


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

As informações enviadas atendem, de modo geral, aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 e 292/98 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Entretanto, recomenda-se o CEP local avaliar o conteúdo e a frequência das ações educacionais junto à comunidade estudada, sem as quais o projeto perde muito do seu sentido.

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

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 24 de abril de 2003



WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Anexo VIII: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade
de Cornell – E.U.A


David A. Behrman and Sanford I. Weill
Medical College

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

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

Date: May 10, 2005

To: Albert Ko, M.D.

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

Re: Continuing Review - Protocol # 0402-247

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

We enclose your consent form stamped accordingly.

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

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

Anexo IX: Protocolo para os dados epidemiológicos: sumário e partes
mais relevantes

História Natural da Leptospirose Urbana: Estudo Longitudinal
Prospectivo em uma Comunidade de Alto Risco Durante
Epidemias Urbanas em Salvador - Bahia

Protocolos
Revisados

Salvador, 10 de Julho de 2007

SUMÁRIO

A. Protocolo. Resumo das Responsabilidades dos Membros da Equipe.....	4
B. Protocolo. Resumo com Fluxograma do Material Coletado no Campo e Divisão da Área do Estudo	12
C. Protocolos de Preparação para Saída da FIOCRUZ:	
1. Protocolo de Solicitação de Material	15
2. Protocolo de Organização das Pastas com Impressos	16
3. Protocolo de Organização do Carro do Projeto	17
4. Protocolo para Manipulação do Carro do Projeto	18
5. Protocolo de Organização dos Materiais/Questionários Utilizados no Campo.....	19
D. Protocolos de Trabalho no Campo	
1. Protocolo para Quando Chegar no Campo	20
2. Protocolo de Identificação dos Domicílios e Indivíduos	21
3. Protocolo de Solicitação do Consentimento Oral	22
4. Protocolo para Executar Questionário Padronizado	23
5. Protocolo de Atividades Após o Trabalho no Campo	25
6. Protocolo para Assinatura da Lista de Presença no Trabalho	25
E. Protocolos de Retorno à FIOCRUZ	
1. Protocolo de Entrega do Material Coletado na FIOCRUZ	27
2. Protocolo de Retorno ao Campo para Correção dos problemas em Questionários	28
F. Protocolos com atividades relacionadas ao banco de dados	
1. Protocolo de Codificação dos Questionários	29
2. Protocolo de Digitação e Validação dos Questionários	30
G. Protocolos com atividades relacionadas ao Arquivo de Material	
1. Protocolo para Arquivar os Questionários	34

I. Protocolos com atividades relacionadas a situações atípicas36

1. Violência
2. Perda de Materiais em Uso
3. Perda de Questionário
4. Acidente
5. Participante Doente

Anexos37

I Lista de Contatos

II Materiais diários imprescindíveis para a coleta de dados epidemiológicos

III Questionários

IV Questionários com Regras

V Definições para o inquérito

VI Planilhas para acompanhamento das atividades no campo

VII Questões Frequentes

VIII Cronograma das Atividades no Campo

RESPONSABILIDADES DE TODOS OS MEMBROS DA EQUIPE, DIRETAMENTE SUPERVISIONADAS PELA GERENTE DO PROJETO (Os nomes, quando listados, estão por ordem alfabética):

Gerente do projeto - Ridalva:

- Elaboração dos questionários, dicionários e bancos de dados;
- Avaliação dos bancos criados e do exato funcionamento do programa de checagem (check);
- Elaboração dos protocolos de atividades que envolvem o desenvolvimento do projeto;
- Impressão dos questionários, cadernos, listas de controle;
- Organização dos cadernos para trabalho no campo;
- Elaboração do cronograma de campo;
- Elaboração do material para treinamento da equipe;
- Treinamento da equipe;
- Coordenação da rotina no campo: horários de trabalho, divisão do material às 8:30h, organização do material para retornar à FIOCRUZ às 17h;
- Elaboração das listas de questionários com problemas no preenchimento em campo e controle do retorno destes já retificados;
- Revisão dos questionários retificados;
- Elaboração da lista de questionários com problemas na codificação e correção dos mesmos;
- Confecção de listagem dos erros por indivíduo e por questionário para conversar com cada membro da equipe;
- Resolução de eventuais problemas ocorridos com a equipe no campo (faltas, necessidade de reorganização das equipes);
- Resolução (quando presente em campo) ou auxílio na resolução (quando estiver ausente do campo) de emergências e urgências ocorridas durante o trabalho no campo;
- Supervisão das atribuições dos membros da equipe durante o trabalho no campo (quando estiver presente);
- *****Em especial: supervisão das atribuições extras de Érica (checagem, todos os dias pela manhã, da pasta de questionários com problemas e distribuição dos mesmos para as equipes; resgate dos questionários com problemas já retificados ao final do dia

de trabalho e sua colocação em pasta apropriada) e Leila (Organização do material do campo para o dia seguinte,

- Supervisão do preenchimento, ao final do dia de trabalho, do número de indivíduos visitados, questionários executados em planilhas para este fim; organização de pasta com os questionários ordenados por equipe para ser transportada à FIOCRUZ);
- Transporte para Pau da Lima das pastas contendo os questionários com problemas no preenchimento;
- Checagem da organização dos questionários executados por ordem de equipe na pasta para transporte dos questionários à FIOCRUZ;
- Transporte diário das pastas contendo os questionários realizados no campo e os questionários retificados (que estavam com problemas e retornaram ao campo) para a FIOCRUZ -NEB;
- Cadastramento dos questionários realizados no campo através da leitura dos códigos de barras no computador LPBM 3107;
- Organização, ao final do dia, dos fichários com os questionários executados no campo (“questionários para a codificação”);
- Organização, ao final do dia, da pasta com os questionários retificados, estes devem ser guardados no armário 15 do NEB;
- Codificação dos questionários;
- Correção de eventuais erros de preenchimento identificados em seus questionários;
- Supervisão geral da interação entre campo e banco de dados: fluxo dos questionários desde o preenchimento no campo até a validação;
- Supervisão da validação;
- Supervisão da elaboração dos arquivos dos questionários físicos e sua inserção nos bancos de dados apropriados;
- Realização das análises e apresentações semanais.

Gerente do dia – Federico, Guilherme, Renato, Ridalva:

- Organização dos cadernos para trabalho no campo;
- Treinamento da equipe, com a gerente;
- Coordenação da rotina no campo: horários de trabalho, divisão do material às 8:30h, organização do material para retornar à FIOCRUZ às 17h;
- Revisão dos questionários retificados;

- Resolução (quando presente em campo) de emergências e urgências ocorridas durante o trabalho no campo;
- Comunicação para a gerente de eventuais problemas ocorridos com a equipe do campo: faltas, necessidade de reorganização das equipes;
- Supervisão das atribuições dos membros da equipe durante o trabalho no campo (quando estiver presente);
- *****Em especial: supervisão das atribuições extras de Érica (checagem, todos os dias pela manhã, da pasta de questionários com problemas e distribuição dos mesmos para as equipes; resgate dos questionários com problemas já retificados ao final do dia de trabalho e sua colocação em pasta apropriada) e Leila (Organização do material do campo para o dia seguinte,
- Supervisão do preenchimento, ao final do dia de trabalho, do número de indivíduos visitados, questionários executados em planilhas para este fim; organização de pasta com os questionários ordenados por equipe para ser transportada à FIOCRUZ);
- Transporte para Pau da Lima das pastas contendo os questionários com problemas no preenchimento;
- Checagem da organização dos questionários executados por ordem de equipe na pasta para transporte dos questionários à FIOCRUZ;
- Transporte diário das pastas contendo os questionários realizados no campo e os questionários retificados (que estavam com problemas e retornaram ao campo) para a FIOCRUZ -NEB;
- Cadastramento dos questionários realizados no campo através da leitura dos códigos de barras no computador LPBM 3107;
- Organização, ao final do dia, dos fichários com os questionários executados no campo (“questionários para a codificação”);
- Organização, ao final do dia, da pasta com os questionários retificados, estes devem ser guardados no armário 15 no NEB;
- Codificação dos questionários;
- Correção de eventuais erros de preenchimento identificados em seus questionários.

OBS.: Todas as faltas devem ser comunicadas imediatamente à gerente do projeto antes do horário do trabalho no campo. Esta deverá reorganizar as equipes e comunicar o fato ao gerente do dia.

Equipe do campo:

Aline:

- Checagem do material da sua dupla no início do dia de trabalho;
- Preenchimento da lista de movimentação diária;
- Identificação dos domicílios e indivíduos no campo;
- Coleta de dados epidemiológicos no campo;
- Correção de eventuais problemas identificados em seus questionários;
- Organização do material da sua dupla no final do dia de trabalho.

Futuras (os) contratadas (os):

- Checagem do material da sua dupla no início do dia de trabalho;
- Preenchimento da lista de movimentação diária;
- Identificação dos domicílios e indivíduos no campo;
- Coleta de dados epidemiológicos no campo;
- Correção de eventuais problemas identificados em seus questionários;
- Organização do material da sua dupla no final do dia de trabalho.

Érica:

- Checagem, todos os dias pela manhã, da pasta de questionários com problemas e distribuição dos mesmos para as equipes;
- Checagem do material da sua dupla no início do dia de trabalho;
- Preenchimento da lista de movimentação diária;
- Identificação dos domicílios e indivíduos no campo;
- Coleta de dados epidemiológicos no campo;
- Correção de eventuais problemas identificados em seus questionários;
- Resgate dos questionários com problemas já retificados ao final do dia de trabalho e sua colocação em pasta apropriada para ser levada à FIOCRUZ;
- Organização do material da sua dupla no final do dia de trabalho.

Leila:

- Organização do material do campo para o dia seguinte (pastas com questionários e cadernos contendo listas, mapas e etiquetas);

- Preencher lista de movimentação diária ;
- Identificação dos domicílios e indivíduos no campo;
- Coleta de dados epidemiológicos no campo;
- Correção de eventuais problemas identificados em seus questionários;
- Preenchimento, ao final do dia de trabalho, do número de indivíduos visitados, questionários executados (consentimentos, recusas, não encontrados, mudanças, falecimentos e mentalmente incapazes) em lista para este fim;
- Organização de pasta com os questionários ordenados por equipe para ser transportada à FIOCRUZ.

Raimunda:

- Checagem do material da sua dupla no início do dia de trabalho;
- Preenchimento da lista de movimentação diária;
- Identificação dos domicílios e indivíduos no campo;
- Coleta de dados epidemiológicos no campo;
- Correção de eventuais problemas identificados em seus questionários;
- Organização do material da sua dupla no final do dia de trabalho.
-

Equipe de digitação e validação dos dados:

Fábio:

- Impressão das etiquetas para os cadernos;
- Supervisão da criação do banco de recepção dos questionários;
- Avaliação e realização diária de cópia dos bancos de dados;
- Realização da primeira digitação;
- Supervisão da segunda digitação.

Frederico:

- Criação do banco de recepção dos questionários;
- Realização da segunda digitação.

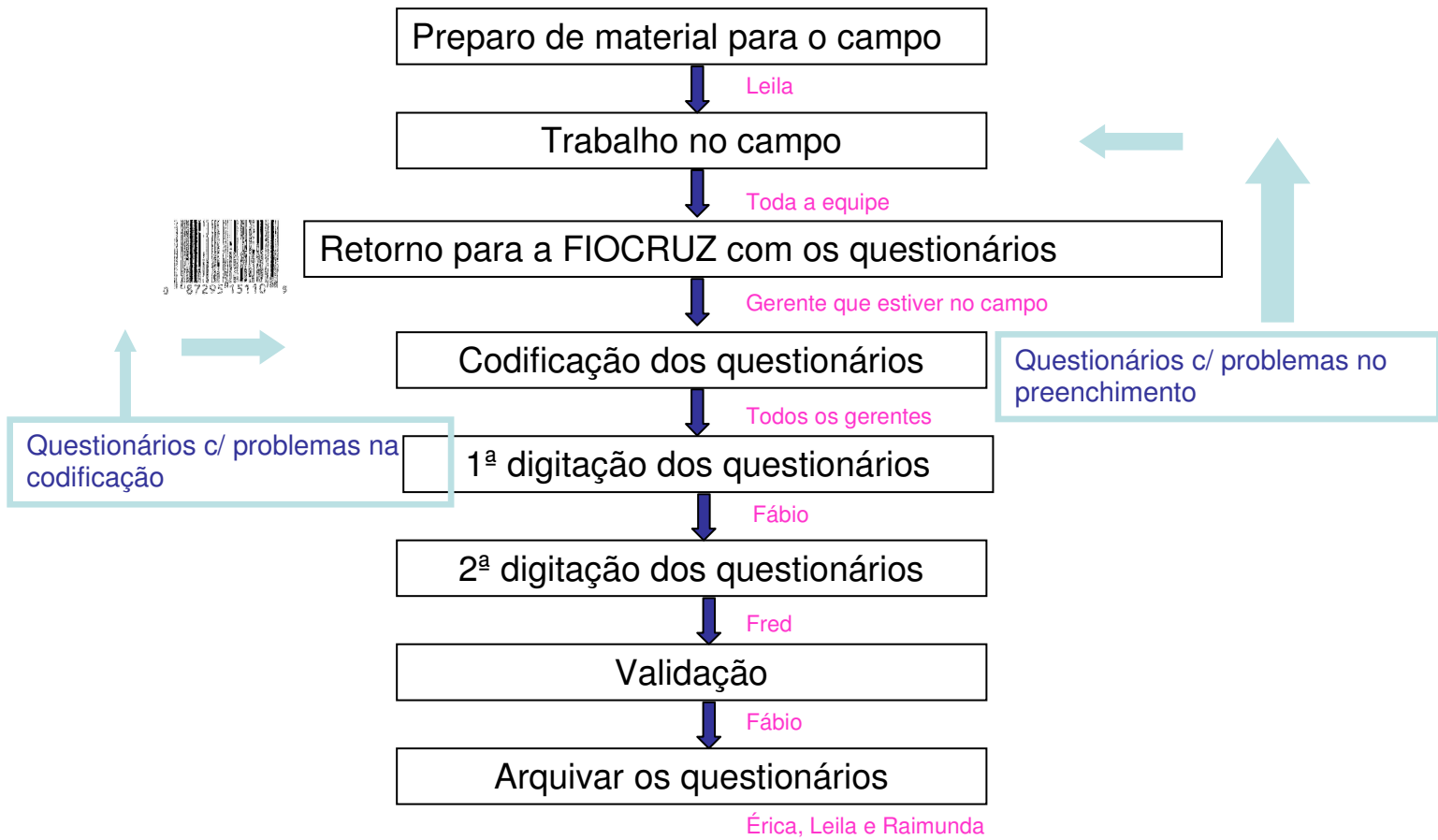
Observação Importante:

Os membros da equipe deverão, quando admitidos, passar por um período de treinamento a variar de uma semana a um mês, conforme necessidade. Todos passarão por avaliações mensais periódicas com o objetivo de manter padrão de qualidade. As quintas-feiras serão realizadas reuniões para discutir objetivos alcançados, dificuldades encontradas, condições e satisfação no trabalho, metas futuras, o que mais for necessário.

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

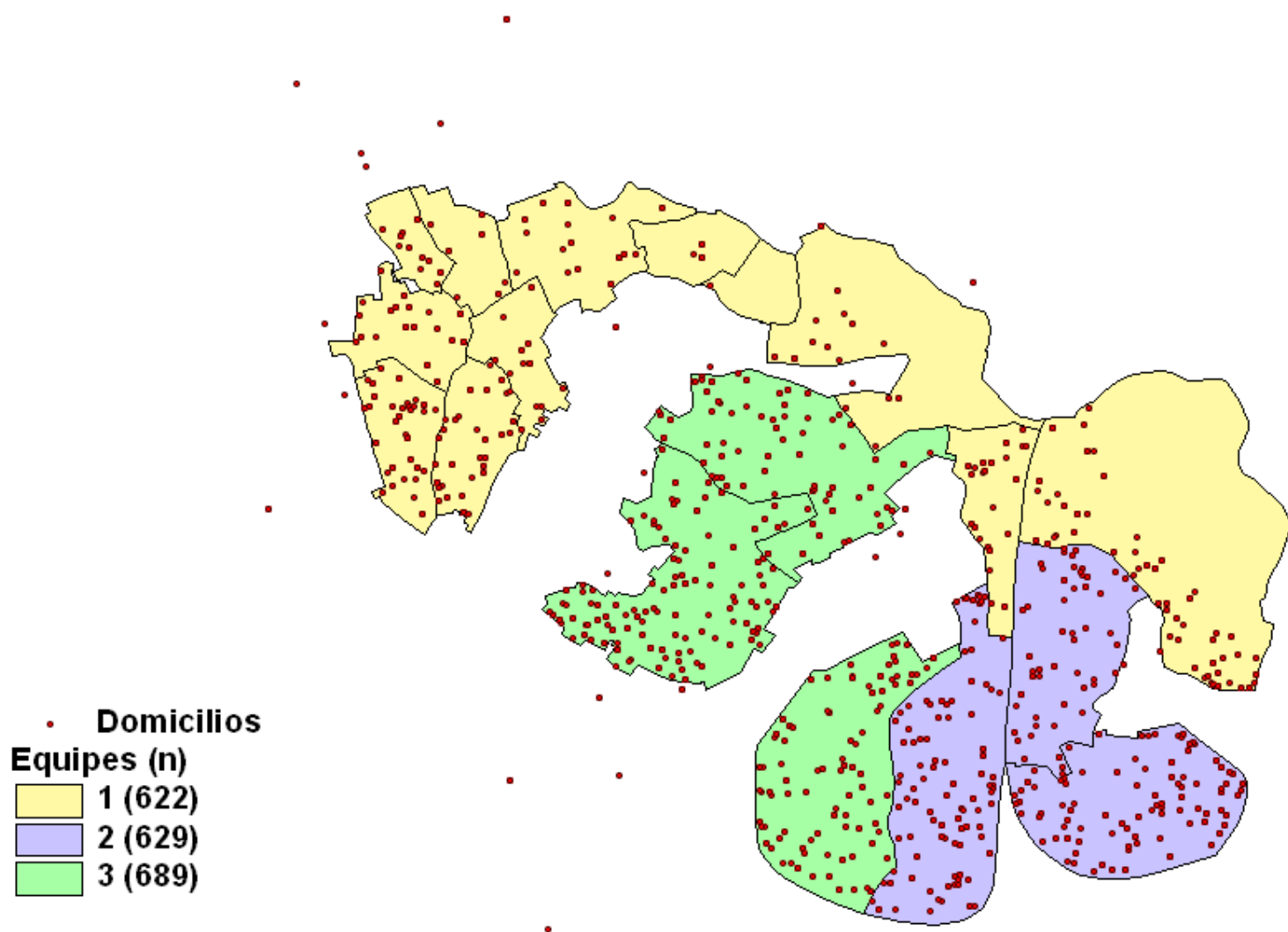
Revisado por Albert Icksang Ko

B - Fluxograma do Material Coletado no Campo



Divisão da Área do Estudo (os gerentes irão se distribuir nas equipes de acordo com cronograma do dia):

Equipes	Equipes	Zonas	Nº de indivíduos
Equipe 1	Leila e companheira	1-12	622
Equipe 2	Raimunda e companheira	13,14 e 18	629
Equipe 3	Érica e Aline	15,16 e 17	689



Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Revisado por Albert Icksang Ko

2 - Protocolo de Identificação dos Domicílios e Indivíduos

Objetivo: Identificar, de forma fidedigna, domicílios e respectivos moradores.

Responsável pela execução: Toda a equipe

Gerente responsável: Renato

Material Necessário: Cadernos com listas dos domicílios, indivíduos, mapas.

Procedimento (s):

- Identificar o primeiro domicílio baseado nas listas de indivíduos e nos mapas;
- identificar os residentes no domicílio, checando nas listas de indivíduos: número do domicílio, número do morador, nome do indivíduo, idade, sexo e ano de nascimento, confirmando estes dados com o morador.

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Revisado por Albert Icksang Ko

4 - Protocolo para Executar Questionário Padronizado

Objetivo: Realizar questionários de forma sistemática e idêntica para todos os entrevistadores e entrevistados.

Responsáveis pela execução: Todos os membros da equipe

Gerente responsável: Ridalva

Material necessário: questionário, caneta, prancheta para apoiar os impressos.

Procedimento (s):

- Colar a etiqueta com código de barras, identificação do domicílio e pessoa no canto esquerdo do questionário, conferindo com a lista de nomes. Cada folha individual deverá portar uma etiqueta;
 - O primeiro questionário a ser feito será o L25 SENS01, com cada participante do estudo (individual);
 - Posteriormente será realizado o questionário KAP com cada participante do estudo, de acordo com as regras em anexo;
 - Em seguida, deve ser realizado o questionário L25EPI01 com os indivíduos que consentirem participação neste seguimento, de acordo com as regras em anexo;
 - O próximo será o questionário L25 DOM01 de acordo com as regras em anexo e com a dona ou o dono do domicílio (um questionário para cada domicílio)
 - Por último, será efetuado o questionário de doença reumática com indivíduos entre 5 e 15 anos (estão marcados em cinza na lista de indivíduos, de acordo com as regras em anexo);
- OBS. Regras para realização de questionário – vide anexo.

Os questionários devem ser guardados dentro das pastas com divisórias, na ordem em que devem ser realizados. E, após a execução, devem ser guardados por ordem de realização.

OBS.

- * Os membros da equipe realizarão em conjunto uma atividade por vez (cada questionário);
- * Questionários serão obtidos com autorização verbal de uma pessoa maior de 18 anos que esteja presente no domicílio;
- * O questionário de dados sensíveis (IND) será preenchido se a pessoa aceitar, se for mudança ou recusa. Não será preenchido em caso do indivíduo não ser encontrado;

* Ao final da entrevista deve controlar-se que todos os campos fiquem preenchidos.

OBS.: Em cada dupla, para cada domicílio, um (a) será responsável pela execução do questionário e o (a) outro (a) estará auxiliando através da colocação das etiquetas e da checagem do correto preenchimento dos questionários. Os papéis devem se alternar continuamente durante o dia de trabalho.

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Revisado por Albert Icksang Ko

F – Protocolos de atividades relacionadas ao banco de dados

1 - Protocolo de Codificação dos Questionários

Objetivo: Codificar, de forma efetiva, os questionários que serão digitados.

Responsável pela execução: Todos os gerentes

Gerente responsável: Ridalva

Material necessário: questionários, caneta.

Procedimento (s):

- Pegar, todas as tardes, os questionários no fichário identificado como “L25 – Questionário para codificação”;
- Codificar os questionários executados, de acordo com protocolo anexo;
- Datar e assinar os questionários;
- Colocar os questionários codificados na pasta “L25 - Questionário para primeira digitação”;
- Ao final da codificação diária, estes serão separados em fichário específico (“Questionários com problemas no preenchimento”) para serem levados ao campo no dia seguinte.

Nas reuniões de quinta-feira, a gerente mostrará todos os erros cometidos para cada membro da equipe e serão discutidas regras e estratégias para evitar estes erros novamente.

OBS. Regras para codificação – vide anexo

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Revisado por Albert Icksang Ko

2 - Protocolo de Digitação e Validação dos Questionários

Objetivo: Digitar corretamente os questionários.

Responsáveis pela execução: Fábio e Frederico.

Gerente responsável: Ridalva

Material necessário: computador com bancos de dados, questionários.

Procedimento (s):

* O primeiro digitador deverá pegar os questionários na pasta “L25 - Questionários para primeira digitação”,

- Conferir se os questionários estão devidamente codificados e assinados pelo codificador;
- Inserir os dados nos bancos específicos: Z:\Lepto\L25\BANCO DE DADOS\L25IND01, L25DOM01, L25EPI01;
- Assinar e datar no local escrito “primeira digitação”;
- entregar questionários e fichas para o segundo digitador em uma pasta escrito “L25 - Questionários para segunda digitação”.

* O segundo digitador também deverá inserir os dados;

- Assinar e datar no local escrito “segunda digitação”;
- Colocar fichas com questionários na pasta “L25 - Questionário para arquivar”;
- Os questionários devem ser arquivados primeiramente em **fichários por ordem numérica** para facilitar sua validação;
- Fábio fará a validação dos dados posteriormente;
- Por último, os questionários devem ser arquivados, por ordem numérica em armários e a chave fornecida a Emanuel/Salvatore que serão responsáveis por guardá-las.

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Revisado por Albert Icksang Ko

G - Protocolos de atividades relacionadas ao Arquivo de Material
1 - Protocolo para Arquivar os Questionários

Objetivo: Arquivar corretamente os questionários.

Responsável pela execução: Érica, Leila e Raimunda

Gerente responsável: Ridalva

Material necessário: questionários e pastas nos armários

Procedimento (s):

- Pegar os questionários no fichário “L25 - Questionário para arquivar”;
- Distribuir os mesmos nas pastas correspondentes a cada participante localizadas em armários;
- Trancar os armários e entregar a chave a Emanuel.

Elaborado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh

Atualizado por Ridalva Dias Martins Felzemburgh em 21/06/2007

Revisado por Albert Icksang Ko

Anexo X: Protocolo de Coleta de Sangue



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

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

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

Protocolo de Coleta de Sangue

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

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

Responsáveis pela execução: Ana Carla, Analéa e Ridalva

Material Necessário:

- * caixa para coleta com dispositivo de segurança,
- * galeria para tubos de coleta,
- * garrote,
- * bolas de algodão,
- * álcool a 70%,
- * tubos descartáveis para coleta sem E.D.T.A.,
- * adaptador para agulha,
- * agulhas descartáveis 21G para vacutainer,
- * butterfly descartável número 23,
- * seringas descartáveis de 10ml,
- * agulhas 25X8,
- * caneta para escrita em tubos,
- * recipiente apropriado para descarte de material pérfuro-cortante.

**Procedimento:**

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

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

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

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

Anexo XI: Protocolo para processamento e recepção das amostras



PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO E RECEPÇÃO DAS AMOSTRAS

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

I. Palavras chave:

Processamento
Recepção
amostras

II. Propósito:

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

III. Materiais:

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

IV. Equipamentos:

- Centrífuga de alta rotação.

V. Descrição das atividades 1 – Processamento

Confecção de etiquetas e identificação de Tubos Matrix e eppendorfs:

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



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

Processamento dos Soros:

- Centrifugar Amostras 1500rpm / 10 minutos.
 - Organizar tubos, após centrifugados, em rack apropriada.
 - Aliquotar soros, seguindo a ordem de organização dos tubos.
-
- Após aliquotagem, os soros aliquotados e os coágulos serão armazenados em freezer, segundo a descrição de congelamento abaixo.

VI. Descrição das atividades 2 – Congelamento de amostras

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

- a) 05 de 1,4mL p/ estocagem no Freezer à (-20°C).
- b) 01 de 0,6mL em freezer à -20°C p/ realização de Testes Sorológicos (MAT e ELISA).
- c) 01 de 0,6mL em freezer à -70°C p/ realização de Testes de Biologia Molecular (PCR).

- Após completar a caixa de congelamento dos tubos Matrix e dos eppendorfs, fazer mapa das caixas em fichas específicas e arquivar.
- As fichas de identificação de pacientes deverá ter os campos correspondentes a data, horário de recepção e processamento, congelamento das amostras, nº da caixa, nº de alíquotas e nº do freezer na qual a amostra foi armazenada, preenchidos.

Anexo XII: Prova de microaglutinação para soroprevalência (MAT)

PROVA DE MICROAGULUTINACAO (MAT) PARA SOROPREVALÊNCIA

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

0. Palavras chave:

Microaglutinação

Leptospira

Soroprevalência

I. Raciocínio:

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

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

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

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

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

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

II. Propósito:

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

III. Materiais:

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

IV. Reagentes:

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

V. Equipamentos:

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

VI. Recomendações acerca de materiais, reagentes e equipamentos



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

VII. Descrição das atividades 1 – Preparo dos soros

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

VIII. Recomendações à cerca do procedimento 1

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

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

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

X. Recomendações à cerca do procedimento 2

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



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

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

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

XII. Descrição das atividades 4 - Leitura do teste

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

XIII. Recomendações à cerca do procedimento 4

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

• Controles da reação:

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

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

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

XIII. Responsáveis

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

XIV. Anexos

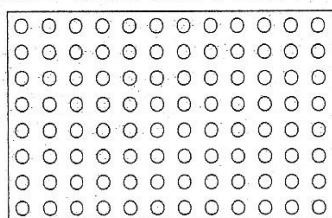
Anexo	Nome	Código
1	Figura ilustrativa da disposição e distribuição dos soros e dos antígenos na placa de microaglutinação	Não se aplica
2	Tabela modelo para anotação dos resultados da leitura	Não se aplica

XV. Referências

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

Anexo 1

SORO 1 SORO 2 SORO 3 SORO 4



Disposição dos soros 100 µl

Disposição dos antígenos 50 µl



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

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

Anexo 2

Soros	L1 130			C/ Utrecht			Cop./ M20			Patoc/ patoc			Ict./ verdun			Aut./ aikiyami		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		
T																		
Título																		