

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

GLÓRIA REGINA DE GÓIS MONTEIRO

EFETIVIDADE DA DOXICICLINA NA PROFILAXIA CONTRA LEPTOSPIROSE

**NATAL/RN
2003**

GLÓRIA REGINA DE GÓIS MONTEIRO

EFETIVIDADE DA DOXICICLINA NA PROFILAXIA CONTRA LEPTOSPIROSE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DO
CENTRO DE BIOCÍCIAS DA UNIVERSIDADE
DO RIO GRANDE DO NORTE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA O TÍTULO DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA.

ORIENTADORA: PROF SELMA MARIA BEZERRA JERÔNIMO

**NATAL
2003**

Catálogo da publicação na fonte. UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede
Divisão de Serviços Técnicos

Monteiro, Glória Regina de Góis
Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra leptospirose / Glória
Regina de Góis Monteiro. _ Natal (RN), 2003. 68 p.:il.

Orientadora: Selma Maria Bezerra Jeronimo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Zoonoses – Tese. 2. epidemiologia – Tese. 3. *Leptospira*– Tese.
4. Doxiciclina– Tese. 4. Quimioprofilaxia – Tese. 5. ELISA – Tese. I.
Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616.993

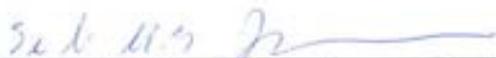
GLÓRIA REGINA DE GÓIS MONTEIRO

EFETIVIDADE DA DOXICICLINA NA PROFILAXIA CONTRA LEPTOSPIROSE

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 27 de junho de 2003.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Selma Maria Bezerra Jerônimo – UFRN



Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos – UFRN



Prof. Dr. Luís Bezerra de Carvalho Júnior – UFPE

NATALRN
2003

LISTA DE FÍGURAS

1	Casos notificados de leptospirose e índice pluviométrico na região oeste do Rio Grande do Norte, 1985/1986	28
2	Mapa do Rio Grande do Norte	34
3	Local do cultivo do arroz do município de São Miguel	35

TABELAS**LISTA DE TABELAS****Pág**

1	Freqüência de agricultores de arroz por sítios do Município de São Miguel/RN.....	36
2	Freqüência de agricultores de arroz de acordo com o sexo.....	37
3	Distribuição dos agricultores de arroz por faixa etária.....	37
4	Distribuição dos agricultores de arroz por escolaridade.....	37
5	Percentual de indivíduos com antecedente de febre do rato e febre.....	37
6	Taxa de soroprevalência entre os agricultores antes do período da colheita do arroz.....	38
7	Taxa de soroprevalência entre os agricultores após o período da colheita do arroz.....	38
8	Taxa de soroconversão entre os agricultores de arroz.....	38
9	Teste de Mac Naman.....	39
10	Soropositividade entre os agricultores de arroz que utilizaram proteção dos membros inferiores contra a leptospirose.....	39
11	Análise da efetividade da doxiciclina.....	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO-----	A
ANEXO-----	B

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que afeta, acidentalmente, o homem tendo como reservatórios animais domésticos e silvestres. O agente causal, a *Leptospira interrogans*, é transmitido ao homem, principalmente, por contato indireto com água ou solo contaminados com a urina de ratos. O espectro clínico inclui infecção subclínica, doença febril anictérica e doença severa potencialmente fatal conhecida como síndrome de Weil. Em países desenvolvidos é descrita, quase sempre, associada à atividade profissional ou recreativa, enquanto nas regiões em desenvolvimento epidemias também são associadas a enchentes. Nestas áreas, medidas tradicionais de prevenção da doença, como, melhoria das condições sanitárias, proteção individual e controle de roedores são difíceis de serem implementadas por problemas econômicos e pela baixa aceitação da comunidade. Por outro lado, até o momento não há uma vacina eficaz para uso em humanos, mas, a quimioprofilaxia com doxiciclina tem sido apontada na literatura como uma alternativa adequada pra prevenção pré e pós-exposição de indivíduos sob risco por determinado período de tempo. Epidemias de leptospirose têm sido relatadas na área rural do Rio Grande do Norte, Brasil desde 1985, atingindo lavradores de arroz que apresentam a forma anictérica da doença. Tais epidemias causam forte impacto econômico-social na região por incapacitarem agricultores durante a época da colheita do arroz e aumentarem os gastos da saúde. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da doxiciclina na proteção contra infecção por *Leptospira* em agricultores de arroz do município de São Miguel/RN, cuja taxa de soroprevalência antes da intervenção foi de 14,2%(n=22). Avaliação sorológica pré e pós-colheita realizada em 61 indivíduos demonstraram uma taxa de soroconversão de 8,8% (n=34) nos que utilizaram a droga e de 11,1%(n=27) naqueles que não utilizaram. A análise estatística revelou um risco adicional de aquisição da infecção de 29% entre os agricultores que não utilizaram a doxiciclina, além de um risco adicional de 30% de adquirir a infecção naqueles indivíduos que trabalharam descalços. A taxa de adesão a quimioprofilaxia foi de apenas 55,7%. A doxiciclina pode ser uma medida efetiva na profilaxia pré-exposição de lavradores de arroz, entretanto, uma amostra maior composta por indivíduos que apresentem maior aderência à terapia é necessária para uso efetivo deste antibiótico como profilaxia da infecção por *Leptospira* nessa região.

SUMMARY

Leptospirosis is a worldwide zoonosis of considerable medical and economical importance that affects humans in both urban and rural contexts, as well as domestic animals and wild fauna. *Leptospira interrogans* is the causative agent and is transmitted to humans by indirect contact with contaminated soil or water. The clinical syndromes include sub clinical infection, self-limited anicteric febrile illness, and severe and potentially fatal illness, known as Weil's syndrome. In developed countries, leptospirosis is related to occupational or recreational activities while in developing countries, outbreaks occur during floods. In those regions, traditional strategies to prevent the transmission are difficult to be implemented because of costs and lack of community acceptance. In addition, no efficient vaccine is available for human use. Several studies have suggested that chemoprophylaxis with doxycycline pre and post-exposure may be effective to prevent leptospirosis. Leptospirosis has been reported in rural areas of the State of Rio Grande do Norte, Brazil since 1985 in rice farmers who present the anicteric illness. The disease causes great social and economic impact. The study was conducted in São Miguel where an epidemic of leptospirosis in rice farmers was reported. The main objective was to determine the efficacy of doxycycline in preventing *Leptospira* exposure. A seroprevalence of leptospirosis in the population studied before and after harvest was 14.2% (n=22) and 16.6% (n=27) respectively. Anti-*Leptospira* serology was determined for 61 subjects in two instances, pre and post-exposure to potential contaminated water. There was an increased risk of 29.0 per cent in acquiring infection for individuals that did not use doxycycline. In addition, an increased risk of 30.0 % was observed in farmers who did not use protection when exposed to *Leptospira*. The adherence to preventive chemoprophylaxis was 55.7%. Therefore doxycycline, under specific circumstances appears to be an effective alternative to protect against leptospirosis infection. A large sample composed of individuals to adhere to preventive therapy is needed to define time, dosage and length of use of doxycycline in this area.

SUMÁRIO

			Pág
1.0		Introdução	13
	1.1.	Aspectos Gerais	13
	1.2	Agente etiológico	13
	1.3	Aspectos fisiopatológicos e imunológicos	14
	1.4	Manifestações clínicas	18
	1.5	Diagnóstico	20
	1.6	Tratamento	22
	1.7	Epidemiologia	23
	1.8	Profilaxia	28
2.0		Objetivos	31
3.0		Material e Métodos	32
	3.1	Localização do estudo e população	32
	3.2	Desenho do estudo	32
	3.3	Tamanho da amostra	33
	3.4	Coleta e processamento das amostras	33
	3.5	Sorologia	33
4.0		Resultados	36
5.0		Discussão	40
6.0		Conclusões	44
7.0		Referências	45
8.0		Anexos	A e B

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS	Lipopolissacarídeo
PMNs	Neutrófilos polimorfonucleares
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
PAF	Fator ativador plaquetário
GLP	Glicolipoproteína
TRIS	Tris(hidroxi)aminometano
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
CD69	Molécula indutora de ativação
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR
NO	Oxido nítrico
CD14	Receptor de LPS
TLR2	Receptor-2 semelhante a Toll
TLR4	Receptor-4 semelhante a Toll
IgG	Imunoglobulina G
C3	Fração 3 do complemento
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
INF γ	Interferon gama
TH1	T helper 1
FPGL	Formas Pulmonares Graves da Leptospirose
MAT	Teste de microaglutinação
OMS	Organização Mundial de Saúde
ELISA	Ensaio imunoenzimático
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação de polimerização em cadeia
LipL-41	Lipoproteína de membrana externa
OmpL1	Porina de membrana externa

Dedico esta dissertação a Rafaela e Marina Leal, pelos momentos ausentes durante a elaboração deste trabalho e um imenso amor motivo que me fez continuar nesta jornada

A meus pais e irmãos

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

A leptospirose é uma patologia infecciosa febril aguda, potencialmente, grave de importância econômica considerável, causada por espiroquetas patogênicos do gênero *Leptospira* (PARK, 1999). A doença foi primeiramente descrita por Larrey em 1880 e ainda nesta década, Adolf Weil descreveu a síndrome icterica em pacientes que apresentavam icterícia, nefrite e fenômenos hemorrágicos (FERREIRA, ÁVILA, 2001).

Espiroquetas foram visualizados em túbulos renais humanos, através da impregnação pela prata, por Stimson em 1907, que os denominou *Spirocheta interrogans* por apresentarem terminação em gancho (LEVETT, 2001). No ano seguinte, a demonstração destes agentes no tecido hepático por Inada e Ido permitiu a associação do patógeno com a doença (KOBAYASHI, 2001). No Brasil, as primeiras publicações foram de Bentes, Aragão e McDowell, em 1917, no Rio de Janeiro. A partir de então a doença vem ocorrendo em todas as regiões do País.

1.2. Agente Etiológico

O agente causal da leptospirose pertence à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* que atualmente é dividida em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema*, e *Turneria* (FAINE, ADLER, BOLIN, 1994). O gênero *Leptospira* compreende duas espécies, *L. interrogans*, incluindo toda linhagem patogênica e a *L. biflexa*, contendo a linhagem saprofítica isolada do meio ambiente (LEVETT, 2001). As leptospirosas são individualizadas em sorovares ou sorotipos com base nas suas características antigênicas, especialmente a heterogeneidade da molécula do lipopolissacarídeo (LPS) (LEVETT, 2001). Dois ou mais sorotipos são classificados em sorogrupos, também com base nas suas semelhanças antigênicas, tendo sido descritos mais de 180 sorotipos e 19 sorogrupos de *L. interrogans* (PLANK, DEAN, 2000). Através de análise do genoma, o gênero *Leptospira* foi atualmente dividido em 17 genomespécies (PEROLAT, *et al*, 1988; BRENNER, *et al* 1999), podendo sorotipos patogênicos e não patogênicos estar incluídos em uma mesma espécie (LEVETT, 2001).

Leptospirosas são microorganismos aeróbios obrigatórios, helicoidais, flexíveis e móveis, medindo usualmente 6 a 20µm de comprimento (LEVETT, 2001). Apresentam membrana citoplasmática e parede celular envolvida por uma membrana externa contendo

porinas que permitem trocas de soluto entre o espaço periplasmático e o ambiente. Água salina e ambiente seco desorganizam este envelope (PLANK, DEAN, 2000). Sua forma helicoidal fina e os seus flagelos periplasmáticos viabilizam a penetração nos tecidos animais. Nos tecidos e no interior de fagócitos, podem assumir forma esférica ou granular (GOLDSTEIN, 1988). Estes espiroquetas apresentam, à semelhança das bactérias gram-negativas, um LPS (FAINE, 1986) com menor atividade endotóxica (SHIMIZU, *et al*, 1987), entretanto, altamente imunogênico e potente ativador de macrófagos e células B. Dos seus constituintes, os lipídeos têm um importante papel na atividade biológica da leptospira. Estudos em animais demonstraram que o LPS determina letalidade em camundongos e pirogenicidade em coelhos (MATSUO, ISOGAI, ARAKI, 2000). Adicionalmente, o LPS tem sido associado à hemorragia e coagulação como demonstrado pela presença de trombocitopenia em animais e humanos infectados com leptospira (EDWARDS, *et al*, 1986).

Para sobrevivência sob a forma livre na natureza as leptospiras requerem algumas condições, tais como, água no pH entre 7,0 e 7,4 e temperatura entre 28 a 30°C, podendo sobreviver em águas estagnadas por meses (FAINE, 1982). Estas bactérias adquirem energia a partir da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, entretanto, não conseguem sintetizar ácidos graxos essenciais a partir do piruvato ou acetato sendo capazes apenas de diminuir cadeias longas e incorporá-los (MURPHY, 1980). As Cadeias longas de ácidos graxos utilizadas como fonte de carbono são metabolizadas por β -oxidação (SMIBERT, 1977). Sais de amônia são importante fonte de nitrogênio, enquanto, aminoácidos e carboidratos não são utilizados como principais fontes energéticas (FAINE, 1982).

1.3. Aspectos fisiopatológicos e imunológicos.

No homem, após penetrarem pelas mucosas íntegras ou pele lesada, as leptospiras atingem a corrente sanguínea e rapidamente alcançam todos os órgãos e tecidos, incluindo líquido e olhos (FEIGIN, 1975). No sangue e nos vários órgãos e tecidos permanecem extracelularmente, entretanto, podem ser visualizadas em células fagocíticas e epiteliais. Nestas últimas, a internalização parece ser um mecanismo de escape do sistema imune diferenciando espécies saprofíticas de patogênicas (MERIEN, *et al*, 1997). Nos tecidos o maior número de espiroquetas concentra-se no fígado seguido das glândulas adrenais e rins (KOBAYASHI, 2001). A sobrevivência e o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a patogenia dependerá do inóculo e da virulência do sorotipo infectante, bem como de fatores

inerentes ao hospedeiro, quais sejam pH local, potencial de oxidação tecidual e presença de nutrientes como eletrólitos e ácidos graxos. Entre os fatores de virulência da leptospira citam-se a indução de apoptose de macrófagos e a ação de hialuronidases, fosfolipases e hemolisinas. A presença de anticorpos e a resposta imune celular do hospedeiro, previamente infectado, com o mesmo ou com outro sorotipo também influenciam na patogênese da doença (FAINE, *et al*, 1999).

Os mecanismos pelos quais a leptospira causa doença não estão bem esclarecidos. As bactérias extracelulares patogênicas causam doenças por indução de inflamação que resulta na destruição tecidual no sítio de infecção e por produção de toxinas que possuem diversos efeitos patológicos. Ao contrário, leptospiras não induzem resposta inflamatória aguda no hospedeiro (PLANK, DEAM, 2000) e são observadas em pequeno número nas lesões sugerindo ser a leptospirose uma doença mediada principalmente por toxinas (ALVES, *et al*, 1991; BARNETT, *et al*, 1999; BRITO, *et al*, 1987). Do ponto de vista patológico, em adição à lesão específica do tecido, como nefrite intersticial e necrose hepática lobular, uma vasculite acompanhada de hemorragia, é vista em todos os tecidos (LOMAR, DIAMENT, TORRES, 2000; NICODEMO, *et al*, 1989).

A aderência à superfície celular é uma propriedade importante na patogenicidade. Aderência de neutrófilos às células endoteliais induzidas por LPS é responsável pela vasculite (DOBRINA, *et al*, 1995; ISOGAI, *et al*, 1997). Este efeito indutor do LPS parece ser mediado pelo fator ativador plaquetário (PAF) uma vez que antagonistas do PAF reduzem a aderência, podendo o PAF ser um fator patogênico na leptospirose (ISOGAI, *et al*, 1997). As alterações ao nível de membranas do endotélio vascular levam a lesões isquêmicas, anóxia e queda da pressão arterial, culminando com morte do tecido lesado. Leptospiras virulentas aderem-se às células epiteliais renais, *in vitro*, sendo essa aderência aumentada através de concentrações de anticorpos homólogos subaglutinantes (BALLARD, *et al*, 1986). Paralelamente, aderência às plaquetas provoca agregação e desenvolvimento de trombocitopenia (ISOGAI, *et al*, 1997).

Dentre os vários antígenos isolados das leptospiras, a glicolipoproteína (GLP) pode aderir-se a células endoteliais e as membranas epiteliais acompanhada de outros depósitos antigênicos, resultando na destruição bacteriana pelo sistema imune (MACEDO-SANTOS, *et al*, 1989; ALVES, *et al*, 1991). Entretanto, a GLP pode conter toxinas potencialmente envolvidas na patogênese da leptospirose como demonstrado pelo bloqueio da bomba de sódio de células epiteliais tubulares renais (YOUNES-IBRAHIM, *et al*, 1995). Na leptospirose experimental, a enzima Na K-ATPASE é inibida, em ensaios *in vitro* com GLP e,

em lesões renais, nos sítios onde há maior concentração de GLP. A ação inibitória parece relacionar-se aos ácidos graxos insaturados, podendo ser este um dos principais mecanismos da disfunção renal, característica da doença (FAINE, *et al*, 1999). Os lipídeos da glicolipoproteína são tóxicos, produzindo lesões necróticas, quando inoculados intradermicamente (LEVETT, 2001). Em experimentos o complexo glicolipoproteico extraído da *L. interrogans* por um tratamento com TRIS-lisozima seguido de precipitação com ácido acético, exerce um efeito tóxico na porção lipídica da membrana celular levando a sua ruptura com extravasamento do conteúdo celular e morte. Admite-se que os ácidos palmitoléico e oléico do espiroqueta se intercalem aos lipídeos da membrana do hospedeiro induzindo a lise celular (VIHN, ADLER, FAINE, 1986). *In vivo*, esta toxicidade é observada pelos efeitos histopatológicos típicos, como infiltrado de macrófagos e células polimorfonucleares (LEVETT, 2001).

A resposta imune do hospedeiro a leptospira está relacionada diretamente aos eventos patológicos da doença. Macrófagos são ativados pelos produtos bacterianos como GLP, LPS e peptidoglicano levando a secreção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), resultando em infiltrado leucocitário nos sítios de infecção. Outro efeito do TNF- α é induzir a apoptose de linfócitos. Além de ser um potente estimulador da produção de citocinas pelos macrófagos, o LPS ativa a via alternativa do complemento resultando em opsonização e fagocitose. O peptidoglicano é mitogênico para células mononucleares que secretam TNF α e são capazes de induzir complemento, contribuindo para resposta do hospedeiro durante a infecção (CINCO, *et al*, 1996).

DIAMENT, 2002 demonstrou que a GLP extraída de *L. interrogans* sorovar Copenhageni induz a ativação celular, *in vitro* e *ex vivo*, de células mononucleares do sangue periférico através da secreção de TNF- α e IL-10 e do aumento da expressão de CD69 em linfócitos e monócitos e, de antígenos HLA-DR em monócitos. Nas mesmas condições, a GLP de *L. biflexa* sorovar Patoc não induziu a ativação celular (DIAMENT, *et al*, 2002), apesar de anteriormente ter sido demonstrado efeito biológico, semelhante ao extraído de leptospira patogênica, como citotoxicidade a fibroblasto, hemaglutinação e crenação de hemácias (VIHN, ADLER, FAINE, 1986). Possivelmente, a liberação de TNF α e IL-10, bem como, o aumento da expressão de CD69, por células mononucleares de sangue periférico quando incubadas com GLP induzem a secreção de mediadores inflamatórios, principalmente prostaglandinas E2 e F1 e leucotrieno B4 e aumento na produção intracelular de óxido nítrico (NO) (DE MARIA, *et al*, 1994), essencial no controle da infecção. O LPS e as lipoproteínas

de leptospiras ativam macrófagos via CD14 e receptor-2 semelhante a Toll (TLR2). É conhecido ser o TLR4 o receptor para o reconhecimento do LPS de bactérias gram negativas, não estando, portanto, envolvido na resposta celular a *L. interrogans* (WERTZ, *et al*, 2001).

Os monócitos ativados secretam TNF α que induz a inflamação local e sistêmica além de IL-1, IL-6 e IL-8 importantes no controle da infecção e, ao mesmo tempo, envolvidas no processo inflamatório (SLIFKA, WHITTON, 2000). Altos níveis de TNF α estão associados à severidade da leptospirose, semelhante ao observado na malária cerebral (HILL, 1996) e, na infecção por *Leishmania* (KARPLUS, *et al*, 2002). Em contraste, apesar dos níveis aumentados de IL-10 na fase aguda, esta citocina não está relacionada com a gravidade da doença. Pacientes com leptospirose menos severa apresentam uma maior taxa de IL-10/TNF α (TAJIKI, NAKAMA, SALOMÃO, 1997).

A imunidade na leptospirose é predominantemente humoral. Imunoglobulinas são produzidas com 2 a 10 dias pós-infecção, dependendo da espécie, da imunidade do hospedeiro e do inóculo. Os anticorpos aderem ao lipopolissacarídeo dos espiroquetas num processo de opsonização preparando-os para serem fagocitados pelas células reticuloendoteliais.

Complexos imunes circulantes são correlacionados com a severidade dos sintomas (GALLI, *et al*, 1985). O aumento na severidade da doença de Weil pode ser resultado de uma intensa resposta imune humoral, uma vez que falência renal, trombocitopenia e complicações pulmonares ocorrem na fase imune (ABDULKADER, *et al*, 2002). Em infecção experimental, observou-se que o antígeno foi localizado no interstício renal enquanto imunoglobulina G (IgG) e complemento 3 (C3) foram depositados no glomérulo e nas paredes dos pequenos vasos sanguíneos (YASUDA, HOSHINO-SHIMIZU, YAMASHIRO, BRITO, 1986). A patogênese de uveíte recorrente em eqüinos parece envolver a produção de anticorpos contra antígenos em tecidos oculares, visto que, a presença de linfócitos B foi detectada na retina de cavalos com uveíte (LUCCHESI, PARMA, 1999; PARMA, *et al*, 1987).

Experimentos em animais levantaram questionamentos quanto ao paradigma de que a imunidade protetora na leptospirose é primariamente humoral. Apesar de anticorpos anti-LPS de leptospira promoverem proteção passiva em alguns modelos animais (JOST, ADLER, VIHN, FAINE, 1986; MASUZAWA, *et al*, 1990), bovinos que receberam vacina pentavalente contra o sorovar hardjo permaneceram susceptíveis à infecção por este sorovar mesmo apresentando altos títulos de anticorpos específicos anti-LPS (BOLIN, ZUERNER, TRUEBA, 1989; BOLIM, CASSELLS, ZUERNER, TRUEBA, 1991). Por outro lado,

polissacarídeos antigênicos obtidos do LPS de leptospira não patogênica, *L. biflexa* patoc 1, mostrou reatividade com antisoro de coelho elicitado pela imunização com várias leptospiros patogênicas sugerindo um efeito protetor do LPS. A similaridade entre os epítomos antigênicos de *L. biflexa* e *L. interrogans* foi confirmada pela MAT e ELISA. Estes resultados sugerem que os antígenos presentes nas superfícies celulares de ambas *L. biflexa* patoc e *L. interrogans* sorovar manilae são muito semelhantes. Consonante com isso, a administração de uma preparação de LPS de *L. biflexa* resulta em resposta protetora em hamster quando desafiados com *L. interrogans* podendo ser utilizada como uma vacina contra a leptospirose causada por diferentes espécies (MATSUO, ISOGAI, ARAKI, 2000). ELLIS, *et al*, 2000 demonstraram recentemente que PBMC de bovinos vacinados contra o sorovar hardjo proliferaram, *in vitro*, quando estimulados com antígenos específicos sugerindo a participação da imunidade celular (ELLIS, *et al*, 2000). Adicionalmente, PBMC de animais vacinados com leptospiros mortas produzem interferon gama (INF γ) quando em cultura com antígeno induzindo uma potente resposta imune TH1 (NAIMAN, *et al*, 2001). A supressão da resposta imune mediada por célula na leptospirose foi relatada anteriormente (RATNAM, *et al*, 1984). A inibição da atividade macrofágica aumenta a susceptibilidade à infecção (ISOGAI, *et al*, 1986).

1.4. Manifestações Clínicas

A leptospirose apresenta amplo espectro de manifestações clínicas em humanos (FARR, 1994). A sintomatologia é conseqüência, como citado anteriormente, de uma pancapilarite generalizada característica da doença (FEIGIN, ANDERSON, 1975). Após um período de incubação variável de três a 15 dias podem ocorrer duas síndromes clínicas distintas, com 90% dos pacientes apresentando uma doença febril anictérica e 10% doença severa com icterícia e manifestações hepáticas e renais (síndrome de Weil) (GUERRANT, *et al*, 1999). Embora mais freqüentemente visto na forma anictérica, ambas as formas, podem seguir um curso bifásico caracterizado por uma fase septicemia e uma fase imune (LEVETT, 2001).

Na forma anictérica a grande maioria das infecções é subclínica ou de baixa severidade e a resolução coincide com o surgimento de anticorpos (LEVETT, 2001). Os indivíduos sintomáticos apresentam na primeira fase, conhecida como fase septicêmica, febre súbita, calafrios, cefaléia, mialgias, erupções cutâneas, náuseas, vômitos, derrame conjuntival

e prostração. Nesta fase as leptospiras podem ser isoladas do sangue, líquido e tecidos (LEVETT, 2001). Seguindo-se a defervescência da febre e demais sintomas, após um a dois dias, inicia-se a fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos. Subseqüentemente, as leptospiras desaparecem do sangue e líquido, mas, podem ainda ser encontrada no rim, urina e humor aquoso (EDWARDS, DOMM, 1960; KELLEY, 1998; TURNER, 1967). Em alguns pacientes a febre retorna associada a sintomas neurológicos como cefaléia, fotofobia, e rigidez na nuca, caracterizando um quadro de meningite asséptica que consiste na principal manifestação clínica desta fase. É na fase imune que as complicações tipo neurite óptica, uveíte, iridociclite, coriorretinite e neuropatia periférica aparecem com maior freqüência. Em 2% dos pacientes é detectada uma uveíte prolongada e recorrente que se inicia vários meses após os sintomas da leptospirose clínica (PLANK, DEAN, 2000).

Diferentemente da forma anictérica, a forma icterica da leptospirose, conhecida como Síndrome de Weil, é geralmente grave. Ocorre em 5% a 15% dos casos e sua mortalidade varia de 5 a 40%. Originalmente descrita em infecções associadas ao sorogrupo icterohaemorrhagiae pode ser observada com qualquer outro sorotipo (FEIGIN, 1975). É caracterizada pela falência das funções hepáticas e renais, hemorragia, colapso vascular e alteração severa da consciência (EDWARDS, DOMM, 1960; DE BRITO, *et al*, 1987; SPERBER, SCHLEUPNER, 1989). A icterícia que constitui a característica principal nesta forma clínica não está associada com necrose hepatocelular e sim a uma colestase intrahepática. Em geral, a função hepática se normaliza após a recuperação (RAMOS-MORALES, *et al*, 1959). Manifestações hemorrágicas são freqüentes, sendo observado petéquias, púrpura, hemorragias conjuntival, gastrointestinal e pulmonar. Os sintomas pulmonares incluem tosse, dispnéia, hemoptise de graus variados (BERENDSEN, *et al*, 1984; ALLEN, RAFTERY, PHELAN, 1989; ALANI, *et al*, 1993). Na Coréia, China, e Nicarágua a hemorragia pulmonar é causa de morte em pacientes sem disfunção renal e icterícia significativas (PARK, *et al*, 1989; DAI, 1992; ZAKI, SHIEF, 1996). As Formas Pulmonares Graves da Leptospirose (FPGL) representam uma evolução atípica da doença, com instalação precoce de insuficiência respiratória aguda, muitas vezes precedendo quadro de icterícia e renal. A morte pode ocorrer nas primeiras 24 horas de internação, por asfixia causada por profusa hemorragia bronco-pulmonar. Essas formas atípicas têm sido relatadas com freqüência no Brasil, principalmente no Estado do Rio de Janeiro, podendo ser confundidas com outras doenças agudas e febris que cursam com hemorragia pulmonar (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná). Alterações do sistema nervoso central também podem ocorrer.

Outras manifestações menos freqüentes são linfadenopatia generalizada, colecistite alitiásica e síndrome de angústia respiratória do adulto. O ecocardiograma revela pericardite e pequenos derrames pericárdicos em 6% dos pacientes. As alterações na radiografia de tórax incluem edema pulmonar, pneumonite difusa e derrames pleurais.

1.5. Diagnóstico

A leptospirose é considerada como uma doença infecciosa re-emergente não apenas pelo aumento da incidência nos últimos anos, mas também pelo aumento de sua severidade (SEHGAL, *et al*, 1995; DAHER, *et al*, 1999; YERSIN, *et al*, 2000) que freqüentemente induz uma mortalidade elevada, especialmente em pacientes que têm retardo no diagnóstico ou naqueles com tratamento impróprio. O diagnóstico precoce é importante para o prognóstico de pacientes com a forma severa de leptospirose (FAINE, 1982). A urgência em desenvolver melhores estratégias de diagnóstico surgiu a partir de 1995 quando a leptospirose re-emergiu com epidemias na Nicarágua e em outras localidades causando grave síndrome pulmonar hemorrágica (TREVEJO, *et al*, 1995).

O diagnóstico presuntivo da leptospirose é baseado em aspectos clínicos e epidemiológicos, bem como em achados laboratoriais específicos. Em regiões tropicais, onde outras doenças agudas febris são comuns, a leptospirose pode ser confundida, clinicamente, com influenza, meningite asséptica, encefalite, febre tifóide, rickettsioses, dengue, hepatite e gastroenterites. Os achados laboratoriais mais indicativos de doença incluem proteinúria, leucocitose com neutrofilia e desvio para esquerda, sedimentação de eritrócitos aumentados e plaquetopenia (KOBAYASHI, 2001).

O diagnóstico específico é baseado primariamente no isolamento do patógeno de qualquer espécime clínico ou demonstração no aumento de anticorpos séricos (WINSLOW, *et al*, 1997). É necessário considerar que a doença apresenta um comportamento bifásico onde na fase inicial ou septicêmica a bactéria pode ser isolada no sangue, líquido cefalorraquidiano e dialisado até o fim da primeira semana após apresentação clínica (CAMARGO, *et al*, 1995). Na segunda fase, imunológica, há o aparecimento dos anticorpos séricos específicos circulantes e também a eliminação das leptospiras na urina. As leptospiras podem ser cultivadas em meio contendo 10% de soro de coelho (meio de Fletcher e de Stuart), ou 1% de albumina bovina e ácidos graxos (meio EMJH, Elling-Hausen-Maccullough-Johnson-Harris) contendo 5-fluouracil. O pH ótimo deve estar entre 6,8 e 7,4 e a temperatura entre 28°-30°C. O período de crescimento varia de alguns dias a quatro semanas (LEVETT, 2001). As

leptospiras são bem visualizadas em microscopia de campo escuro, podendo também ser visualizadas em microscopia de contraste de fase ou até mesmo em campo claro (FARR, 1995).

Entre os métodos sorológicos, o teste de microaglutinação (MAT) é considerado o “Padrão Ouro” pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Nesta técnica, diluições seriadas do soro do paciente são incubadas a 37°C com uma suspensão de leptospiras vivas e após duas horas é observada a presença de aglutinação em microscopia de campo escuro. Como o teste é dirigido contra sorotipos específicos, as séries de antígenos utilizadas devem incluir os sorovares representativos de todos os sorogrupos (FAINE, 1982) e os comuns da região (TORTEN, 1979). Resultados falsos negativos são frequentemente relatados quando o sorovar causador não está incluído na bateria (THIERMANN, 1984). Os pacientes infectados apresentam títulos que variam de, no mínimo, 1:100 até 1:25000 ou mais. Os anticorpos aglutinantes surgem 6 a 12 dias após o início da infecção e atingem um pico máximo na terceira ou quarta semana da doença, podendo ser detectados vários anos após a doença aguda (CUMBERLAND, *et al*, 2001) o que não permite monitoramento da eficácia do tratamento (SAENGJARUK, *et al*, 2002). Para confirmação diagnóstica, muitas vezes são necessárias amostras de soros pareados (SAENGJARUK, *et al*, 2002). Apesar de específica, a MAT apresenta baixa sensibilidade no início da infecção. Contudo, é muito utilizada em estudos epidemiológicos, identificação de cepas, avaliação do sorogrupo provável da infecção e na confirmação da doença em vigilância de saúde pública (BRANDÃO, *et al*, 1998). Esta técnica é cara, de execução trabalhosa exigindo pessoal técnico qualificado, estando restrita a poucos laboratórios de referência. Utilizam-se culturas vivas de diferentes sorovares de leptospiras (FERREIRA, ÁVILA, 2001) que requerem meio de cultura complexo (SAENGJARUK, *et al*, 2002), manutenção e repiques frequentes, além da necessidade de microscópio de campo escuro.

Devido à complexidade da MAT, testes rápidos de triagem para detecção de anticorpos anti-leptospira, na infecção aguda, foram desenvolvidos (LEVETT, 2001). Entre eles: o teste hemolítico (COX, *et al*, 1957), a aglutinação macroscópica (SAT-Slide Agglutination Test) (GALTON, *et al*, 1958), o ensaio de hemaglutinação indireta (LEVETT, WHITTINGTON, 1998; SULZER, *et al*, 1975), a imunofluorescência indireta (TORTEN, *et al*, 1966), o teste de aglutinação em microcápsula (ARIMITSU, *et al*, 1994) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) – (ADLER, *et al*, 1980; MILNER, *et al*, 1985).

O ELISA-IgM tem sido descrito por autores de diversos países como um teste de alta sensibilidade (S=98%) e especificidade (100%), permitindo a detecção de anticorpos já na primeira semana, sendo um método eficaz para o diagnóstico na fase aguda da doença, (FAINE, 1982; Ministério da Saúde, 1997). Porém, sua utilização ainda é restrita a laboratórios de referência. O Dot-ELISA pode ser utilizado para pesquisa de anticorpos das classes IgM, IgG, e IgA antileptospira na saliva e no soro (SILVA, *et al*, 1997). A sensibilidade do SALIVADOT é de 98% e a especificidade é de 100%, semelhante ao do ELISA IgM no soro e LEPTO Stick (GUSSENHOVEN, *et al*, 1997). Estes testes imunoenzimáticos, comparados aos aglutinantes, são métodos mais sensíveis e específicos, permitindo detectar anticorpos a partir do 2º e 4º dia após o início dos sintomas (CAMARGO, *et al*, 1992; SILVA, *et al*, 1995). Sua execução é relativamente mais fácil do que a MAT e permitem redução no tempo de processamento.

O advento de técnicas de biologia molecular permitiu a detecção do DNA de leptospira em material clínico. Para esse fim têm-se utilizado dot-blotting (MILLAR, *et al*, 1987; TERPSTRA, *et al*, 1986), hibridização *in situ* e PCR (TERPSTRA, *et al*, 1987). A PCR é um método molecular rápido e sensível em especial durante os primeiros dias de doença antes da soroconversão, sendo útil também para distinguir sorovares patogênicos dos não patogênicos (MURGIA, *et al*, 1997; PARMA, *et al*, 1997; WOO, *et al*, 1997). Pode ainda ser utilizada para detectar DNA de leptospira em tecidos no diagnóstico *post mortem*, quando métodos convencionais, como a cultura, falham. Em um estudo na Índia, 35% dos pacientes tiveram PCR positiva no humor aquoso sendo soronegativos através da MAT e do ELISA (CHU, RATHINAM, NAMPERUMALSAMY, DEAN, 1998).

1.6. Tratamento

A eficácia de antibioticoterapia na leptospirose humana é controversa. Antimicrobianos são mais efetivos quando iniciados nos primeiros cinco dias da doença, ou antes, que se inicie a icterícia, entretanto, a maioria dos casos chega ao hospital com mais de quatro dias de doença. Por outro lado, poucos estudos têm avaliado a susceptibilidade *in vitro* da *Leptospira spp* a agentes antimicrobianos (TRUCCOLO, *et al*, 2001). Leptospiras são sensíveis a maioria dos antibióticos com exceção do cloranfenicol, vancomicina, rifampicina e metronidazol (FAINE, *et al* 1999). Dentre os utilizados na clínica para o tratamento humano,

os que obtiveram menor MIC (concentração inibitória mínima), foram ampicilina, penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina (TRUCCOLO, *et al*, 2001).

A penicilina G cristalina é a droga de escolha. Alérgicos a penicilina podem usar ceftriaxona. Ainda como alternativa pode ser utilizada a tetraciclina ou doxiciclina. A tetraciclina mostrou ser estatisticamente mais efetiva que placebo em reduzir os dias de febre e outros sintomas, mas não em evitar envolvimento renal ou hepático (RUSSEL, 1958). A doxiciclina é um análogo da tetraciclina de ação prolongada que possui a capacidade de se ligar à subunidade 30S dos ribossomos microbianos, bloqueando a ligação da RNA-aminoacil transferase, inibindo a síntese de proteínas. A doxiciclina na dosagem de 100mg duas vezes ao dia durante sete dias reduziu a duração e a severidade da doença na leptospirose anictérica em 2 dias. O tratamento preveniu leptospirúria e não houve efeito adverso (MACCLAIN, *et al*, 1984). Esses achados de prevenção de leptospirúria e uma significativa redução na duração da doença poderiam justificar o uso de antibiótico. Em um modelo murino para determinar a eficácia dos antibióticos (ampicilina, doxiciclina e ofloxacina) durante o curso da doença, um ensaio quantitativo por PCR foi usado para monitorar a densidade de leptospiras no sangue e em órgãos (fígado, rim, pulmão, coração e baço). Os resultados mostraram a eficácia da ampicilina em altas doses (100mg/kg/peso) na eliminação de leptospiras no hospedeiro, com exceção do rim e coração, onde 10^2 leptospiras permaneceram até o sexto dia. A Ofloxacina (30mg/kg) foi incapaz em eliminar as bactérias do sangue e rins. Com a doxiciclina (10mg/kg), o clearance de leptospiras ocorreu em dois dias em todos os órgãos estudados, com exceção do fígado que requereu três dias (TRUCCOLO, *et al*, 2002).

Pacientes que apresentam o quadro grave da doença e apresentam icterícia e insuficiência renal, devem ter seu equilíbrio hidroeletrólítico controlado devendo ser bem hidratado a fim de evitar insuficiência renal aguda cujo tratamento é a diálise peritoneal. Em casos graves da forma pulmonar com hemoptise refratária a terapias convencionais pode-se utilizar a desmopressina. Esta droga, indicada em várias desordens hereditárias e adquiridas, foi utilizada em pacientes com falência respiratória, choque e disfunção de vários órgãos melhorando rapidamente o quadro (PEA, RODA, BOUSSAD, LONJON, 2003).

1.7. Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose que ocorre de forma endêmica no mundo inteiro, exceto em regiões polares (SCHECTER, MARANGONI, 1998). Não é uma infecção comum em

humanos, com exceção das regiões tropicais onde está vinculada a fatores ambientais como temperatura, pH, tipo de solo e umidade. Atualmente é identificada como uma das principais doenças infecciosas re-emergentes, determinadas por recentes epidemias na Nicarágua, Brasil, Índia, Sul da Ásia e Estados Unidos (LEVETT, 2001).

É um problema veterinário relevante, atingindo animais domésticos (cães e gatos), silvestres e outros de importância econômica (bois, cavalos, porcos, cabras, ovelhas). Os animais são, portanto, os reservatórios essenciais para a persistência dos focos da infecção. Roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* são as mais importantes fontes de infecção humana (PLANK, DEAN, 2000), pelo seu grande número, pela proximidade com o homem e pelo fato de que a bactéria multiplica-se em seus túbulos renais sem causar dano, sendo eliminada para o meio ambiente durante toda a vida do animal, contaminando águas, solo e alimentos. O homem é um hospedeiro casual e transitório, albergando a bactéria durante a doença e por um curto período após a infecção (SCHECTER, MARANGONI, 1998).

A leptospirose ocorre de forma sazonal nas diversas regiões estudadas. A alta prevalência nos países em desenvolvimento está associada com o crescimento populacional urbano e ausência de saneamento básico que constitui um fator essencial na proliferação de roedores (ALMEIDA, 1994). Nesta situação, os grupos sócio-econômicos menos privilegiados, com dificuldade de acesso à educação e saúde, residentes em regiões periféricas às margens de córregos ou próximos esgotos a céu aberto, expostos com frequência a enchentes, apresentam o maior risco de contrair infecção (ALMEIDA, 1991). Em países desenvolvidos, com infra-estrutura de saneamento adequada, a população está menos exposta ao contágio. É mais comum que a infecção ocorra a partir de animais de estimação e em pessoas que se expõem à água contaminada, em razão de atividades profissionais ou recreativas (LIMA, RIBEIRO, 1990).

A exposição ocupacional é um fator de risco significativo (WAITKINS, 1986), podendo atingir diferentes categorias profissionais como trabalhadores em arrozais e canaviais, mineiros, abatedores de animais, trabalhadores da rede de abastecimento de águas e esgotos, e médicos veterinários. Em relação aos serviços de saneamento, estão expostos não apenas os trabalhadores das redes de abastecimento de água e esgotos, como também os da limpeza pública, coletores de lixo e varredores (ALMEIDA, 1991). Essas atividades são executadas, na ausência de recursos tecnológicos e de equipamentos de segurança, por mão de obra não qualificada e mal remunerada, o que aumenta ainda mais o risco dos trabalhadores

contraírem a infecção (COSTA, *et al*, 1970; GONÇALVES, *et al.*, 1981; ANDRADE, BRANDÃO, 1987). Dentre as atividades recreacionais que podem constituir em fonte de aquisição da doença estão natação, pescarias e as caçadas onde haja água e solo contaminado. Casos estão aumento entre participantes de competições que envolvem esportes radicais (HAAKE, *et al*, 2002). Surtos de leptospirose por atividades de lazer praticadas em áreas próximas a zonas rurais também já foram descritos (COCKBURN, *et al.*, 1954; AZEVEDO, CORREA, 1968).

A infecção é transmitida mais comumente de forma indireta por contato da pele e mucosas íntegras ou lesadas com água, solo úmido e vegetação, ao nadar, por imersão acidental ou ingestão de alimentos contaminados com urina de animais infectados. Outra forma de transmissão é pelo contato direto com tecidos, urina, saliva de animais infectados (ACHA, SZYFRES, 1986). O homem é infectado casual e transitoriamente, e não tem importância como transmissor da doença, contudo, a transmissão sexual durante a fase convalescente da doença já foi relatada (HARRISON, FITZGERALD, 1988). Transmissão transplacentária também pode ocorrer e está associada com morte fetal e aborto (COGHLAN, BAIN, 1969). BOLIN e KOELLNER relataram um caso de leptospirose anictérica em um lactente cuja mãe adoeceu 21 dias antes. Possivelmente, a transmissão ocorreu através do leite materno (BOLIN, KOELLNER, 1988).

A doença ocorre predominantemente no sexo masculino, porém, não existe diferença de susceptibilidade quando ambos os sexos estão igualmente expostos às fontes de contágio. A faixa etária de 15 a 45 anos é a mais acometida. No meio rural estes fatores estão ligados a atividades de agricultura e ao trato com animais (EVERARD, *et al*, 1990; SASAKI, *et al*, 1993), como observado em colhedores de arroz na Itália e Espanha, onde 10 a 20% dos trabalhadores são anualmente atingidos (CICERONI, *et al*, 1995). Na Itália, um estudo revelou que homens entre 15 e 64 anos residentes na área rural têm o maior risco de aquisição da leptospirose, as principais fontes de infecção são água estagnada e solo contaminado seguidos de contato direto com animal infectado e o risco de contrair a doença por atividade de lazer está aumentando em relação à ocupação (CICERONI, *et al*, 2000). No Brasil, dos 2.065 casos de leptospirose notificados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas durante o período de 1980-1994, 91,1% eram do sexo masculino (VERONESI, 1998). Em Cuba no período de 1986 a 1990 de um total de 2.478 casos de leptospirose humana, mais de 80% eram do sexo masculino. Em um estudo de leptospirose em Barbados a forma ictérica ocorreu predominante em homens numa faixa etária entre 25 e 45 anos (EDWARDS, *et al*, 1990).

Contudo, estudos na Bolívia (CICERONI, et al, 1995), Gabão (BERTHERAT, *et al*, 1999), Índia (RATNAM, S., et al, 1993), e Coréia (KIM, J. S., 1987) revelaram que as taxas de soroprevalência foram idênticas para homens e mulheres. Na província de Santa Fé na Argentina, a maioria dos casos atinge os homens acima de 15 anos com baixo nível de escolaridade e as fontes de infecção diferem dos moradores da área rural e urbana, no primeiro caso está relacionado à presença de roedores e ao tipo de trabalho enquanto no segundo deve-se à pobreza e às condições de moradia (MARTIN, SENSEVY, COLOMBO, TRAMONTINA, 2002).

Barbados é uma ilha do Caribe que apresenta o clima quente e úmido e solo alcalino oferecendo condições ideais para Leptospirose. A doença foi reconhecida na ilha em 1930 quando atingiu lavradores de cana e cortadores de capim sendo rara entre outras classes da comunidade (EVERARD, *et al*, 1992). Subseqüentemente, nos anos de 1968 a 1974 Damude et al observaram uma ampla variedade ocupacional nos casos de leptospirose na região (DAMUDE, JONES, WHITE, MYERS, 1979). Posteriormente, em um estudo prospectivo de 1979 a 1986, EVERARD, et al, 1992 avaliaram fatores de risco para leptospirose severa em Barbados e observou que a incidência de infecção aumenta com a idade sendo maior no sexo masculino particularmente acima dos 35 anos e que a doença atinge mais as áreas rurais, pois, em adição à ocupação, contato com animais e outras atividades, os centros urbanos estão em áreas com baixo índice pluviométrico, enquanto as rurais estão em áreas com alta precipitação (EVERARD, *et al*, 1992). Entretanto, a alta incidência de leptospirose em homens tende a ser universal e geralmente atribuída a fatores ocupacionais sendo mais comum em agricultores, como observado por outros autores em diferentes regiões (BOVET, *et al*, 1999; KUPEK, *et al* 2000; VADO-SOLIS, *et al*, 2002).

Apesar da leptospirose ser primariamente uma infecção de adultos, um estudo sorológico onde estudantes de Barbados e Trinidad com idade entre 7–14 anos foram randomicamente selecionados em escolas urbanas e rurais apresentaram 12,5% e 9,5% de crianças soropositivas, respectivamente. Nas duas ilhas a soroprevalência foi maior no sexo masculino que no sexo feminino (EVERARD, HAYES, EDWARDS, 1989). Na Bolívia, crianças apresentaram uma alta prevalência de anticorpos contra leptospiras (CICERONI, BARTOLONI, PINTO, 1995). Embora haja um aumento da exposição de crianças, a leptospirose não é frequentemente diagnosticada. Talvez isso ocorra devido à apresentação subclínica ou ser confundida com outras doenças infecciosas comuns de seu país (PLANK, DEAN, 2000).

No Brasil é endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos. A incidência é maior durante o verão entre janeiro e abril, quando fortes chuvas e enchentes ocorrem em áreas urbanas (GUIDULI, CASTRO, ATALLAH, 2000). No Nordeste, a leptospirose é uma doença epidêmica claramente reconhecida (BARCELOS, SABROZA, 2000) ocorrendo anualmente, de forma sazonal, nas cidades do Recife, Salvador, Rio de Janeiro e São Paulo e, recentemente, sendo notificada em áreas rurais. Embora suas características variem geograficamente com respeito às formas clínicas, de uma maneira geral elas tem um forte impacto social e na saúde. Muitos autores têm analisado a influência das enchentes na infecção por leptospirose no homem, sugerindo que os casos variam de um ano para o outro, de acordo com a variação pluviométrica, enchentes, população de murinos e à incidência animal (LIMA, 1996; CALDAS, SAMPAIO, 1977) No Rio Grande do Norte a leptospirose é predominantemente rural. O primeiro surto foi descrito por Suassuna em 1985 (SUASSUNA, *et al*, 1986), nas fazendas de arroz da região oeste do Estado. Essa região é composta de serras de relevo irregular e de vales que favorecem o plantio de arroz. Durante as epidemias, há o aparecimento de roedores (ratos) silvestres que se alimentam e habitam os arrozais e esses animais parecem ser os principais transmissores da doença. Os maiores surtos foram notificados nos anos de 1985 e 1986 com um total de 1548 casos de Leptospirose na região oeste que possuía uma população de 160.000 habitantes, correspondente a 5% do total da população do estado (IBGE 2000).

Outros surtos ocorreram na região, nos anos que se registraram altos índices pluviométricos (Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Norte e Emparn) (FIGURA1). Durante as epidemias, 80% dos casos eram lavradores de arroz que apresentaram a forma anictérica da doença. Em um estudo preliminar foi encontrada relação entre os casos e a atividade no cultivo de arroz (SUASSUNA, *et al*, 1986). Os trabalhadores agrícolas apresentam uma maior incidência da doença que outros grupos ocupacionais devido ao contato prolongado com água em seu trabalho (SANCHEZ, PAZ, ACOSTA, 1993) como referenciado antes.

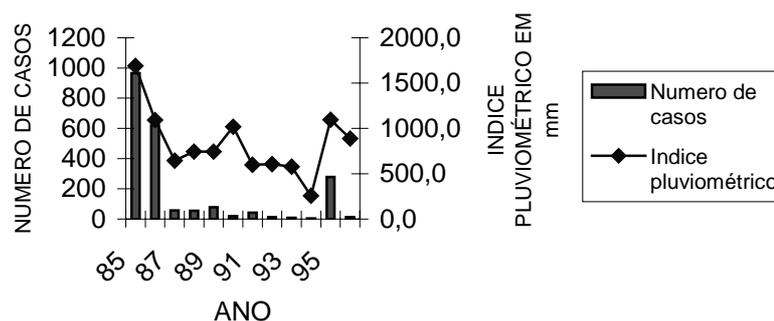


Figura I: Casos notificados de Leptospirose e índice pluviométrico na Região Oeste do Rio Grande do Norte, 1985-1996.

1.8. Profilaxia

Estratégias de prevenção e controle de leptospirose incluem medidas direcionadas aos reservatórios, aos fatores ambientais e ao homem (SEGHAL, *et al*, 2000). O risco de transmissão pode ser reduzido nos centros urbanos através da melhoria das condições de infra-estrutura básica (rede de esgoto, drenagem de águas pluviais, coleta adequada do lixo) e da eliminação dos roedores. O controle da população de roedores, por meio de medidas de anti-ratização e desratização diminui o nível de contaminação ambiental, e, conseqüentemente, reduz o número de casos humanos. Em locais específicos, o controle efetivo de ratos e a desinfecção de áreas de trabalho contaminadas tiveram uma efetiva redução na incidência da doença (FARRAR, volume II). Equipamentos de proteção, como botas de cano longo, roupas e luvas impermeáveis protegem indivíduos com risco ocupacional. Entretanto, estas medidas tradicionais não são praticáveis em países em desenvolvimento devido às dificuldades econômicas e a baixa adesão da população (SEGHAL, *et al*, 2000).

Vacinação e quimioprofilaxia são duas outras medidas de proteção ao homem. A imunização de humanos não é uma prática comum. A vacina disponível até o momento não confere imunidade permanente contra a infecção (FAINE, *et al.*, 1999; LEVETT, 2001) e tem uma baixa eficácia. O grande número de sorovares e a circulação de diferentes sorovares em diferentes áreas geográficas torna difícil selecionar todos àqueles potencialmente importantes e responsáveis pela maioria das infecções na região (PHILLIP, TENNENT, 1966; TORTEN, *et al*, 1973; SEGHAL, *et al*, 2000), ao mesmo tempo, o alto custo na produção tem sido o fator limitante no desenvolvimento de vacinas mais eficazes. A quimioprofilaxia é então a única alternativa prática nas circunstâncias atuais (SEGHAL, *et al*, 2000). O uso profilático de

drogas pode reduzir a sintomatologia e provavelmente prevenir a morte devido à leptospirose (McCLAIN, *et al*, 1984).

A identificação e o conhecimento da expressão de proteínas antigênicas durante a infecção pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de vacinas. A diversidade antigênica observada entre os sorovares de leptospira deve-se às variações de carboidratos na cadeia lateral do LPS. Oligossacarídeos identificados por anticorpos monoclonais mediam resistência a reinfecção, demonstrando o alto poder imunogênico do LPS (MACGRATH, *et al*, 1984). Por esta razão muitas vacinas não conferem imunidade contra sorovares não incluídos na preparação. Em contraste, em um modelo experimental a imunização de animais com proteínas extraídas de leptospira conferiram proteção contra sorovares heterólogos (SONRIER, *et al*, 2000). A seqüência de aminoácidos de muitas proteínas de membrana externa de leptospira como LipL32, (HAAKE, *et al*, 2000), LipL41, proteínas de choque térmico; p62 (Groel), e p76 (Dnak) parecem ser altamente conservadas entre diversas leptospiros patogênicas, sendo expressas durante a infecção natural (GUERREIRO, *et al*, 2001). Em um modelo murino foi demonstrado o sinergismo na imunoproteção, entre a lipoproteína de membrana externa (LipL-41) e porina de membrana externa (OmpL1). A imunização ativa de hamsters com frações de membrana com a combinação das proteínas LipL-41 e OmpL1 mostrou proteção significativa com maior taxa de sobrevivência nos animais vacinados em relação aos animais controles e àqueles vacinados apenas com LipL-41 ou OmpL-1 (HAAKE, *et al*, 1999). Plasmídeos contendo genes que codificam uma proteína de leptospira, a endoflagelina, inoculados em coelhos conferem imunização com produção de altos títulos de anticorpos antileptospira (HUA, XI., *et al*, 1999).

Países como China, Coréia e Cuba estão testando vacinas contra sorotipos específicos em populações sob exposição ocupacional em áreas de alto risco (FAINE, S., 1999). Testes obtiveram bons resultados em mineiros no Japão e agricultores de arroz na Itália e Espanha. No Brasil não existe uma vacina disponível para uso humano. A vacinação de animais (cães, bovinos e suínos) também não se constitui em medida de proteção para o homem, pois, evita a doença no animal, mas não impede a infecção nem a transmissão para seres humanos (FARR, 1995).

A quimioprofilaxia tem sido utilizada na prevenção de outras doenças como, malária e diarreia dos viajantes (SEGHAL, *et al*, 2000). Mas, a sua eficácia na leptospirose ainda não está suficientemente estabelecida estando indicada apenas para indivíduos sob risco ocupacional, como trabalhadores e militares em manobras, que irão se expor em áreas de alta

endemicidade, por período relativamente curto (FARR, 1995), não oferecendo proteção contra infecção numa população com alto nível de exposição.

Doxiciclina é a droga mais utilizada na profilaxia da leptospirose conseguindo reduzir a morbidade e a mortalidade dos casos de leptospirose em áreas endêmicas, quando a doença é sazonal e de curto período (SEHGAL, *et al*, 1999). Administrada em pacientes numa dosagem de 100mg duas vezes ao dia durante sete dias, reduziu a duração da doença e os sintomas relatados na fase leptospirêmica, como febre, dor de cabeça, mialgia (McCLAIN, *et al*, 1984). Um estudo em soldados americanos em treinamento no Panamá na dose de 200mg uma vez por semana, demonstrou uma eficácia de 95% (TAKAFUJI, *et al*, 1984). Em um trabalho realizado em São Paulo para avaliar a eficácia da prevenção da leptospirose com doxiciclina (200mg dose única), após exposição de alto risco com água potencialmente contaminada, foi encontrada associação protetora da doxiciclina nos casos confirmados e soroconversão (GONSALEZ, *et al*, 1998). A quimioprofilaxia com doxiciclina poderia ser a solução em reduzir o impacto de epidemias de leptospirose em áreas endêmicas (SEHGAL, *et al*, 1999).

Não há referência ao uso de outras drogas na profilaxia pré-exposição da leptospirose. Na prevenção pós-exposição, a penicilina por via parenteral tem sido recomendada a despeito da escassa informação sobre a sua eficácia. Entretanto, a penicilina procaína falhou em prevenir a infecção em um caso de exposição acidental enquanto a doxiciclina na mesma situação preveniu a infecção (GILKS, *et al*, 1988). Falha com a penicilina por via oral, na prevenção pós-exposição, já havia sido relatada anteriormente (BROOM, *et al*, 1957).

Diante da evidência da presença da leptospirose no Rio Grande do Norte com elevada morbidade e, reconhecendo a doxiciclina como agente profilático, o propósito deste estudo é avaliar se a quimioprofilaxia com doxiciclina poderia proteger o indivíduo sob risco ocupacional de infecção por *Leptospira* no nosso estado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a efetividade da doxiciclina como agente profilático contra leptospirose em agricultores de arroz do Município de São Miguel/RN.

2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a prevalência de leptospirose em agricultores de arroz do Município de São Miguel/RN no período pré e pós-colheita.
 - Determinar a soroconversão de leptospirose pós-colheita, em indivíduos dessa população não submetidos a quimioprofilaxia.
 - Avaliar se a doxiciclina protege o indivíduo exposto da infecção.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do Estudo e População

O estudo foi realizado no município de São Miguel localizado na região Oeste do Rio Grande do Norte fronteira com o Ceará, a 440km da capital, Natal. Este município possui uma população total de 20.124 habitantes e compreende uma extensão territorial de 164 km² (IBGE). Apesar do clima semi-árido, os índices pluviométricos atingem em alguns anos 1600mm, favorecendo ao desenvolvimento de atividades agrícolas, como o plantio do arroz (EMPARN). Durante as epidemias de 1985 e 1986, houve, em média, uma incidência de 10 casos/100.000 habitantes (Secretaria Estadual de Saúde/RN). A população estudada foi de agricultores de arroz de quatro comunidades rurais da cidade de São Miguel que possuísem os maiores plantios e que participaram da colheita do arroz em 2000. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Todos os indivíduos arrolados consentiram em partir do estudo.

3.2. Desenho do Estudo

Este estudo foi de coorte para avaliar a implementação da intervenção de quimioprofilaxia durante o período da colheita do arroz e identificar a incidência geral da leptospirose na população de São Miguel. Já foi demonstrado o benefício da doxiciclina como quimioprofilático em um estudo no Panamá durante treinamentos militares. Avaliou-se a eficácia da proteção da doxiciclina contra a leptospirose em agricultores sob risco de infecção por leptospira durante a colheita. Analisou-se se há um menor risco de aquisição da leptospirose comparando os voluntários que fizeram o uso da doxiciclina com os que não fizeram, devido a não aderência ao tratamento. A implementação intervencional foi realizada exclusivamente pela Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte e Secretaria Municipal de Saúde de São Miguel.

Na primeira fase do estudo que ocorreu antes do período da colheita, os indivíduos que foram selecionados e que assinaram o termo de consentimento, responderam a um questionário sobre identificação e dados demográficos. Após o consentimento foi coletado 10mL de sangue para confirmação laboratorial. A distribuição da doxiciclina foi realizada por agentes comunitários do município, 200mg doxiciclina por semana sendo distribuídos para

toda a população que participou da colheita de arroz.. Os menores de 18 anos não receberam essa intervenção por causa dos efeitos colaterais da doxiciclina em crianças. Na segunda etapa do estudo, após a colheita, os mesmos indivíduos, da primeira fase, foram visitados e aplicou-se um segundo questionário contendo dados sobre atividades ocupacionais, fatores de risco, sintomatologia durante o período da colheita e uso da doxiciclina. Foi coletada uma segunda amostra de sangue (10mL) para confirmação laboratorial.

3.3. Tamanho da Amostra

Baseando-se no estudo de soroprevalência realizado em 1999, 10 a 20% desta população deveriam estar infectados com leptospira. As comunidades têm uma média de 200 habitantes e 40% é de adultos que trabalham na agricultura do arroz. Para o estudo de coorte estimou-se um total de 320 pessoas que preencheriam os critérios de inclusão do estudo.

3.4. Coleta e Processamento das Amostras

Amostras de sangue periférico dos indivíduos selecionados foram colhidas em diferentes fases. A primeira coleta ocorreu antes da colheita do arroz e uma segunda amostra após a colheita e uso da doxiciclina. A segunda coleta foi realizada para estimar a taxa de soroconversão através da detecção de anticorpos IgM anti-leptospira. Aproximadamente 2 horas após a coleta, o soro foi separado por centrifugação a 1500g por 15 minutos, sendo subsequentemente aliquotados em tubos de microcentrifuga, identificados e conservados a -20°C.

3.5. Sorologia

A detecção de anticorpos no soro foi realizada pelo método ELISA, utilizando extrato bruto de *L. interrogans* serovar copenhageni, cepa L1-130, obtida de um paciente com síndrome de Weil internado no Hospital Couto Maia em Salvador.

O extrato antigênico com proteína previamente dosada diluído em solução de 0,06M de Na₂CO₃ (carbonato de sódio) pH 9,6, numa quantidade adequada a fim de obter 75ng/poço, foi aplicado a microplaca (placa flexível Falcon-Becton Dickinson cat 353912) e incubado por 18 horas a 4°C. Após a incubação, o líquido antigênico contido nas placas foi desprezado, através de aspiração com pipeta Pasteur e bomba a vácuo ou por lançamento com movimento forte, sendo então lavadas com água destilada por 3 vezes e secas. Um volume de 200 µl da solução bloqueadora PBS/Tween20 0,3% - 1% BSA foi adicionada às placas. As placas eram

incubadas por 4 horas a temperatura ambiente com agitação constante. Após este período as placas eram lavadas 5 vezes com PBSTween 0,05%.

Os soros dos indivíduos e controle negativo na diluição de 1:400 foram adicionados à microplaca (50µL) e incubados por uma hora a temperatura ambiente. Subseqüentemente, procedeu-se a remoção do soro e a lavagem dos poços 4 vezes com PBS/Tween0,05%. Após esta etapa o anticorpo secundário, conjugado anti-IgM-peroxidase, diluído 1:20000 em PBSTween 0,05% era adicionado a placa e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. O excesso do material era então desprezado e a placa lavada 4 vezes com PBSTween 0,05% e uma vez com PBS 1X. Uma solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio em presença do cromógeno TMB (tetra metil benzidina) diluído em tampão citrato fosfato pH 5.0 foi adicionado, permanecendo em ambiente escuro, a temperatura ambiente por uma hora, até a reação ser interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄ 2M. A intensidade de cor desenvolvida é proporcional a quantidade de anticorpo presente na amostra. A densidade óptica foi lida a 450nm. Amostras que apresentaram uma densidade óptica acima do cut-off foram consideradas positivas.

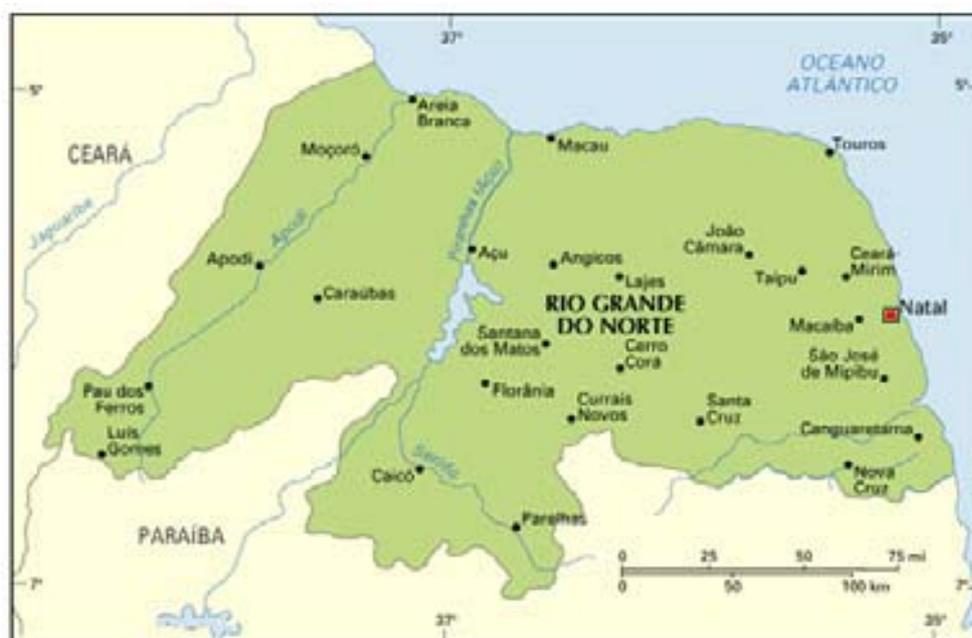


Figura 2 Mapa do estado do Rio Grande do Norte

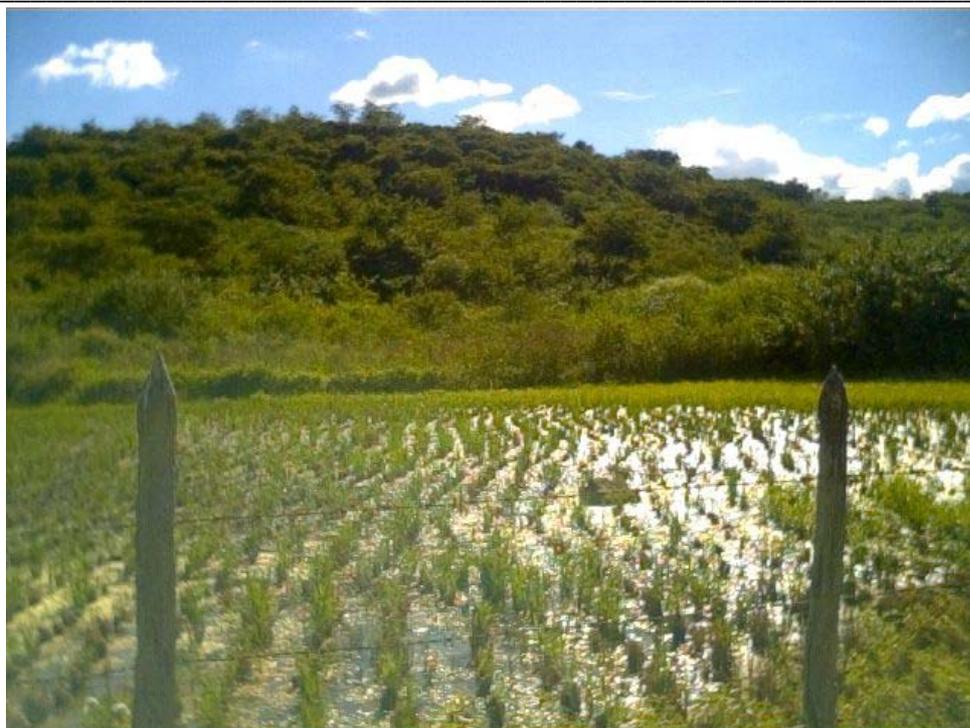


Figura 3:Local do cultivo do arroz do município de São Miguel

4.0 RESULTADOS

Foram visitados 111 domicílios em 28 sítios do município de São Miguel/RN, sendo selecionados um total de 189 agricultores, que residiam na localidade há mais de seis meses e que participariam da colheita de arroz no ano de 2000. No entanto, disponíveis para análises pré-colheita de arroz foi um grupo composto por 155 indivíduos (**TABELA 1**). Destes a maioria dos indivíduos era do sexo masculino 94,8% (n=147) (**TABELA 2**). As faixas etárias predominantes eram de 10-19 e 20-29 anos com percentuais de 23,2% (n=36) e 21,9% (n=34), respectivamente (**TABELA 3**). A análise de todos os soros não foi possível por diversos fatores como perdas, desistência dos voluntários e amostras que não foram coletadas na segunda visita.

TABELA 1: Frequência de agricultores de arroz por sítios do Município de São Miguel/RN.

SÍTIOS	Frequência	Percentual
Acampamento fz	8	4,6%
Acampamento st	9	5,2%
Agreste fz	31	20,3%
Agreste st	28	18,3%
Alto do batuque	1	0,7%
Baixio dos Chagas st	3	2,0%
Bananeiras	1	0,7%
Barreiros	1	0,7%
Barreiros st	2	1,3%
Boa Vista de Cima fz	7	4,6%
Boa Vista st	4	2,6%
Bonito fz	3	2,0%
Buracão	6	3,9%
Buracão st	2	1,3%
Lagoa de dentro st	10	6,5%
Mucunã	5	3,3%
Núcleo Sabino	2	1,3%
Núcleo Sabino Leite	5	3,3%
Oiteiro st	1	0,7%
Pau Branco st	2	1,3%
Riacho Fundo	1	0,7%
Riacho Fundo st	1	0,7%
São Goncalo de Baixo st	1	0,7%
São Pedro de Cima st	5	3,3%
São Pedro st	9	5,9%
Serrinha dos Paulo	2	1,3%
Serrinha dos Paulo st	2	1,3%
Torrões	3	2,0%
Total	155	100,0%

Fz - fazenda, St - sítio

TABELA 2: Frequência de agricultores de arroz de acordo com o sexo.

Sexo	Frequência	Percentual (%)
Feminino	8	5,2%
Masculino	147	94,8%

TABELA 3: Distribuição dos agricultores de arroz por faixa etária.

Idade	Frequência	Percentual (%)
0 a 9	1	0,6
10 a 19	36	23,2
20 a 29	34	21,9
30 a 39	27	17,4
40 a 49	23	14,8
50 a 59	20	12,9
60 a 69	12	7,7
70	2	1,3
Total	155	100,0

Quanto à escolaridade, 43,9% (n=68) dos agricultores eram analfabetos, 55,5% (n=86) tinham primeiro grau incompleto e 0,6% (n=1) segundo grau incompleto (**TABELA 4**). A grande maioria dos indivíduos 99,4% (n=154) havia trabalhado na cultura do arroz anteriormente. Contudo, apenas 16,1% (n=25) referiram terem tido a “febre do rato” contra 83,9% (n=130) que não apresentaram a doença. Ao mesmo tempo, quando questionados sobre o sintoma febre, 23,2% (n=36) dos agricultores relataram febre após a colheita do arroz no passado (**TABELA 5**). No tocante às diversas atividades desenvolvidas pelos agricultores no cultivo de arroz, 97,4% (n=151) plantaram, 84,5% (n=131) colheram, 84,5% (n=131) bateram e 98,7% (n=153) carregaram.

TABELA 4: Distribuição dos agricultores de arroz por escolaridade.

Escolaridade	Frequência	Percentual
Analfabeto	68	43,9
1º grau incompleto	86	55,5
2º grau incompleto	1	0,6
Total	155	100,0

TABELA 5: Percentual de indivíduos com antecedente de febre do rato e febre

	Sim (%)	Não (%)
Febre do rato	25 (16,1)	130 (83,9)
Febre	36 (23,2)	119 (76,8)

A taxa de soroprevalência de leptospirose na população estudada antes da colheita, determinada pela detecção de anticorpos IgM anti-leptospira através da técnica de ELISA foi de 14,2% (n=22) (**TABELA 6**). Quanto ao sexo, o percentual de positividade foi de 90,9% no sexo masculino e de 9,09% no sexo feminino.

TABELA 6: Taxa de soroprevalência entre os agricultores antes do período da colheita do arroz.

Sorologia	Frequência	Percentual (%)
Negativo	133	85,8
Positivo	22	14,2
Total	155	100,0

Na segunda visita, realizada após a colheita de arroz, foram coletadas amostras de soro de 163 indivíduos dos 189 arrolados inicialmente. A positividade do ELISA IgM anti-leptospira nessa ocasião foi de 16,6% (n=27) (**TABELA 7**). Sorologia pareada, antes e após a colheita, foi realizada em 132 indivíduos, observando-se uma taxa de soroconversão de 8,6% (n=10). Em termos percentuais 91,4% dos que eram negativos permaneceram negativos e 56,3% dos indivíduos que eram positivos tornaram-se negativos. A chance de permanecer positivo era de 43,75% (**TABELA 8**). O Teste do qui-quadrado de MacNaman mostrou que o percentual daqueles que se mantiveram negativos é bem superior em relação ao percentual daqueles que se mantiveram positivos ($\chi^2=0,001$, p=1,0 com 1 grau de liberdade gl=1) (**TABELA 9**).

TABELA 7: Taxa de soroprevalência entre os agricultores após a colheita do arroz.

Sorologia	Frequência	Percentual (%)
Negativo	136	83,4
Positivo	27	16,6
Total	163	100,0

TABELA 8: Taxa de soroconversão entre os agricultores de arroz.

Sorologia Pré colheita	Sorologia Pós-colheita		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	106	10 (8,62%)	116
Positivo	9	7	16
Total	115	17	132

TABELA 9: Teste de Mac Naman

Mac Naman P	χ^2 (qui-quadrado)	P
(A/D)	84,99	0,00000
(B/C)	0	1,0000

A soroconversão também foi avaliada em 113 indivíduos conforme tenham utilizado calçado ou não durante a colheita de arroz. O percentual de positividade foi de 6,8% entre os que trabalharam calçados e de 8,69% entre os que trabalharam descalços. A diferença não foi estatisticamente significativa ($\chi^2=0,132$ e $p=0,717$ com 1 grau de liberdade, com a razão de Odds de 1,30) (TABELA 10).

TABELA 10: Soropositividade entre os agricultores de arroz que utilizaram proteção dos membros inferiores contra a leptospirose.

Sorologia	Prot. de membros infer.		Total (%)
	Sim (%)	Não (%)	
Negativo	41 (93,2)	63 (91,31)	104 (92,04)
Positivo	3 (6,8)	6 (8,69)	9 (7,96)
Total	44 (100)	69 (100)	113

P = 0,717

Razão de Odds = 1,30

A análise de eficácia da doxiciclina foi realizada numa amostra contendo 61 indivíduos que eram negativos na avaliação sorológica inicial (TABELA 11). O percentual de positividade entre aqueles que utilizaram a doxiciclina foi de 8,8% e entre aqueles que não usaram foi 11,1%. O teste do qui-quadrado, não mostrou diferença significativa ($\chi^2=0,089$, $p=0,766$ com 1 grau de liberdade $gl=1$, com razão de Odds de 1,29).

TABELA 11: Análise da efetividade da doxiciclina

Sorologia	Doxiciclina		Total
	Sim	Não	
Negativo	31	24	55
Positivo	3 (8,8%)	3 (11,1%)	6
Total	34	27	61

P = 0,766

Razão de Odds = 1,29

5. DISCUSSÃO

A leptospirose é um problema importante na região do alto oeste do Rio Grande do Norte, especialmente, entre os agricultores de arroz, principal fonte de subsistência para aquela população. Embora as epidemias de leptospirose não tenham um impacto na mortalidade na área estudada, como relatados em áreas do Caribe (GELLMANN, E., et al, 1983) e Nicarágua (TREVEJO, R. T., et al, 1998), ela tem importantes implicações econômicas. As epidemias em São Miguel/RN acontecem durante a época da colheita de arroz e incapacitam um grupo vulnerável do ponto de vista econômico cuja renda familiar mensal é de um salário mínimo.

Existem poucos estudos descritos na literatura sobre a leptospirose rural. No Nordeste do Brasil não são conhecidos os fatores para o surgimento dessas epidemias, o impacto clínico da doença na população exposta, grupos populacionais predominantemente atingidos, os fatores de risco para infecção e os reservatórios envolvidos na transmissão. No Rio Grande do Norte, as epidemias rurais apareceram em 1985, nas regiões de minifúndios, onde há cultivo de arroz (SESRN, SUASSUNA, 1985). Durante as epidemias 80% dos casos eram de lavradores de arroz que apresentavam a forma anictérica, menos grave da doença (LIMA, *et al*, 1995; SUASSUNA, 1985) sendo os casos registrados durante os períodos de maiores índices pluviométricos. Em um estudo preliminar foi encontrada uma relação entre os casos e a exposição ao cultivo do arroz (SUASSUNA, 1985). Um estudo piloto realizado pelo nosso grupo, no ano de 1998, na área rural do município de São Miguel, em residências randomicamente selecionadas foram analisados soros de 87 indivíduos com o objetivo de avaliar o risco de exposição comunitária e o impacto da leptospirose epidêmica nas localizações rurais. Os resultados deste estudo mostraram que 32,4% da população tinham infecção prévia e 2,3% infecção recente, indicando que uma porção significativa da população rural fora exposta a leptospira. Entre as pessoas que apresentaram sorologia positiva, 57% eram do sexo masculino e 42,3% do sexo feminino. Com base nestes resultados, foi proposto um estudo para avaliar a soroprevalência de infecção prévia na população rural e identificar as atividades ocupacionais de risco criando assim, condições iniciais para que o processo de exposição seja compreendido. Os resultados do estudo sorológico para detectar anticorpos contra leptospira, demonstraram que uma significativa parte da população (15,2%) foi exposta mesmo com três anos de baixos índices pluviométricos registrados na região conforme dados da EMPARN, 2000. (LACERDA, 2002).

Portanto, foi evidenciado que a população rural de São Miguel/RN é exposta a leptospira, a doença parece se comportar de forma endêmica existindo exposições contínuas que atingem a população, a maioria dos casos ocorre em períodos de maior índice de chuvas associadas à colheita do arroz em locais alagados e que as crianças estão sendo também atingidas tendo como provável fonte de infecção as atividades de lazer nas águas dos arrozais, onde acompanham os pais, durante a colheita (LACERDA, 2002). Os dados deste estudo foram importantes no sentido de direcionar estudos subsequentes visando caracterizar as formas de transmissão da leptospira na região.

Entre as várias medidas de proteção utilizadas na leptospirose, como, o controle de roedores, equipamentos de proteção individual, vacinação de animais, além das medidas de saneamento básico e educação sanitária, a quimioprofilaxia é considerada como uma medida de controle importante em áreas endêmicas. Entretanto, o uso de qualquer medida profilática deve levar em consideração as peculiaridades regionais e os grupos de indivíduos susceptíveis. Em algumas regiões, a transmissão da doença é limitada a um curto período a cada ano. Nestes casos, a quimioprofilaxia com drogas como a doxiciclina utilizada semanalmente durante a exposição pode ser a solução para reduzir o impacto de epidemias de leptospirose (SEHGAL, *et al*, 2000). Nosso objetivo foi avaliar a efetividade dessa droga em uma população sob risco ocupacional durante o cultivo de arroz.

Os resultados obtidos revelam que a leptospirose em São Miguel é uma doença que possui um grande impacto, com uma taxa de soroprevalência pré e pós-colheita de 14,2% (n=22) e 16,6% (n=27) respectivamente. Em outras regiões rurais do país, inquéritos soro-epidemiológicos têm demonstrado soropositividade entre moradores susceptíveis. Numa pesquisa entre arroteiros na cidade de Manga (MG) foi encontrada uma prevalência de 8,9% de indivíduos com infecção prévia através do teste de aglutinação (BRITO, MOREIRA, MODENA, 1992). Estudos realizados em comunidades rurais de Santa Catarina mostraram que 12% dos agricultores apresentaram anticorpos contra leptospira (AMMON, FLORES, 1987). No Ceará, a leptospirose apresentava um comportamento endêmico na região metropolitana de Fortaleza. Em 1995, houve uma epidemia atingindo os agricultores de arroz nas cidades de Várzea Alegre, Lavras da Mangabeira e Cedro. A doença acometeu principalmente os homens, agricultores de arroz, com idade entre 20 a 40 anos, os quais apresentaram a forma anictérica da doença, semelhante aos achados aqui relatados (LIMA, *et al*, 1995).

O elevado percentual de indivíduos do sexo masculino (90,9%) observado na população estudada era esperado considerando-se a atividade profissional. Da mesma forma, em Nova Caledonia, PERROCHEAU, *et al*, descreveram que as epidemias ocorriam em período de chuvas e os casos eram na maioria trabalhadores de fazendas do sexo masculino. Quanto à faixa etária, a alta frequência de indivíduos entre 10 e 19 anos (23,2%) verificada neste estudo é explicada pelo hábito de crianças e adolescentes acompanharem os pais seja para ajudar na atividade ocupacional, seja como atividade recreacional (PERROCHEAU, PEROLAT, 1997). Na região rural de Trinidad e Barbados, onde as exposições tinham grande impacto na faixa etária entre 7 e 14 anos, estavam associadas ao tipo de atividade ocupacional dos pais (EVERARD, HAYES, EDWARDAS, 1989).

A taxa de soroconversão de 8,6% (n=10) encontrada entre os agricultores de arroz da região de São Miguel quando analisada estatisticamente pelo Teste do qui-quadrado de MacNaman mostrou que o percentual daqueles que se mantiveram negativos é bem superior em relação ao percentual daqueles que se mantiveram positivos, sugerindo um efeito profilático da doxiciclina uma vez que a área é endêmica e os agricultores se expuseram a um grande risco de infecção. Soroconversão também foi observada em indivíduos conforme tenham utilizado calçado ou não durante a colheita de arroz. Caminhar em águas potencialmente contaminadas é um importante fator de risco. O percentual de positividade foi de 6,8% entre os que trabalharam calçados e de 8,69% entre os que trabalharam descalços. A diferença não foi estatisticamente significativa ($\chi^2=0,132$ e $p=0,717$ com 1 grau de liberdade, entretanto, a razão de Odds foi de 1,30, indicando uma chance de 30% a mais em contrair a infecção quando trabalharam descalços. O pequeno número de indivíduos estudado, descalços (n=44) e calçados (n=69).

Na análise de intervenção com doxiciclina, o percentual de positividade de 8,8% entre aqueles que utilizaram a doxiciclina e de 11,1% entre aqueles que não usaram a droga não apresentaram diferença estatisticamente significativa, porém a razão de Odds de 1,29, indica que os indivíduos que afirmaram não terem usado a droga tiveram um risco adicional de 29% de contraírem a infecção. A doxiciclina na dose de 200mg/semana não reduziu a incidência de aquisição de leptospirose, entretanto, reduziu o tempo da sintomatologia da doença e a mortalidade durante as epidemias (SEHGAL, *et al*, 2000). Diferentemente, um estudo realizado no Panamá mostrou que a doxiciclina foi profilática contra a leptospirose. Neste estudo foi administrados doxiciclina (200mg) e placebo semanalmente por três semanas a 940 soldados americanos voluntários que participavam de treinamentos militares no Panamá. No grupo placebo (471), ocorreu 20 casos de leptospirose, quando comparado a apenas um caso no grupo

com doxiciclina ($p = 0,001$), mostrando uma eficácia de 95% (TAKAFUJI, *et al* 1984). Certamente, fatores relacionados ao nível educacional da nossa população, 43,9% eram analfabetos e 55,5% tinham o primeiro grau incompleto, tenham contribuído para a baixa adesão ao uso da doxiciclina antes de todas as exposições provocando grande redução do tamanho amostral ($n=34$). Em São Paulo um estudo avaliou a eficácia da prevenção da leptospirose com doxiciclina após exposição de alto risco e de curto período de tempo e apesar de haver uma associação protetora nos casos confirmados e soroconversão, a associação não foi estatisticamente significativa devido ao pequeno número de indivíduos envolvidos no estudo (GONSALEZ, *et al*, 1998).

A prevenção da leptospirose está diretamente relacionada com a melhoria das condições sócio-econômicas da população. Contudo, em algumas situações de exposições de alto risco, a profilaxia utilizando drogas de alta eficácia poderia ser importante, especialmente em países tropicais, onde a leptospirose ainda é uma infecção endêmica. Outros estudos de efetividade de drogas com potencial profilático, envolvendo um maior número de indivíduos e envolvendo outras atividades de risco ocupacional são ainda necessários para definir melhor o papel da quimioprofilaxia na leptospirose.

6. CONCLUSÕES

1. A soroprevalência de leptospirose em agricultores de arroz do município de São Miguel/RN foi de 14,2% (n=22) antes da colheita e de 16,6 (n=27) após a colheita.
 2. A taxa de soroconversão foi de 8,6% (n=10).
 3. Agricultores que trabalharam descalços tiveram um risco adicional de 30% em adquirir a infecção.
 4. O percentual dos agricultores que se mantiveram negativos pós-colheita de arroz (91,4%) é superior ao percentual dos agricultores que se mantiveram positivos (56,3%) sugerindo um efeito profilático da doxiciclina nesta população.
 5. Agricultores que não tomaram doxiciclina tiveram um risco adicional em 29% em contraírem leptospirose.
-

7. REFERÊNCIAS

- ABDULKADER, R. C. et al. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 44 (2):79-83, 2002.
- ADLER, B. FAINE, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infectious. **Infect. Immun.** 17:67-72, 1977.
- ALANI, F. S. S., et al. Leptospirosis presenting as atypical pneumonia, respiratory failure and pyogenic meningitis. **J Infect. Dis.** 27:281-283, 1993.
- ALLEN, P., RAFTERY, S., PHELAN, D. Massive pulmonary haemorrhage due to leptospirosis. **Intensive Care Med.** 15:322-324, 1989.
- ALMEIDA, L.P. Estudo retrospectivo de reservatórios animais e vias de transmissão para leptospirose em cinco categorias de trabalhadores. Pelotas. Dissertação de Mestrado–Faculdade de Veterinária da UFP. 1991.
- ALVES, V. A. et al. Leptospiral antigens *L. interrogans* serogroup *ictero-hemorrhagiae* in the kidney of experimentally infected guinea-pigs and their reation to the pathogenesis of renal injury. **Experimental Pathology**. 42:81-93, 1991.
- AMMON, G. J., FLORES, J. C. Contribuição para o estudo das Leptospiroses no município de Turvo, estado de Santa Catarina. **Rev. Ciencia Saúde** 5: 118-127, 1987.
- ANDRADE, J., BRANDÃO, A. Contribuição ao conhecimento da epidemiologia da leptospirose humana, com especial referência ao Grande Rio, Brasil, no período de 1970 a 1982. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 82:91-100, 1987.
- ASHFORD, D. A. et al. Assymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicarágua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 63: 249-254, 2000.
- AZEVEDO, R., CORREA, M. O. A. Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade do Recife em 1966. Aspectos epidemiológicos laboratoriais e clínicos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 28:85-111, 1968.
- BALLARD, S. A. et al. Interactions of virulent and avirulent leptospire with primary cultures of renal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.** 21:59-67, 1986.
-

-
- BARCELOS, C., SABROZA, P. C. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in flood-related outbreak in Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública** 17:59-67, 2000.
- BERENDSEN, H. H., et al. Adult respiratory failure with leptospirosis. **Ann. Intern. Med.** 101:402, 1984.
- BERTHERAT, E. et al. Leptospirosis and Ebola virus infection in five gold-panning villages in northeastern Gabon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 60 610-615, 1999.
- BOLIN, C. A. KOELLNER, P. Human to human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. **J. Infect. Dis.** 158: 246-247, 1988.
- BOLIN, C. A., CASSELS, J. A., ZUERNER, R. L., TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar hardj type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am. J. Vet. Res.** 52:1639-1643, 1991.
- BOLIN, C. A., ZUERNER, R. L., TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am. J. Vet. Res.** 50:2004-2008, 1989.
- BRANDÃO, A. P. et al. Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.** 36; 3138-3142, 1998.
- BRENNER, D. J., et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov. and four new *Leptospira* genomosepecies. **Inst. J. Syst. Bact.** 49:839-858, 1999.
- BRITO, M. G. MOREIRA, E. C. MODENA, C. M. Aglutininas anti-leptospiras em arrozeiros e roedores silvestres de Manga, MG, 1992. **Revista Médica de Minas Gerais.** 4: 94-97, 1994.
- CAMARGO, E. D. et al. ELISA-IgM applied to cerebrospinal fluid in human leptospirosis. Serodiagn. **Imunother. Infect. Dis.** 7: 19-22, 1995.
- CAMARGO, E. D., et al. Avaliação do teste ELISA-IgM no diagnóstico precoce da leptospirose humana. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 34: p. 355-357, 1992.
-

-
- CHU, K. M., RATHINAM, R., NAMPERUMALSAMY, P., DEAN, D. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India. **J. Infect. Dis.** 177:1314-1321, 1998.
- CICERONI, L. et al. Human leptospirosis in Italy, 1986-1993. **Eur. J. Epidemiol.** 11:707-710, 1995.
- CICERONI, L. et al. Prevalence of leptospiral infections in humans in Cordillera Province, Bolivia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 89:385-386, 1995.
- CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrose factor α from human monocytes. **FEMS Microbiol. Lett.** 138:211-214, 1996.
- COCKBURN, T. A. et al. Human leptospirosis associated with a swimming pool, diagnosed after eleven years. **Amer. J. Hyg.** 60:1-7, 1954.
- COSTA, E. A. et al. Aspectos epidemiológicos da leptospirose em Salvador, Bahia. **Bol. Epidemiol.** 2:57-61, 64-8, 1970.
- DAI, B. Advances in research of leptospira and human leptospirosis in China (review). **Chin Med Sci J.** 7:239, 1992.
- DE BRITO, T., et al. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: Pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 81:207, 1987.
- DE MARIA, R. et al. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. **J. Exp. Med.** 180:1999-2004, 1994.
- DIAMENT, D. et al. Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glicolipoprotein. **Infect. Immun.** 1677-1683, 2002.
- DOBRINA, A. et al. *Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.** 63:2995-2999, 1995.
- EDWARDS, G. A. DOMM, B. M. Human leptospirosis. **Medicine.** 39:117-156, 1960.
-

-
- ELLIS, W. A. et al. Immunity to bovine leptospirosis. Proceedings of the 21st World Buiatrics Congress. Punte Del Este. Uruguay, 2000.
- ELWELL, M. R. et al. Doxycycline prophylaxis for experimental leptospira infection in non-human primates and hamsters. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 16:268-273, 1985.
- EMPARN. Empresa de pesquisa agropecuária do Rio Grande do Norte. Boletim pluviométrico anual, 2000.
- EVERARD, C. O. R. et al. An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. **J Trop Med Hyg** 95:13-22, 1992.
- EVERARD, C. O. R., HAYES, R. J., EDWARDS, C. N. Leptospiral infection in school-children from Trinidad and Barbados. **Epidemiol Infect** 103: 143-156, 1989.
- EVERARD, C. O. R., HAYES, R. J., FRASER-CHANPONG, G. M. A serosurvey for Leptospirosis in Trinidad among urban and rural dwellers and persons occupationally at risk. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 79:96-105, 1985.
- EVERARD, J. D., EVERARD, C. O. R. Leptospirosis in the Caribbean. **Rev. Med. Microbiol.** 4: 114-122, 1993.
- FAINE, S. (ed) Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva, World Health Organization, 1982 (WHO offset publication n 67).
- FAINE, S. B., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. Leptospira and Leptospirosis. Melbourne, Australia: **Medi Sci.** 1999.
- FAINE, S. Leptospira and Leptospirosis. **CRC Press, Boca Raton.** Fla, 1994.
- FARR, R. W. Leptospirosis. **Clin Infect Dis.** 21: 1-6, 1995.
- FARR, R. W. State-Of-The-Art Clinical Article. **Clin. Infec. Dis.** 21:1-8, 1995.
- FEIGIN, R. D. ANDERSON, D. C. Human leptospirosis. CRC Critical Reviews in Clinical and Laboratory Sciences. 5:413-465, 1975.
- GALLI, M. et al. Immune complexes in leptospirosis. **Infection** 13:156, 1985.
-

-
- GONÇALVES, A. J. R. et al. Leptospiroses – revisão de 90 pacientes internados no Hospital Estadual de São Sebastião (Rio de Janeiro), no período de janeiro/76 a dezembro/77. **Folha Med.** 82:93-102, 1981.
- GONSALEZ, C. R. et al., Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med Trop São Paulo.** 40: 59-61, 1998.
- GUIDUGLI, F., CASTRO, A. A., ATALLAH, A. N. Systematic Reviews on Leptospirosis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 42(1)47-49, 2000.
- GUIDULI, F. CASTRO, A. A. ATALLAH, A. N. Antibiotics for preventing leptospirosis (Cochrane Review), Cochrane Library, issue 4. Update Software, Oxford, U.K. 2000.
- HAAKE, D. A. et al. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. **Clin Infect Dis.** 34:40-43, 2002.
- HAAKE, D. A., et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun.** 67(12)6572-82, 1999.
- HAAKE, D. A., et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect. Immun.** 68:2276-2285, 2000.
- HARRISON, N. A., FITZGERALD, W. R. Leptospirosis-Can it be a sexually transmitted disease? **Postgrad. Med. J.** 64:163-164, 1988.
- HILL, A. V. S. Genetic susceptibility to malaria and other infectious disease: from the MHC to the whole genome. **Parasitol.** 112(S)75-84, 1996.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo 2000, Município de São Miguel, Rio Grande do Norte.
- MATSUO, K., ISOGAI, E., ARAKI, Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. **Microbiol. Immunol.** 44(11):887-890, 2000.
- ISOGAI, E., et al. Role of platelet-activating factor (PAF) on cellular responses after stimulation with leptospire lipopolysaccharide. **Microbiol. Immunol.** 41(3)271-275, 1997.
-

-
- JOST, B. H., ADLER, B., VIHN, T., FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J. Med. Microbiol.** 22:269-275, 1986.
- KARPLUS, T. M., et al. An association between the TNF locus and genetic susceptibility to *Leishmania chagasi*. **Infect. Immunol.** 70(12)6919-25, 2002.
- KELLEY, P. W. Leptospirosis. p. 1580-1587. In S. L. Gorbach. J. G. Bartlett and N. R. Blacklow (ed). **Infect Diseases**. 2nd ed. W. B. Saunders. Philadelphia, Pa.
- KIM, J. S. Leptospirosis: a newly identified disease in Korea, Asia. **Asia Pac J Public Health** 1 61-68, 1997.
- KOBAYASHI, Y. Clinical observation and treatment of leptospirosis. **J. Infect. Chemother**: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy. 7(2)59-68, 2001.
- KOBAYASHI, Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. **J. Infect. Chemother.** 7:10-15, 2001.
- KOCEN, R. S. Leptospirosis: A comparison of symptomatic and Penicilin Therapy. **BMJ.** 1181-1183, 1962.
- LACERDA, H. G. Estudo de Soroprevalência para Leptospirose, no Município de São Miguel/RN. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal da Bahia, 2002.
- LEVETT, P. N. et al. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 8;349-351, 2001.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbial. Rev.** 14:296-326, 2001.
- LIMA, C. C. C. et al. Leptospirose no Ceará em 1995. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** 29: 95, 1996.
- LOMAR, A. V., DIAMENT, D., TORRES, J. R. Leptospirosis in Latin América. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** 14:23-39, 2000.
- LUCCHESI, P. M., PARMA, A. E. A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 71:173-179, 1999.
-

-
- MACEDO-SANTOS, R. T. et al. Glicoproteína de *Leptospira interrogans* sorogrupo icterohaemorrhagiae: distribuição em fígado e rim de cobaias experimentalmente infectadas. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 31:235-241, 1989.
- MANDELL, G., DOUGLAS, R., BENNETT'S, J. E. Principles and Practice of infectious diseases. 4^a ed. Volume II.
- MARTINS, M. G. et al. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. **Ocul. Immunol. Inflamm.** 6:75-79, 1998.
- MASUZAWA, T., et al. Immunological reactivity and passive protective activity of monoclonal antibodies against protective antigen (PAg) of *Leptospira interrogans* serovar lai. **Zentbl. Bakteriologie A.** 272:328-336, 1990.
- MCGRATH, H., et al. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospire by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. **Pathology.** 16:243-249, 1984.
- MILLAR, B. D., CHAPPEL, R. J., ADLER, B. Detection of leptospire in biological fluids using DNA hybridization. **Vet. Microbiol.** 15:71-78, 1987.
- MURGIA, R., RIQUELME, N., BARANTON, G., CINCO, M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. **FEMS. Microbiol. Lett.** 148:27-34, 1997.
- NAIMAN, B. M. et al. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. **Infect. Immun.** 69(12):7550-7558, 2001.
- NICODEMO, A. C. et al. Alterações hematológicas na leptospirose. **Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 31:71-79, 1989.
- PARK, S. H., BYUNG-YOON, A. H. N., MIN-HA, K. Expression and immunologic characterization of recombinant heat shock protein 58 of *Leptospira* species: A major target antigen of the humoral immune response. **DNA Cell Biol.** 18(12):903-910, 1999.
- PARK, S-K., et al. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: A study of 93 patients. **Am J Trop Med Hyg.** 41:345, 1989.
-

-
- PARMA, A. E. et al. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospire by means of the polymerase chain reaction. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 39:203-207, 1997.
- PARMA, A. E. et al. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. **Vet Immunol Immunopathol.** 14:181-185, 1987.
- PEA, L., RODA, L., BOUSSAUD, V., LONJON, V. **Am. J. Crit. Care Med.** 167(5)726-728, 2003.
- PEROLAT, P., et al. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Austrália. **Inst. J. Syst. Bact.** 48:851-858, 1998.
- PERROCHEAU, A. Perolat, P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): A one-year survey. **Eur. J. Epidemiol.** 13: 161-167, 1997.
- PLANK R., DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect.** 2 1265-1276, 2000.
- RAMOS-MORALES, F. et al. The pathogenesis of leptospiral jaundice. **Ann. Intern. Med.** 51:861-878, 1959.
- RATNAM, S. et al. Prevalence of leptospiral agglutinins among conservancy workers in Madras City, India. **J. Trop. Med. Hyg.** 96 41-45, 1993.
- RUSSEL, R. W. R. Treatment of Leptospirosis with Oxytetracycline. **Lancet.** p. 1143-1145, 1958.
- SAENGJARUK, P. et al. Diagnosis of Human Leptospirosis by Monoclonal Antibody-Based Antigen Detection in Urine. **J. Clin. Microbiol.** 480-489, 2002.
- SANCHEZ, R. M., LA PAZ, R. C., ACOSTA, C.L., Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la leptospirosis humana en Cuba. **Rev. Cubana. Med. Trop.** 45:32-41, 1993.
- SCHECTER, M., MARANGONI, D. V. Doenças infecciosas: Conduta diagnóstica e Terapêutica. 2ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan: Leptospirose. p. 145-152, 1998.
-

-
- Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Boletim Epidemiológico-Ocorrência da Forma Pulmonar Grave na Leptospirose. www.saude.pr.gov.br/Boletim_Epidemiologico/Inverno/leptospirose.htm acessado em 22/04/2003.
- Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte. Relatório de Vigilância Epidemiológica para Leptospirose, Natal/RN-Brasil, 1997.
- SEGURO, A. C., LOMAR, A. V., ROCHA, A. S. Acute renal failure of leptospirosis; nonoliguric and hypokalemic forms. **Nephron**. 55:146-151, 1990.
- SEHGAL, S. C. et al. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 13:249-255, 2000.
- SHIMIZU, T. et al. Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. **Microbiol. Immunol**. 31:727-735, 1987.
- SILVA, M. V. et al. Behavior of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. **J. Trop. Med. Hyg**. 98:268-272, 1995.
- SILVA, M. V. et al. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 56:650-655, 1997.
- SLIFKA, M. K., WHITTON, J. L. Clinical implications of dysregulated cytokine production. **J. Mol. Med**. 78:74-80, 2000.
- SMILBERT, R. M. The Spirochaetales. p. 195-228. In A. I. Laskin and H. A. Lechavelier (ed.). CRC handbook of microbiology, 2nd ed. Vol.1 CRC Press. Cleveland, Ohio, 1977.
- SONRIER, C., et al. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**. 19:86-94, 2000.
- SPERBER, S. J., SCHLEUPNER, C. J. Leptospirosis: A forgotten cause of aseptic meningitis and multisystem febrile illness (review). **South Med J**. 82:1285, 1989.
- SUASSUNA, F. et al. Surto epidêmico de Leptospirose em plantadores de arroz na região Oeste do estado do Rio Grande do Norte de março a junho de 1985. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 19: 116, 1986.
-

-
- TAJIKI, M. H., NAKAMA, A. S., SALOMÃO, R. The ratio of plasma levels of IL10/TNF α and its relationship to disease severity and survival in patients with leptospirosis. **Braz. J. Infect. Dis.** 1:138-141, 1997.
- TAJIKI, M.H., NAKAMA, A. S., SALOMÃO, R. The ratio of plasma levels of IL-10/TNF- α and its relationship to disease severity and survival in patients with leptospirosis. **Braz. J. Infect. Dis.** I:138-141, 1997.
- TAKAFUJI, E. et al. A efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. **N. Engl. J. Med.** 310:497-500, 1984.
- TANKAKUL, W. et al. Risk factors associated with leptospirosis in Northeastern Thailand, 1998. **Am. J. Trop.Med. Hyg.** 63:204-208, 2000.
- TERPSTRA, W. J. et al. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labelled DNA probes. **J. Gen. Microbiol.** 133:911-914, 1987.
- TERPSTRA, W. J., LIGTHART, G. S., SCHOONE, G. J. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. **J. Gen. Microbiol.** 131:377-385, 1985.
- TERPSTRA, W. J., SCHOONE, G. J., SCHEGGET, J. T. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridization with ³²P and biotin-labelled probes. **J. Med. Microbiol.** 22:23-28, 1986.
- TORTEN, M. Leptospirosis. In H. E. Stoenner, M. T., Kaplan, W. (ed.) CRC handbook series in zoonoses, section A: bacterial, rickettsial and mycotic diseases, vol1. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- TREVEJO, R. T. et al. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage in Nicaragua, 1995. **J Infect Dis.** 178:1457-1463, 1998.
- TRUCCOLO, J. et al. Quantitative PCR assay to Evaluate Ampicilin, Ofloxacin, and Doxycycline for treatment of Experimental Leptospirosis. **Antimicrob Agents Chemother.** .46 (3) 848-853, 2002.
- TURNER, L. H. Leptospirosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 61:842-855, 1967.
- VIHN, T., ADLER, B., FAINE, S. Glicoliprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **J. Gen. Microbiol.** 132:111-123, 1986.
-

-
- VINH, T., ADLER, B., FAINE, S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **J. Gen. Microbiol.** 132:103-109, 1986.
- WAITKINS, S. A. Leptospirosis as an occupational disease. **Br. J. Ind. Med.** 43:721-725, 1986.
- WATT, G. L., et al. Placebo-controlled trial of intravenous penicilin for severe and late leptospirosis. **Lancet.** i:433-435, 1988.
- WERTZ, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR 2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.** 2(4):286-288, 2001.
- WOO, T. H. S., et al. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. **FEMS Microbiol. Lett.** 150:9-18, 1994.
- YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H. et al. Cellular immune response analysis of patients with leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45(1):138-145, 1991.
- YOU, Z., et al. Immunogenicity and immunoprotection of a leptospiral DNA vaccine. **Hua Xi Ke Da Xue Xue Bao.** 30(2):128-32, 1999.
- YOUNES-IBRAHIM, M. et al. Inhibition of Na, K-ATPase by endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis. **C. R. Acad. Sci.** 318:619-625, 1995.
- ZAKI, S. R., SHIEH, W. J. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicarágua, 1995. The epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicarágua (letter). **Lancet.** 347:535, 1996.
- VADO-SOLIS, I., et al. Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucata, México. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 44(6):335-40, 2002.
- MCCLAIN, J. B., et al. Doxycycline Therapy for Leptospirosis. **Ann Intern Med.** 100:696-698, 1984.
- CICERONI, L., et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. **Eur J Epidemiol.** 16(1):79-86, 2000.
-

BOVET, P., et al. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based control study in the Seychelles (Indian Ocean). **Inter J Epidemiol.** 28:583-590, 1999.

KUPEK, E., et al. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 4(3):131-134, 2000.

EDWARDS, C. N., et al. Leptospirosis in Barbados. **West Indian Med J. J.** 39:27-34, 1990.

DAMUDE, D. F., et al. The problem of human leptospirosis in Barbados. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 73:169-177, 1979.

SEGUNDA VISITA

Data da segunda visita ____/____/____

IV. COMPORTAMENTOS DE RISCO

As perguntas a seguir referem-se aos dois meses anteriores ao início dos sintomas.
 Marque: 1=Sim; 0=Não; 8=Não se aplica; 9=Não respondeu .

1. Quando choveu você participou do cultivo de arroz?
2. Quais as atividades fez? Plantou Colheu Bateu Carregou
3. Quantos dias trabalhou na coleta nas últimas duas semanas? dias
4. Em sua propriedade
5. Em outras propriedades Qual sitio? _____
6. Trabalhou descalço?
7. Usou botas?
8. Usou chinelo?
9. Se não trabalhou entrou na água do arrozal? Se sim por que? _____
10. Onde observou ratos? Qual a cor do rato?
11. Dentro de casa Cinza , Preto , Marrom , Vermelho
12. Peridomicílio Cinza , Preto , Marrom , Vermelho
13. Campo Cinza , Preto , Marrom , Vermelho
14. Tomou banho nas últimas duas semanas em? Açudes Riachos Outros
15. Abateu animais nas duas últimas semanas?

V. DADOS DO USO DE PROFILAXIA

1. Recebeu doxiciclina?
2. Quando recebeu a doxiciclina? _____
3. Tomou a doxiciclina?
4. Tomou 1ª semana data ____/____/____
 2ª semana data ____/____/____
5. Quando iniciou as tomadas? _____
6. Se não tomou por que? _____
7. Teve reações adversas?

Quais? _____

VI DOENÇAS DURANTE O PERÍODO

1. Teve febre durante a colheita do arroz?
2. Se sim quando? ____/____/____
3. Quanto tempo durou? dias
4. Quantas vezes?
5. Teve outros sintomas? Dor de cabeça , Dor muscular ,

 Olhos vermelhos
6. Quantos dias ficou acamado?
7. Quantos dias faltou o trabalho?
8. Procurou hospital?
9. Recebeu tratamento?
- Qual? _____
10. Outras pessoas com quem vc trabalhou ficaram doentes?
-

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Consentimento para Investigação Clínica: Pág. 1

Título do Projeto: Epidemias Emergentes de Leptospirose no Nordeste do Brasil

Estudo observacional

Paciente: _____ **Nº no Projeto de Pesquisa:** _____

Para ser lido a todos os pacientes adultos: As informações, a seguir, descreverão o estudo e seu papel ou o papel de seu filho, como participante do mesmo. O entrevistador responderá quaisquer perguntas que você possa ter sobre este questionário e sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações fornecidas.

Propósito do Estudo: Estamos convidando você a participar de um estudo que estamos realizando, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte e na Fundação Oswaldo Cruz, em Salvador, sobre a Leptospirose, que é comumente conhecida com “a febre do rato”. As pessoas ficam infectadas com Leptospirose quando entram em contato com a água contaminada com a urina de ratos ou outros animais. A doença pode causar febre, dor muscular, dor de cabeça e, as vezes, os doentes desenvolvem sintomas graves que necessitam de hospitalização. Estamos solicitando para você participar porque a Leptospirose é comum na sua comunidade e as pessoas que participam da coleta do arroz tem alto risco para adquirir essa doença. A Secretaria Municipal de Saúde está planejando implementar um programa de prevenção contra a leptospirose em sua região. Esse tratamento é uma importante maneira de prevenir infecção com leptospirose. O objetivo deste estudo é para avaliar qual o benefício dessa prevenção nas pessoas com risco de adquirir leptospirose.

Procedimentos a serem seguidos: Se você decidir, voluntariamente, a participar, após ter lido este termo de consentimento, o investigador perguntará questões a respeito de onde você mora, suas ocupações e suas doenças anteriores. Um técnico de laboratório treinado ou médico coletará 10 mililitros (1 colher de chá) de sangue. Pode haver somente dor e uma pequeno hematoma no local onde o sangue foi coletado, mas isto raramente ocorre. Nós precisaremos de uma segunda amostra de sangue daqui a 2 meses para verificar se você teve leptospirose durante esse período. Os resultados deste exame não terão impacto no seu estado atual de saúde.

Confidencialidade: Suas respostas durante a entrevista e a informação do exame médico serão confidenciais e apenas você, o responsável pelo seus cuidados médicos no centro de saúde e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado em nenhum artigo ou publicação resultante deste estudo.

Participação Voluntária: Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar a participar ou interromper a participação em qualquer hora durante o estudo. Você não precisa, caso não queira, responder a nenhuma questão durante a entrevista ou avaliações diárias. Sua recusa em participar em todo ou parte deste estudo ou sua decisão em interromper a participação não afetará seus cuidados presentes e de nenhum modo prejudicará suas relações presentes ou futuras com a Secretaria Municipal de Saúde. Será dada a você cópia deste termo de consentimento. Você não será responsável por nenhum custo associado a este estudo.

