

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETERMINAÇÃO DE ÁREAS DE RISCO DE LEPTOSPIROSE HUMANA A
PARTIR DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM RATOS (*Rattus norvegicus*)

MAYSA PELLIZZARO

Botucatu - SP

Março, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETERMINAÇÃO DE ÁREAS DE RISCO DE LEPTOSPIROSE HUMANA A
PARTIR DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM RATOS (*Rattus norvegicus*)

MAYSA PELLIZZARO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni
Co-Orientador: Profa. Dra. Camila
Marinelli Martins

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pellizzaro, Maysa.

Determinação de áreas de risco de leptospirose humana a partir do diagnóstico molecular em ratos (*Rattus norvegicus*) / Maysa Pellizzaro. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Camila Marinelli Martins

Capes: 50502000

1. *Leptospira*. 2. Fatores de risco. 3. Ratos. 4. Leptospirose. 5. Zoonoses.

Palavras-chave: *Leptospira* spp; fatores de risco; rato de esgoto.

Nome da Autora: Maysa Pellizzaro

Título: Determinação de áreas de risco de leptospirose humana a partir do diagnóstico molecular em ratos (*Rattus norvegicus*)

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

Membro externo

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal do Paraná – Curitiba

Data da defesa: 02 de março de 2018.

Dedicatória

*A todas as pessoas que trabalham direta ou indiretamente
com saúde pública no Brasil, e dedicam seu tempo para
desenvolver estratégias para melhorias das condições
dos desfavorecidos da nossa sociedade desigual.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Catia Mara Pellizzaro e Valdemar Pellizzaro, por acreditarem nos meus sonhos e dedicarem suas vidas para que fosse possível trilhar meu caminho até aqui. Todo meu amor a vocês.

Ao meu irmão Estevam Pellizzaro, que trouxe ao mundo minha sobrinha Bianca, que reacendeu em mim a vontade de trabalhar por um mundo melhor.

À minha madrinha, Lúcia Pellizzaro Martins, por ser exemplo de mulher num mundo desigual, e mostrar que podemos chegar onde quisermos, se batalharmos com esforço dobrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio Langoni, por acreditar na minha capacidade e abrir as portas da UNESP para que eu pudesse desenvolver este projeto.

À minha coorientadora e amiga, Dra. Camila Marinelli Martins, pela ajuda incansável no desenvolvimento e análises, inclusive nos finais de semana e feriados em Curitiba.

Ao antigo orientador e amigo, Prof. Dr. Alexander W. Biondo, que foi o primeiro a perceber e acreditar na minha capacidade para pesquisa.

À amiga Profa. Dra Vivien M. Morikawa (UFPR) e coordenadora da Unidade de Vigilância de Zoonoses, da Prefeitura de Curitiba, que me apresentou ainda em 2009 a importância da leptospirose no município, e abriu as portas para que eu pudesse explorar os dados da vigilância e desenvolver este trabalho. Agradeço ainda o biólogo, Diogo da Cunha Ferraz, da mesma instituição, que auxiliou na obtenção de dados e tomada de decisões.

À equipe do Laboratório de Zoonoses e Epidemiologia Molecular (UFPR), em nome do Prof. Dr. Rafael F. C. Vieira por cederem o espaço para manipulação das amostras.

Às amigas e mãos voluntárias, alunas de iniciação científica da UFPR, que me ajudaram nas capturas e coletas do projeto: Amanda Haisi, Evelyn Cristine da Silva, Suzana Maria Rocha e em especial à Ana Carolina Yamakawa, que foi meu braço direito e ombro amigo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos residentes da UFPR, que me auxiliaram, principalmente a esclarecer os achados diferentes nas coletas dos roedores: Daniel Agibert da Luz, Daniel C. C. Rocha e Luciana Machado da Silva.

À mestrandia da UFPR, Eloisa Muehlbauer, que foi essencial para que os animais fossem anestesiados de maneira adequada.

À Leila S. Ullmann que foi a primeira pessoa que me apoiou e incentivou a transformar minha vida mudando-me para Botucatu.

À grata surpresa que Botucatu me trouxe, amiga Sâmea F. Joaquim, que foi a primeira a estender a mão e me ajudar na bancada do laboratório e na palavra de conforto. E ao amigo Felipe Dalanezi “Teflon”, por me fazer rir nas horas difíceis e trazer calma no chocolate compartilhado.

À amiga Pamela M. Marson, que dividiu comigo muito mais que o teto de uma casa, mas a companhia na lágrima e na comemoração durante esses dois anos; e à Selene D. Babboni, pelas risadas e gritos nos momentos difíceis.

Aos residentes da “zoonoses”, que passaram pelo laboratório nesses dois anos e me ajudaram no preparo de materiais para esta pesquisa.

Aos demais amigos que me ajudaram de alguma forma no período de desenvolvimento do projeto: Graziela Ribeiro da Cunha, pelas palavras de suporte e abraço e Francisco de Oliveira Conrado, pela amizade a distância e auxílio no inglês. Também aos colegas de pós-graduação e agora amigos Felipe Fornazari, Mariana G. Zanchetta, Giulia S. Latosinski, Simone T. Guerra e Rodrigo I. da Silva.

Aos professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (FMVZ-UNESP), Márcio Garcia Ribeiro e José Carlos F. Pantoja pelo apoio e considerações ao trabalho na banca de qualificação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da bolsa de estudos que foi fundamental para que eu pudesse desenvolver o mestrado de forma exclusiva.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Presence or absence of risk factors on census tract and occurrence of human leptospirosis cases in 2014 and 2015, in Cajuru neighborhood (Curitiba, Paraná, Brazil).....	30
Table 2. Presence or absence of risk factors on census tract and occurrence of <i>Leptospira</i> spp. kidneys' rats captured in Cajuru neighborhood (Curitiba, Paraná, Brazil).....	31

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. It was presented.... selected in bibliography.....	29
--	----

.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
Introdução.....	1
Revisão de literatura.....	2
1. Leptospira e leptospirose.....	2
2. Vigilância Epidemiológica.....	5
3. Roedores na disseminação da leptospirose.....	6
4. Fatores de risco na transmissão da leptospirose urbana.....	7
5. Diagnóstico laboratorial da leptospirose.....	8
6. Análise espacial de risco.....	10
CAPÍTULO 2.....	12
Artigo científico.....	12
CAPÍTULO 3.....	32
Discussão geral.....	32
Conclusões gerais.....	33
Referências Bibliográficas.....	35
ANEXOS.....	41

Pellizzaro, M. Determinação de áreas de risco de leptospirose humana a partir do diagnóstico molecular em ratos (*Rattus norvegicus*). Botucatu, 2018. 55p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A leptospirose é a zoonose que mais acomete pessoas em todo o mundo. A infecção é causada pela bactéria *Leptospira* spp. e os ratos urbanos (*Rattus norvegicus*) são os principais reservatórios. Os principais fatores de risco são: chuvas, alagamentos, enchentes, presença de lixo, esgoto não canalizado, baixa infraestrutura e baixas condições socioeconômicas. O objetivo deste estudo foi determinar áreas de risco para vigilância da leptospirose humana, analisando a prevalência de *Leptospira* spp. em ratos e dados do ambiente. Utilizando informações contidas em bancos de dados oficiais e com base na literatura foram determinados os fatores de risco para leptospirose humana em Curitiba-PR. Foram determinados locais para captura dos ratos e coletados rins para análise molecular. A maioria dos setores foi classificado como de baixo risco de transmissão de leptospirose (17/112; 15,17%). Os fatores de risco mais frequentemente encontrados foram área inundável, esgoto a céu aberto e lixo acumulado. A chance dos setores com alto risco de transmissão foi 1,27 vezes maior que em setores de baixo risco. Foram capturados 25 ratos e a frequência de *Leptospira* spp. foi 17,39% e 68% em soro e rim, respectivamente. Os principais fatores de risco associados aos roedores foram ausências de abastecimento de água, rede ligada a esgoto, pavimentação e com reclamação de roedores. Este estudo reforça a importância da melhoria dos serviços de infraestrutura, diminuindo o contato das pessoas com a bactéria, bem como estratégias de manejo adequado para esses roedores.

Palavras chave: *Leptospira* spp., fatores de risco, rato de esgoto.

Pellizzaro, M. Risk areas determination for human leptospirosis by molecular diagnosis in rats (*Rattus norvegicus*). Botucatu, 2018. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Leptospirosis is the most common zoonosis in the world. Bacteria of the *Leptospira* spp. genus are the causative agents, and urban rats (*Rattus norvegicus*) are its main reservoir. Rain, flooding, garbage, absence of sanitary sewage, low socioeconomic and infrastructure conditions are the major risk factors human infection. This study aimed to define the risk areas for human leptospirosis, by analyzing *Leptospira* spp. prevalence in rats and environmental data. Official data information and literature were used to determine leptospirosis risk factors in Curitiba-PR. Rats were captured at previously determined sites. Kidney samples were collected and molecular tests were performed. Most of the census tracts were classified as low-risk to human leptospirosis (95/112; 84.82%). Risk factors associated with higher frequency of infection were flood area, open sewage, and accumulated garbage. The odds ratio in high-risk census tracts was 1.27 times higher than low-risk areas. Twenty-five rats were captured and the *Leptospira* spp. frequency was 17.39% and 68% in serum and kidney, respectively. The main risk factors associated with the presence of rodents were lack of adequate water supplies and sanitary sewage, unpaved streets, and rodent complaint. This study reinforces the importance of adequate infrastructure services in order to reduce human exposure to the bacteria, as well strategies of rodent control.

Key words: *Leptospira* spp., risk factors, Norway rats.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose que acomete pessoas de maneira acidental. Estima-se que 350-500 mil humanos adoeçam com a forma grave da doença anualmente no mundo (AHMED et al., 2012). Acredita-se que esses dados sejam subestimados devido ao baixo diagnóstico e falta de notificação (ADLER, 2015). No Brasil, cerca de 3.600 casos são registrados por ano, principalmente nas regiões sudeste e sul, com 375 óbitos em média (BRASIL, 2014). A doença em humanos tem relação direta com populações desfavorecidas, onde as condições de infraestrutura são precárias e aumentam os riscos de contato dos humanos com roedores, considerados os principais reservatórios de leptospirose urbana (BHARTI et al., 2003; REIS et al., 2008; FELZEMBURGH et al., 2014; ADLER, 2015).

A vigilância epidemiológica da doença permite estabelecer os fatores predisponentes e determinantes para sua ocorrência e determinar as ações de controle e prevenção (BRASIL, 2014). Os principais fatores associados são moradias precárias, esgotos a céu aberto, baixas condições sanitárias, períodos chuvosos e alagamentos, encontrados principalmente em áreas de ocupação irregular, como favelas, nos centros urbanos (FELZEMBURGH et al., 2014; MWACHUI et al., 2015). As precárias condições de moradia aumentam o risco de exposição a *Leptospira* spp. entre as pessoas que vivem no mesmo ambiente que um paciente sabidamente doente (MACIEL et al., 2008). Ainda, a interação da urbanização exagerada e as mudanças climáticas aumentaram o risco de incidência da doença e da ocorrência de surtos (LAU et al., 2010). O crescimento das favelas também favoreceu as condições para a transmissão de doenças transmitida pelos roedores. Estima-se, de modo preocupante, que até 2030 a população vivendo em condições vulneráveis deverá ultrapassar 2 bilhões de pessoas (COSTA et al., 2015a), e deste modo deverá ocorrer um aumento no número de agravos a saúde pública.

Os ratos são os principais reservatórios da doença, pois eliminam bactérias viáveis na urina, contaminando o ambiente, por tempo indeterminado

(LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003), sem necessariamente adoecerem. Atualmente o manejo de roedores em centros urbanos é deficiente e não existe uma solução eficaz a curto ou longo prazo para diminuir a infestação desses animais, especialmente em áreas de ocupação irregular (BRASIL, 2002; FARIA et al., 2008; COSTA et al., 2014a). Apesar de reservatórios, a presença de roedor e não indica necessariamente risco (OLIVEIRA et al., 2009). Outro fator importante é a técnica utilizada para detecção da *Leptospira* spp. em ratos, pois como são reservatórios assintomáticos, na maioria dos casos não produzem anticorpos. Deste modo, a detecção molecular da bactéria nos rins é a melhor maneira de estimar a prevalência do agente nestes animais (LEVETT, 2001; PICARDEAU, 2013).

Neste contexto, o presente estudo utilizou dados oficiais para estabelecer áreas de baixo e alto risco para leptospirose humana, nos quais amostras de soro e rins de ratos dessas áreas foram analisadas para comparar a ocorrência de *Leptospira* spp. nos diferentes cenários de risco dentro de um mesmo bairro.

REVISÃO DE LITERATURA

1. LEPTOSPIRA E LEPTOSPIROSE

A leptospirose é atualmente a zoonose mais distribuída no mundo. Estima-se que mais de um milhão de casos ocorram anualmente, com mais de 50.000 mortes por ano (COSTA et al., 2015a; TORGERSON et al., 2015). Há aproximadamente duas décadas, a doença estava associada a exposição ocupacional e rural, porém emergiu como doença preocupante no ambiente urbano, especialmente em países em desenvolvimento, devido a ocupação desordenada das cidades, tornando o ambiente adequado para disseminação de roedores e as doenças associadas (KO et al., 1999). Atualmente, mais de um bilhão de pessoas vivem em ambiente considerado de favela, onde epidemias de leptospirose têm sido reportadas (HAGAN et al., 2016).

A infecção é causada por bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira* spp., que possuem aproximadamente 0,1 µm de diâmetro, de 6-10 µm de

comprimento, podendo serem maiores em culturas laboratoriais (LEVETT, 2001; ADLER, 2015). Estruturalmente, possuem camadas de lipopolissacarídeos, que são a base para categorizar o gênero em 24 sorogrupos e mais de 250 sorovares reconhecidos atualmente (EVANGELISTA e COBURN, 2010; ADLER, 2015), relacionado ainda a virulência de cada sorovar. Os sorovares antigenicamente similares são agrupados nos mesmos sorogrupos, por conveniência, apesar de não possuírem, necessariamente, relação taxonômica. Diversos isolados de um mesmo sorovar podem pertencer a diferentes espécies genotípicas de leptospiras e, deste modo, não é possível determinar a espécie envolvida na infecção apenas com exames sorológicos (LEVETT, 2001; EVANGELISTA e COBURN, 2010; ADLER, 2015).

As pessoas se infectam pelas membranas mucosas ou lesões na pele quando expostas a urina de animais infectados ou indiretamente a partir do solo ou água contaminados com a urina de animais (BHARTI et al., 2003; ADLER e MOCTEZUMA, 2010; MWACHUI et al., 2015). Grupos de indivíduos são considerados de risco, devido a maior chance de entrarem em contato com a urina, tais como: veterinários, funcionários de abatedouros, trabalhadores rurais e laboratoristas, entre outros. O risco varia de acordo com a prevalência da doença no local e a frequência de exposição (ADLER, 2015). A maioria das infecções podem ser prevenidas usando equipamentos individuais de proteção. Há relatos de surtos ocorrendo após atividades recreativas e esportes aquáticos (BARTHI et al., 2003), e esse tipo de exposição se tornou importante nos últimos anos, devido ao aumento da popularidade dessas atividades e a facilidade de viajar para lugares que possibilitem tais práticas esportivas.

A doença apresenta duas manifestações principais, síndrome hemorrágica pulmonar e doença renal, com taxa de mortalidade de 10 e 70%, respectivamente (COSTA et al., 2015a). Os dados associados a leptospirose são subestimados pela falta de diagnóstico ou similaridade com outras doenças agudas febris, como dengue, Zika e malária (LAROCQUE et al., 2005; COSTA et al., 2015a). Estudos sobre a confirmação laboratorial de leptospirose humana estimam que em praticamente 50% dos casos suspeitos não são realizados testes laboratoriais para confirmar o diagnóstico (COSTA et al., 2015a). Os

dados de morbidade descritos na literatura referem-se a doença grave e representam somente 5-15% das infecções clínicas (COSTA et al., 2015a).

Pesquisas realizadas no Brasil, revelaram que a ocorrência de casos graves da doença está associada com deficiências de infraestrutura como localização da residência próximo a esgotos abertos e lixo acumulado, áreas de risco de enchente e áreas com alta infestação de roedores (MACIEL et al., 2008; REIS et al., 2008; COSTA et al., 2014a, 2014b; FELZEMBURGH et al., 2014). Apesar de áreas urbanas com alto risco de transmissão de leptospirose serem geralmente caracterizadas por baixas condições sociais e de saneamento, a variabilidade espacial de características ambientais e sociais é extremamente heterogênea (REIS et al., 2008; FELZEMBURGH et al., 2014).

A incidência de leptospirose também é influenciada por fatores climáticos, como chuva, umidade e temperatura (LAU et al., 2010; MWACHUI et al., 2015; HAGAN et al., 2016). Em condições adequadas de temperatura e umidade, as bactérias podem sobreviver por meses em água e solo (LEVETT, 2001; MWACHUI et al., 2015). Em países tropicais, como o Brasil, chuva forte, alagamentos e enchentes estão associados ao aumento do risco de exposição a *Leptospira* spp. (LAU et al., 2010; COSTA et al., 2015a; MWACHUI et al., 2015). Por outro lado, em países desenvolvidos, o risco relacionado a exposição a água está associado a atividades recreativas (MWACHUI et al., 2015). As epidemias urbanas de leptospirose, que estão associadas as fortes chuvas, atingem principalmente, moradores de favelas, devido as condições ambientais inadequadas de saneamento e drenagem, somado a alta infestação de roedores (KO et al., 1999).

Acredita-se que os dados de prevalência da doença sejam subestimados, pois a maioria das pessoas adoecem após retornarem aos seus países de origem, e muitos casos de surtos acabam não sendo identificados e notificados (ADLER, 2015). A falta de estimativas confiáveis do impacto da leptospirose tem levado a diversos esforços para criar barreiras de prevenção e controle da doença. É considerada uma doença importante no contexto da saúde única (do inglês, *one health*), visto que é um problema de saúde animal, de ordem global,

com impacto socioeconômico no mesmo cenário onde ocorrem os casos humanos (COSTA et al., 2015a).

2. VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

A lei orgânica da saúde no Brasil (BRASIL, 1990) define vigilância epidemiológica como “...conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos”. As informações sobre doenças e agravos coletadas durante ações de vigilância epidemiológica permitem que os profissionais de saúde planejem e decidam sobre a execução de controle e prevenção de maneira eficaz.

Os principais objetivos da vigilância epidemiológica na leptospirose são monitorar a ocorrência da doença em áreas de risco, investigar os surtos, identificar os sorovares, direcionar ações de controle e prevenção em localidades onde as pessoas têm maior risco de adoecer e evitar óbitos (BRASIL, 2014).

Os critérios epidemiológicos para determinação de casos suspeitos de leptospirose humana têm relação a exposição a situações que favoreçam a infecção pelo agente, 30 dias antes do início dos sinais e sintomas, como: exposição a enchentes, lama, esgoto, lixo, entulho e moradia em área de risco. A notificação é obrigatória e registrada no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), utilizando ficha própria, para que as ações de vigilância epidemiológica sejam desencadeadas.

A vigilância epidemiológica da doença no Brasil classificou Curitiba como área endêmica para leptospirose humana no ano de 2008, quando o Ministério da Saúde definiu as cidades prioritárias para a vigilância e controle da doença, que ainda permanecem: São Paulo, Rio de Janeiro, Recife, Salvador, Belém, Belo Horizonte e Manaus. No ano de 2015, a taxa de incidência de leptospirose em Curitiba foi de 5,95 e a letalidade de 9,82% (14/142), significativamente maior

quando comparada aos dados do Brasil, no qual a taxa de incidência é 1,73 e letalidade de 7,41% (SINAN, 2016).

A Unidade de Vigilância de Zoonoses, da Prefeitura Municipal de Curitiba, atua nas áreas de ocupação irregular e nos locais mapeados como prioritários no enfrentamento da leptospirose humana na cidade, realizando ações de prevenção da transmissão da doença àquelas pessoas consideradas em risco. O serviço da prefeitura ainda dispõe de solicitação de desratização em bueiros para controle de roedores e disseminação da leptospirose, que pode ser solicitado por qualquer munícipe pelo telefone central da prefeitura (#156). Após essa solicitação, a equipe de técnicos da Unidade de Vigilância em Zoonoses se desloca ao local, verifica as condições predisponentes a presença dos roedores, faz orientações e aplica rodenticidas dentro dos bueiros da região. A equipe de vigilância da leptospirose na cidade conta com 5 técnicos para atender toda região e o número de solicitações para o serviço de desratização ocupa o tempo que deveria ser utilizado para vigilância de áreas prioritárias para leptospirose. Com a sobrecarga do serviço, as áreas com necessidade de atenção no município são negligenciadas. Atualmente, as áreas consideradas de risco no município são mapeadas de forma manual e a análise de dados não conta com as técnicas adequadas. Por comunicação de interesse, o município tem participado de diversos treinamentos para melhorias do serviço de vigilância de leptospirose, incluindo o geoprocessamento dos bancos de dados e a análise das áreas de risco.

3. ROEDORES NA DISSEMINAÇÃO DA LEPTOSPIROSE

No ambiente urbano, duas espécies de ratos, *Rattus norvegicus* (ratazana de esgoto) e *Rattus rattus* (rato de telhado) são os principais reservatórios de *Leptospira* spp. (COSTA et al., 2014). Alguns sorovares de *Leptospira* spp. têm maior afinidade por algumas espécies animais, no entanto roedores, especialmente os sinantrópicos, são reconhecidos por servirem como hospedeiros assintomáticos e de manutenção, já que as bactérias podem colonizar os rins desses animais por tempo indeterminado, sendo eliminadas pela urina (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; HIMSWORTH et al., 2013b). Na

cidade de Salvador, de 7 a 82% dos ratos de esgoto capturados são reservatórios de leptospiros (FARIA et al., 2008; COSTA et al., 2014b).

Estudos realizados no Brasil demonstraram a importância dos roedores sinantrópicos como carreadores de leptospiros nos centros urbanos. Na cidade de Salvador, a prevalência encontrada foi de 63,1% (53/84) e, somente o sorovar Copenhageni, foi implicado na infecção dos ratos (COSTA et al., 2014). Outro estudo mostrou prevalência de 36,2% (17/47) em ratazanas (*R. norvegicus*) no Rio de Janeiro e o sorovar mais comum foi o Icterohaemorrhagiae (MARTINS e LILENBAUM, 2013). Em Curitiba, estudo recente demonstrou prevalência de 23,8% (15/63) nos ratos, com predominância do sorovar não patogênico Patoc (PELLIZZARO et al., 2017).

No Brasil, os programas de controle de roedores empregados pelas prefeituras, como tentativa de reduzir a incidência de leptospirose, são baseados na aplicação de rodenticida químico no ambiente (BRASIL, 2002, 2014). Além do alto custo, a eficácia é duvidosa, pois não leva em consideração os problemas de infraestrutura e magnitude da infestação de roedores nas favelas (COSTA et al., 2014). Estudo conduzido em Salvador, Bahia, sugere que quatro marcadores de infestação de roedor (fezes de rato, tocas, acesso a água e buracos em parede) sejam utilizados para determinar o local ideal para as ações de controle de ratos, para aumentar a eficácia dos programas e diminuir os custos e a contaminação ambiental dos rodenticidas (COSTA et al., 2014).

4. FATORES DE RISCO PARA TRANSMISSÃO DA LEPTOSPIROSE URBANA

A leptospirose é um importante problema de saúde emergente em centros urbanos, especialmente em países em desenvolvimento, devido à expansão desordenada que favoreceu ambiente favorável para a disseminação da *Leptospira* spp. provenientes de ratos (KO et al., 1999; MCBRIDE et al., 2005). Os casos de leptospirose em favelas estão associados a períodos chuvosos, saneamento deficiente, infraestrutura precária e alta infestação de roedores. Fatores de risco conhecidos são proximidade de residência a esgotos abertos,

lixo acumulado, áreas com ocorrência de alagamento associados a presença de roedores (COSTA et al., 2014b, 2015a; MWACHUI et al., 2015).

Estudos realizados em Salvador, BA (FELZEMBURGH et al., 2014; HAGAN et al., 2016), demonstraram que adultos jovens (15-34 anos), do sexo masculino e pessoas de baixo poder aquisitivo são grupos em vulnerabilidade. Além disso, indivíduos expostos a lama contaminada tem alta chance de infecção. O poder aquisitivo foi um fator importante para infecção por *Leptospira* spp., no qual pessoas com menor renda tem mais chance de se infectarem e adoecerem (FELZEMBURGH et al., 2014). Pessoas que trabalham com reciclagem e na construção civil também apresentam alto risco de infecção, devido a exposição a lama e material contaminado com urina de rato. Todos esses fatores são relacionados a condições sociais e ao comportamento individual que intensificam o contato com ambiente contaminado (HAGAN et al., 2016).

5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado de diversas maneiras: testes sorológicos, com detecção de anticorpos; evidência do DNA da bactéria, por meio de testes moleculares; pela cultura ou ainda, observação de *Leptospira* spp. na urina (BHARTI et al., 2003). A maioria dos casos são diagnosticados por meio de testes sorológicos. O diagnóstico bacteriológico é laborioso, pois as leptospirosas requerem meio de cultura específico e o tempo para isolamento é muito longo. As técnicas moleculares têm sido muito utilizadas nas últimas décadas por serem relativamente rápidas e confirmatórias, desde que se use amostra biológica adequada ao momento da infecção (PICARDEAU, 2013).

A classificação das leptospirosas podem ser realizadas por meio de sorogrupos e sorovares ou pela identificação das espécies pelo DNA. As duas classificações apresentam pouca relação (ADLER, 2015). A estrutura de lipopolissacarídeos (LPS) é o que determina o sorovar (diversidade antigênica), que categoriza então as espécies de leptospira em 24 sorogrupos com mais de 250 sorovares (EVANGELISTA e COBURN, 2010). Por outro lado, a análise filogenética do gene 16S rRNA divide as leptospirosas em três grupos:

patogênicas, saprófitos e intermediárias (EVANGELISTA; COBURN, 2010; ADLER, 2015).

O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) é o método de diagnóstico utilizado com mais frequência na rotina e considerado o padrão ouro, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade (BHARTI et al., 2003), mas que será influenciado pelo estágio da infecção no animal (ADLER, 2015). O diagnóstico apropriado depende da utilização de sorovares frequentes na região de estudo e da experiência na interpretação dos resultados (BHARTI et al., 2003; PICARDEAU, 2013). A técnica consiste em diluir e incubar o soro suspeito com uma variedade de cepas (sorovares) e, quando 50% das leptospiros aglutinam, comparadas ao controle, a amostra é considerada positiva (PICARDEAU, 2013). Uma amostra considerada positiva deve ter aumento de quatro vezes o título inicial após 15-21 dias (amostras pareadas), ou converter de negativo para positivo com título $\geq 1:100$ (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; ADLER, 2015). A interpretação é difícil devido a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas (aglutinação) entre sorovares (LEVETT, 2001).

O diagnóstico molecular é rápido e direto, e baseia-se na utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou quantitativa. O teste é mais fidedigno nos estágios iniciais da doença, e diferencia espécies patogênicas e não-patogênicas (BHARTI et al., 2003; ADLER, 2015; WAGGONER e PINSKY, 2016). A detecção objetiva os genes-alvo conservados em todas as espécies da bactéria, patogênicas ou não, como o *16S rRNA*, *secY* e *gyrB*. Ainda é possível utilizar a detecção de genes específicos de leptospiros patogênicas, como o *lipL32* e o *lfb1* (WAGGONER e PINSKY, 2016). É possível utilizar sangue, urina, líquido encéfalo-raquidiano e humor aquoso no diagnóstico molecular (PICARDEAU, 2013; WAGGONER e PINSKY, 2016).

Para a escolha do melhor diagnóstico é preciso levar em consideração os estágios da infecção. A fase aguda (ou septicêmica) dura de 3 a 10 dias e é quando ocorre multiplicação das bactérias no sangue. Por isso, quando se realiza diagnóstico molecular no sangue, este material deve ser coletado até no máximo 15 dias após o início dos sinais e sintomas. Em caso de tratamento com antibióticos, o sangue deve ser coletado até dois dias após o início do

tratamento. A segunda fase da infecção é chamada de fase imune, e inicia em torno de duas semanas após a infecção, durando cerca de 30 dias (BHARTI et al., 2003; PICARDEAU, 2013; ADLER, 2015).

6. ANÁLISE ESPACIAL DE RISCO

A análise espacial, na epidemiologia, trabalha com dados espaço temporais que podem ser conectados à dispersão de doenças ou população em risco (PFEIFFER et al., 2008). Pesquisas que buscam as relações entre saúde e espaço são compostas por características de uma população e do ambiente. Os impactos causados na vida dessas populações, por essas características, podem ser avaliados em estudos ecológicos (BRASIL, 2006). Os estudos ecológicos e as ocorrências de fenômenos de saúde possibilitam encontrar áreas onde ocorrem aglomerados (*clusters*) de casos de doença, os fatores de risco coletivos que expliquem esses aglomerados e analisar hipóteses com diferentes bancos de dados (BRASIL, 2006, 2007; PFEIFFER et al., 2008).

O estudo da ocorrência de doenças utilizando a localização espacial tem sido muito empregado, quando as causas da hipótese estão relacionadas ao ambiente, utilização de serviços de saúde ou análise comportamental dos usuários (STIMSON, 1980). Para isso, utilizam-se áreas geográficas como unidades de observação e as taxas e indicadores epidemiológicos da doença estudada são calculadas para um período, que busca testar uma hipótese. Nesse sentido, conhecer o meio urbano onde ocorrerá o estudo é fundamental para compreender os processos de saúde-doença, bem como a situação da saúde da população estudada, fornecendo subsídios para a gestão local de saúde na determinada área geográfica (BRASIL, 2007).

O conjunto de unidades espaciais são representados por polígonos nos mapas, denominado de unidade de análise, que serão confrontados com dados e calculados os indicadores (BRASIL, 2007). Essas unidades variam de acordo com a escala de investigação: global, regional, local; e com o critério: social, político-administrativo e ecológico (SANTOS; CHOR; WERNECK, 2010). Para realização dos cálculos, além da unidade de análise, define-se também as

variáveis, os indicadores, a natureza das amostras, o método de mensuração e análise, interpretação de resultados e, por fim, as inferências (BARATA, 1997).

Bairros, quando utilizados como unidades de análise, apresentam alta heterogeneidade sócio demográfica, devido ao grande tamanho (SANTOS; CHOR; WERNECK, 2010). Por outro lado, setores censitários são a menor unidade espacial em que um bairro é dividido no Brasil (ACEVEDO-GARCIA, 2001). A utilização desses setores dentro dos bairros, como unidades de análise, tem sido explorada por se tratarem de áreas relativamente homogêneas, pré-definidas e utilizadas em outros estudos epidemiológicos, pois foram desenvolvidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (órgão de referência em estudos populacionais brasileiros) (SANTOS; CHOR; WERNECK, 2010).

As informações para se avaliar os riscos podem ser obtidas de dados secundários em estudos ecológicos. Fontes de dados de agências oficiais do governo são interessantes porque são os dados de melhor qualidade. A comparação dos dados com outros estudos possibilita encontrar dados sobre população, domicílios, economia, serviços de saúde, educação, renda, urbanização, rede pluvial, áreas verdes, saneamento básico, entre outros (BRASIL, 2006).

Os fatores espaciais no risco de infecção por *Leptospira* spp. são importantes no microambiente, pois pequenas alterações no espaço podem ter influência significativa, como medidas de desratização locais, ou alagamentos pontuais. Esses fatores locais que podem aumentar o risco de uma pequena parcela de pessoas são representadas por: vegetação, drenagem, características de solo e condições para proliferação de roedores (TASSINARI et al., 2008; HAGAN et al., 2016). Por isso, estudos que investiguem as variações em pequena escala do risco de transmissão são importantes, para que medidas de intervenção sejam aplicadas de acordo com a necessidade de cada local e população (HAGAN et al., 2016).

CAPÍTULO 2

Artigo científico submetido na Revista de Saúde Pública (USP)

***Leptospira* spp. detection in rats as early spatial predictor for human disease in an endemic area**

Detecção de *Leptospira* spp. em ratos como preditor precoce da doença em pessoas em área endêmica

Human leptospirosis predictor by detection in rats

Maysa Pellizzaro^I, Camila Marinelli Martins^{II,III}, Ana Carolina Yamakawa^{IV},
Diogo Cunha Ferraz^V, Vivien Midori Morikawa^{V,VI}, Fernando Ferreira^{III},
Alexander Welker Biondo^{IV}, Helio Langoni^I

^I Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Sao Paulo State University, São Paulo, Brazil

^{II} Department of Nursing and Public Health, Ponta Grossa State University, Paraná, Brasil

^{III} Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^{IV} Department of Veterinary Medicine, Federal University of the State of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

^V Zoonoses Surveillance Unit, City of Curitiba, Paraná, Brazil

^{VI} Department of Community Health, Federal University of the State of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Correspondence: Dr. Helio Langoni. Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Sao Paulo State, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa Street, s/n, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Email: hlangoni@fmvz.unesp.br

Author's Contribution: Study conception and planning: MP, CMM, ACY, DCF, VMM, FF, AWB, HL. Data collection: MP, CMM, ACY, DCF, VMM. Statistical analysis: MP, CMM, FF, HL. Interpretation: MP, CMM, AWB, HL. Preparation

and review of the manuscript: MP, CMM, ACY, DCF, VMM, FF, AWB, HL. Final review and approval: MP, CMM, ACY, DCF, VMM, FF, AWB, HL. Public responsibility for the content: MP, CMM, AWB, HL.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest

ABSTRACT

OBJECTIVE

To propose an early spatial predictor tool to human leptospirosis in urban settings. Also, molecularly access *Leptospira* spp. in trapped rats, respective environmental data associated, to proof the methodology.

METHODS

Official city records and previous study were used to select risk factors of human leptospirosis in an endemic neighborhood of Curitiba, Brazil. Neighborhood census sectors were divided in high and low-risk areas using the 12 selected factors: flood area, water supply, water course, green coverage, afforestation, sewage network, open sewage, open garbage, garbage collection, dumpster, pavement and rodent complaints. In addition, rats were captured (January to March 2017) in random pre-determined sites, euthanized and their kidneys sampled for further molecular diagnosis. Human cases were obtained from official city records.

RESULTS

Most of the census sectors were classified as low-risk to human leptospirosis (95/112; 84.8%). No significant statistical differences were found in human case frequencies between high and low-risk areas. In overall, kidneys from 17/25 (68.0%) trapped rats were positive for *Leptospira* spp. The main risk factors associated with rodent presence were lack of adequate water supplies ($p=0.04$) and sanitary sewage ($p=0.04$), unpaved streets ($p=0.04$), and rodent complaint ($p=0.04$).

CONCLUSIONS

The present study may have offered a new approach to score leptospirosis transmission risk and compare small areas and their heterogeneity in the same census sector of endemic areas. Environmental risk factors for *Leptospira* spp. transmission within the neighborhood were mainly due to differences in infrastructure and basic services. To the author's knowledge, this has been the first study comparing *Leptospira* in rats as predictor for human disease in the urban setting of a major city. Although with low number of trapped rats herein,

such methodology may be used as basis for more effective interventions, focused in highly risk areas for leptospirosis prior to human cases, reducing morbidity and mortality in low-income areas of urban settings of major cities.

Descriptors: leptospirosis epidemiology, risk factors, environmental, spatial analysis, synanthropic rats, Norway rats, epidemiological surveillance, public health, urban health, early interventions, preventive medicine.

RESUMO

OBJETIVO

Propor uma ferramenta para estimar precocemente áreas de risco para leptospirose humana em ambiente urbano. Também, investigar *Leptospira* spp. por meio molecular em ratos capturados e os dados ambientais associados, para testar a metodologia.

MÉTODOS

Foram utilizados registros oficiais obtidos na prefeitura e um estudo prévio, para selecionar os fatores de risco de leptospirose humana em um bairro endêmico da cidade de Curitiba, Brasil. Os setores censitários do bairro foram divididos em alto e baixo risco, usando 12 fatores selecionados: abastecimento de água, curso de água, cobertura verde, arborização, rede de esgoto, esgoto a céu aberto, lixo a céu aberto, acúmulo de lixo, caçamba de lixo, pavimentação da rua e reclamação de roedores. Além disso, foram capturados ratos (janeiro a março de 2017) em locais pré-determinados aleatoriamente, seguidos de eutanásia e coleta de amostras de rim para diagnóstico molecular. Os dados de casos humanos foram obtidos pelo registro oficial da cidade.

RESULTADOS

A maioria dos setores censitários foram classificados como baixo risco para leptospirose humana (95/112; 84,8%). Não houve diferença estatística entre a frequência de casos humanos e as áreas divididas em alto e baixo risco. No total, 17/25 (68%) ratos foram positivos no diagnóstico molecular de tecido renal. Os principais fatores de risco associados com a presença de roedor positivo foram

abastecimento de água ($p=0,04$) e rede de esgotos ($p=0,04$), ausência de pavimentação nas ruas ($p=0,04$) e reclamação de roedor ($p=0,04$).

CONCLUSÕES

O presente estudo ofereceu uma nova abordagem para ranquear a transmissão da leptospirose e a comparar pequenas áreas e suas heterogeneidades em um mesmo setor censitário de áreas endêmicas. Os fatores de risco ambientais para transmissão de *Leptospira* spp. em uma mesma área foram devido a diferenças de infraestrutura e serviços sanitários básicos. De acordo com o prévio conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo comparando *Leptospira* spp. em ratos como preditor da ocorrência de doença em pessoas, em ambiente urbano de uma grande cidade. Apesar do baixo número de ratos capturados, essa metodologia pode ser usada como base para intervenções mais efetivas, focadas primariamente em áreas de alto risco antes da ocorrência dos casos, reduzindo, deste modo, morbidade e mortalidade em áreas urbanas com população de baixa renda de grandes cidades.

Descritores: epidemiologia da leptospirose, fatores de risco, ambiente, análise espacial, ratos sinantrópicos, rato marrom, vigilância epidemiológica, saúde pública, saúde urbana, intervenção precoce, medicina preventiva.

INTRODUCTION

Leptospirosis has been a reemerging accidental disease with around 350,000-500,000 severe human cases annually reported worldwide, which may be underestimated due to inaccurate diagnosis and notification^{1,2}. The disease has been associated to precarious infrastructure and unfavorable socioeconomic conditions, which may predispose the human contact with Norway rats (*Rattus norvegicus*), reportedly the main reservoirs in urban settings^{1,3-5}.

In Brazil, synanthropic rats have played an important role as *Leptospira* spreaders in poor urban areas, particularly slums⁶, forcing the local city zoonoses units to routinely use chemical rodenticides for indirectly control of leptospirosis incidence^{7,8}. In addition to insufficient infrastructure and lack of basic sanitation, other associated risks such as proximity to open sewage, inadequate waste

disposal, heavy rainfall and flooding areas have reportedly favored the infection⁹⁻¹¹.

Microenvironment differences may significantly influence the leptospirosis transmission due to spatial impact of intervention such as rat and/or flooding control^{12,13}. Thus, such small measure scale may provide a better understand of the local disease dynamics and specific approach in a given area¹³. As rats may be infected along with the absence on seroconversion and onset disease, molecular methods such as PCR have been applied for better diagnosis of *Leptospira* spp. in rats, either on urine and/or tissues such as kidneys^{9,14}. Although such detection may be used as predictor for human exposure and disease, particularly in urban low-income areas, no study to date has been conducted on such microenvironment level. Accordingly, the aim of the present study was to assess two different risk areas for human leptospirosis using serosurvey and molecular detection in rats, spatial analysis, public available data and rodent information.

METHODS

Capture and use of rats herein has been approved by the Ethics Committee on Use of Animals under protocol number 0034/2017, of the São Paulo State University (*FMVZ, UNESP, Botucatu*) which has been authorized the capture, anesthesia and euthanasia in rodents. Additionally, the study has also been approved by the Curitiba City Secretary of Health.

1. Study area

The present study has been conducted at the Cajuru neighborhood (96,200 inhabitants), Curitiba (25°25'47"S, 49°16'19"W), the eighth most populous city in Brazil with approximately 1,751,907 inhabitants. The area has been characterized by heterogeneous, low-income settlements with endemic and free areas of leptospirosis and chosen due to recent reports of human leptospirosis.

The census sector (CS) has been defined by the Brazilian Government as “the territorial unit established for cadastral control, formed by a continuous area located in a single urban or rural space, with dimension and number of households which allows their register by one census person”. As the smallest

official territorial unit with available information of spatial population and social data, the CS was considered homogeneous and used as the sampling unit herein. Database was acquired from the Curitiba Institute of Research and Urban Planning (IPPUC), Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) and Curitiba City Hall.

2. Environmental risk factors

The risk factors for leptospirosis transmission used in the present study have been determined based on available literature of environmental determinants, particularly a recent systematic review and meta-analysis which evaluated risk factors and odds ratios for each factor, according to locality of different continents¹¹.

Relevant risk factors for urban settings were selected from previous studies in South America and based on the socio-cultural similarities. As the census sector (CS) was the sample unit used herein, risk factors related to individual behavior and rural environment were discharged. Thus, the twelve overall risk factors included in this study were the flood area (when heavy rain caused floods or inundations within the CS), water supply (whether the CS was connected to public water network), water course (whether the CS had any underground waterway), green coverage (any public space with green coverage), afforestation (any sector with some tree agglomeration), sewage network (whether the CS was connected to public sewage network), open sewage (any CS point lacking canalized sewage), open garbage (any accumulated garbage), garbage collection (whether the CS has public waste collection), dumpster (whether the CS has public dumpster), pavement (whether CS streets were paved or not, and contact with mud) and rodent complaints (any CS with previous rodent notification).

A total of twelve respective open-access factors with compatible database to geographic CS shape files were spatially tested. Risk factors were attributed to correspondent CS, thus each sector varied on the presence from one to twelve risk factors. The CS was divided in four categories: area with risk factor and human leptospirosis cases (A), area with risk factor and without cases (B), area without risk factors and with cases (C) and area without risk factors and without cases (D). For analysis purpose, as well as to compare the frequency proportion

of positive rats and human cases, A and B were considered high-risk areas and C and D areas with low risk for human leptospirosis transmission.

3. Rodent capture and sample collection

Two census sectors selected by local availability in each of the four areas were randomly selected, with the trap placement location based on CS size. The distance of 30 meters between each trap was used, resulting in ten to fifteen trapping places in the selected CS.

Tomahawk-like traps recommended for small rodents¹⁵ were initially left open with baits for three consecutive days (despite rat entering) to avoid subsequent trapping failure due to neophobic behavior. Daily inspections were performed, followed by trap arming and transportation to laboratory (when rats were inside) at the fifth day. The captures were carried out between January to March 2017.

At the laboratory, rat traps were carefully placed into a plastic box and rats anesthetized using isoflurane infusion, followed by maintenance with individually adapted masks. Animals were weighed, sexed, blood samples obtained by intracardiac puncture followed by euthanasia with potassium chloride overdose and kidney fragments collected.

4. *Leptospira* molecular diagnosis

A commercially available kit (Illustra, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) was used for rat kidney DNA extraction. The polymerase chain reaction (PCR) was performed using a pair of primers who targeted the *Leptospira* 16S ribosomal gene, which no differences between pathogenic and saprophytic species, as previously described^{16,17}.

5. Statistics

As potential *Leptospira* carriers, frequencies of positive rodents were exclusively based on kidney PCR results. Data was analyzed using descriptive statistic and association with sex and age verified by chi-square or Fisher's exact test, when applied. The statistical significance was considered when $p\text{-value} \leq 0.05$. Association with each risk factor was individually performed and the intensity of association evaluated by odds ratio and 95% confidence interval using the software SPSS (2008).

Geographic coordinates were registered in each place of rodent capture using a commercial equipment of global positioning system (GPSMAP 64S, Garmin Ltd, Olathe, KS, USA). Outcome data were plotted in maps to compare the spatial distribution of human cases in a commercial GIS software (ArcGIS 10.1, Esri, Redlands, CA, USA).

RESULTS

All 112 census sectors (CS) of the Cajuru neighborhood were considered and classified, ranging from zero to seven risk factors (Figure 1). CS with up to three risk factors were considered as low risk and those with four, five or seven factors as high risk of human leptospirosis transmission. The sum of risk factors per 112 sectors and the distribution in high and low risk of transmission were obtained and presented (Figure 1). Overall, 17/112 (15.2%) and 95/112 (84.8%) of CS were classified as high and low risk of transmission, respectively, with a maximum of 7/12 (58.3%) risk factors simultaneously found in the same census sector.

A total of 42/112 (37.5%) CS were in flood area, only 3/112 (2.6%) had houses without water supply and 43/112 (38.3%) were located on water course area. In addition, 26/112 (23.2%) CS had green coverage and 101/112 (90.1%) were considered forested, 109/112 (97.3%) CS had all houses connected to public sewage, 44/112 (39.2%) with presence of open sewage, 38/112 (33.9%) with some point of open garbage, 112/112 (100%) had public garbage collection, 30/112 (26.7%) had local dumpster, 109/112 (97.3%) CS were paved and 81/112 (72.3%) presented rodent complaint.

The distribution of human leptospirosis cases in 2014 and 2015 in CS were assessed and presented (Figure 1), with 2/17 (11.8%) high risk and 9/95 (9.5%) low risk CS with leptospirosis cases. Although the proportion of cases was higher among high-risk sectors, no statistical difference was found ($p=0.08$). The absence or presence of each risk factor in high and low-risk areas and respective frequencies were also presented (Table 1).

Rodent traps were placed in a total of 129 different points from 8/112 (7.1%) randomly selected CS with 25/129 (19.3%) traps successfully captured and 3.16 nights in average for rat trapping (minimum 1 and maximum 10). In overall, 25 rats were trapped, 17 females and 8 males and all *Rattus norvegicus* species. A

total of 17/25 (68.0%) rats were positive for PCR amplification of *Leptospira*. Although females presented higher frequency than males with 13/17 (76.5%) and 4/8 (50.0%) positive rats, respectively, no statistical difference was observed ($p=0.18$). The frequency was higher in older animals than juvenile, with 3/7 (42.9%) and 14/18 (77.8%) of positive rats, respectively, with no statistically significant difference ($p = 0.09$).

Frequency of positive rodents in high-risk and low risk areas and stratified analysis per risk factor were obtained and presented (Table 2).

DISCUSSION

The present study has aimed to provide a comprehensive approach including reliable bibliography information, official data of spatial population and epidemiologic information to assess the impact of neighborhood level on human transmission of leptospirosis. Such methodology may be used or adapted to different local realities worldwide by both researchers and public government.

The categorization of Cajuru neighborhood in high or low risk areas, accordingly to Census Sectors (CS) characteristics and absence/presence of environmental risk factors, has provided a parameter for risk ranking, as such features could increase the transmission risk¹⁸, which may be useful for specific interventions and better awareness of population at high-risk¹⁹.

The study stratification in census sectors was worthwhile since that has been the basic territorial unit used for detailed socioeconomic indicators by the IBGE. Nevertheless, these data can generate calculation instability due to small populations with low case number, even gathering cases through years, as performed herein^{18,20}, most likely reason why the high-risk CS were not significant despite having more cases.

Surprisingly, few CS were not completely covered with basic sanitary services, as water supply and connection to public sewage network. Population living near to contamination sources, such as open sewage, flood area and accumulated garbage has been considered at risk in previously studies^{4,10,21}. At local level, have been the main indicators to determine the human leptospirosis incidence^{4,12,18}.

The high quantity of CS with accumulated garbage (33.92%) was, probably, due to various families in neighborhood use the recyclables collection for livelihood. They separated garbage in their own lands or in community sheds and in majority times in an inadequate way, increasing the chances of attracting rodents. Instead, garbage in neighbors was not a risk factor in a study performed in Salvador²¹. Although, the most studies suggest the association of garbage and increase of leptospirosis cases^{4,10,11,22}.

The pavement absence was used as indicator of contact with mud after rain, previously described as a risk factor for leptospirosis transmission in an endemic area, as well as the study area^{13,21}. The majority of CS had all streets pavement (97.32%), but in others, several streets had no pavement, mainly in river proximity, where also occurs frequently floods. When the drainage system of flood does not sufficiently absorb large rainfall volumes²² exposes population, a known risk factor²¹.

Synanthropic rodents are the main *Leptospira* spp. reservoir and eliminate them viable in urine, independently if is a risk area or not. Regardless, people just get sick when they are exposed to contaminated urine, which is favored by risk factors presence^{13,21,22}. Rodents' complaints received by Zoonosis Surveillance Unit was used as proxy to rats' presence in our study^{22,23}. As expected, the majority of CS already had rodent complaint (72.32%). Previous study shows that observe five or more rats in neighborhood was a risk factor to leptospirosis transmission²¹, while see two or more rats was implicated with sera-prevalence increase⁴. Thus, control rodents in these high-risk areas can be an important measure to reduce leptospirosis incidence^{4,6}.

Although there were more cases in the high-risk areas, CS separation when compared to human leptospirosis does not show relation. Thus, we could suppose that people may have contact with risk factors anywhere in the neighborhood. Similar results also occurred with data of *Leptospira* spp. in captured rats. In any selected area was founded positive rats, these data are important because despite the rats would disseminate bacteria on environment, the rodent presence does not indicate risk²². Whereas most of positive animals were in high-risk areas, it was not possible to state that animals in these areas

have a higher positive frequency than in lower risk areas. We hypothesized that it was easier to capture animals where there was greater food availability and resources for rats, which in this case was at high-risk areas. As we use CT as sample unit and not rats, this hypothesis was not tested.

We also hypothesized that there would be positive animals in the four scenarios and what would define human leptospirosis would be risk factors. However, contradicting one of our hypotheses, there was no association between risk factors and cases.

Regarding the positive frequency in rats, we found results similar to previous studies performed in Salvador, Brazil. They describe frequencies higher than 80% in rats captured in endemic leptospirosis area^{24,25}. Kidney PCR was better to detect *Leptospira* spp. once rats are asymptomatic reservoirs and share the bacteria through urine.

Despite females had a higher frequency of positives than males, there was no statistical difference ($p=0.18$) which was already expected since independently to sex, the chance to exposure to contaminated environment was the same. This difference absence was previously described^{6,24,26}, and just a study describe a greater positive frequency in females²⁷. Moreover, the larger number of researches with rats was using serology diagnosis, less sensible than molecular¹.

Regard the age categories, juvenile and adults, older animals were more positivity than younger, but there was no statistical difference ($p=0.09$) and there was no possible to conclude more chance to acquiring the *Leptospira* spp. on environment. The higher frequencies in adult rats was formerly described, also without statistical relation, and occurs because longer exposure on contaminated environment and social living with others^{6-24,26,28,29}.

Positive rodents were founded in both, high and low-risk areas. However, sectors without water supply, connected sewage network, pavement and previous rodent complaints showed relation to increase of positive rodents ($p=0.04$; $p=0.04$; $p=0.04$; $p=0.04$, respectively). Nevertheless, a higher chance to positive rodents was not found in CS with these risk factors, however these factors were associated with human cases increases^{11,22,25}. Similar results may have probably due to residences located on streets without pavement, which may had also

lacked sewer and water networks, as such services were usually installed together.

Our study focused on environmental issues of leptospirosis transmission. It was a known limitation due to the multifactorial well-described disease. Seasonality effects and socioeconomic differences were also limitations herein, recognized as important on disease dynamics^{4,9,11,13,30}. Other relevant limitation was the lower number of human leptospirosis used in analysis (just two years), our little capacity in capture rats, and even the low CS selected.

As limitations, the present study has graded each risk factor for the entire CS, despite heterogeneity within sector or how many households were under the risk of such factor. In addition, CS were the smallest available territorial unit but still large and with variable sizes and populations. In general, the classification of the risk areas had similar limitations of an ecological study, since individual characteristics were taken in account.

In conclusion, a model to analyze the different environmental risk factors has been developed using an already collected public data to measure the relation of rodents and human cases in each census sectors, comparing slums versus not slums areas of Curitiba. To the authors' knowledge, this is the first approach looking to compare contrasting areas in close proximity, even in same large city. It was demonstrated the great environmental importance in this neighborhood and was a pioneer research with rats and human leptospirosis in this endemic city. Our findings, potentially, could provide better knowledge to create and/or execute intervention programs in high-risk areas, to raise quality's life of slums population.

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. Maysa Pellizzaro scholarship was funded by a CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development). We also kindly thank Dr. Rafael Vieira for helping with the laboratory support for kidney samplings at the Federal University of Paraná and Dr. Eloisa Muehlbauer for the rodent anesthesia assistance at the Federal University of Paraná. Also, we kindly thank the veterinarians Amanda Haisi, Daniel A. Luz, Evelyn C. da Silva and Suzana Maria Rocha for the assistance with rodent trapping, capture and transportation.

REFERENCES

1. Adler B. Current Topics in Microbiology and Immunology and Leptospirosis. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Germany, 2015.
2. Ahmed, A, P. Grobusch, M. Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol* 2012; 3. doi:10.4172/2155-9597.1000133.
3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757–771.
4. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e228. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000228.
5. Felzemburgh RDM, Ribeiro GS, Costa F, Reis RB, Hagan JE, Melendez AXTO et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2927. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002927.
6. Costa F, Porter FH, Rodrigues G, Farias H, de Faria MT, Wunder EA, et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; 14: 33–40. DOI: 10.1089/vbz.2013.1378.
7. BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. *Ministério da Saúde*, Secretária de Vigilância em Saúde. 2014; 1–812.
8. BRASIL. Manual de Controle de Roedores. *Ministério da Saúde*. 2002.
9. Costa F, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santos N, Reis RB, Santos AC et al. Influence of household rat infestation on leptospira transmission in the urban slum environment. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3338. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003338.

10. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0003898. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003898.
11. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: 1–15. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003843.
12. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, Carvalho MS. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int Heal* 2008; 13: 503–512. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2008.02028.
13. Hagan JE, Moraga P, Costa F, Capian N, Ribeiro GS, Wunder EA et al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004275. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004275,
14. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol* 2001; 14: 296–326.
15. Astúa D, Moura RT, Grelle CE V, Fonseca MT. Influence of baits, trap type and position for small mammal capture in a Brazilian lowland Atlantic Forest. *Bol do Mus Biológico Mello Leitão* 2006; 19: 31–44.
16. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2219–24.
17. Waggoner JJ, Pinsky BA. Molecular diagnostics for human leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29: 440–445. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000295.
18. Gracie R, Barcellos C, Magalhães M, Souza-Santos R, Barrocas PRG. Geographical scale effects on the analysis of leptospirosis determinants. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 10366–83. DOI: 10.3390/ijerph111010366.
19. Maciel EAP, de Carvalho ALF, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, Reis MG et al. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(1):e154. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000154.

20. Santos SM, Chor D, Werneck GL. Demarcation of local neighborhoods to study relations between contextual factors and health. *Int J Health Geogr* 2010; 9:34. DOI: 10.1186/1476-072X-9-34.
21. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 605–10.
22. Oliveira DSC, Guimarães MJB, Portugal JL, Medeiros Z. The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 2009; 103: 149–157. DOI: 10.1179/136485909X398221.
23. Tamayo Uria I, Mateu Mahiques J, Mughini Gras L. Temporal Distribution and Weather Correlates of Norway Rat (*Rattus norvegicus*) Infestations in the City of Madrid, Spain. *Ecohealth* 2013; 10: 137–144. DOI: 10.1007/s10393-013-0829-3.
24. de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 2008; 108: 1–5. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.07.005.
25. Costa F, Wunder EA, De Oliveira D, Bisht V, Rodrigues G, Reis MG et al. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0003819. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003819
26. Krøjgaard LH, Villumsen S, Markussen MDK, Jensen JS, Leirs H, Heiberg A-C. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect* 2009; 137: 1586–92. DOI: 10.1017/S0950268809002647.
27. Easterbrook JD, Kaplan JB, Vanasco NB, Reeves WK, Purcell RH, Kosoy MY et al. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol Infect* 2007; 135: 1192–9.
28. Himsworth CG, Bidulka J, Parsons KL, Feng AYT, Tang P, Jardine CM et al. Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an

inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2270. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002270.

29. Pellizzaro M, Conrado F de O, Martins CM, Joaquim SF, Ferreira F, Langoni H et al. Serosurvey of *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in rats captured from two zoos in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; 50: 857–860. DOI: 10.1590/0037-8682-0138-2017

30. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104: 631–638. DOI: 10.1016/j.trstmh.2010.07.002.

Figure 1. It was presented the localization of Curitiba city in Brazil and the Cajuru neighborhood. In first neighborhood map was presented the human leptospirosis cases between 2014-15 distributed at high and low-risk areas. The second map showed the 130-rats capture points randomly selected in the neighborhood (two census sectors of winch group). The third map presents the 25-location of positive and negative rodents in neighborhood. All three maps was divided in high and low-risk areas for human leptospirosis transmission in the Cajuru neighborhood according the risk factors selected in bibliography.

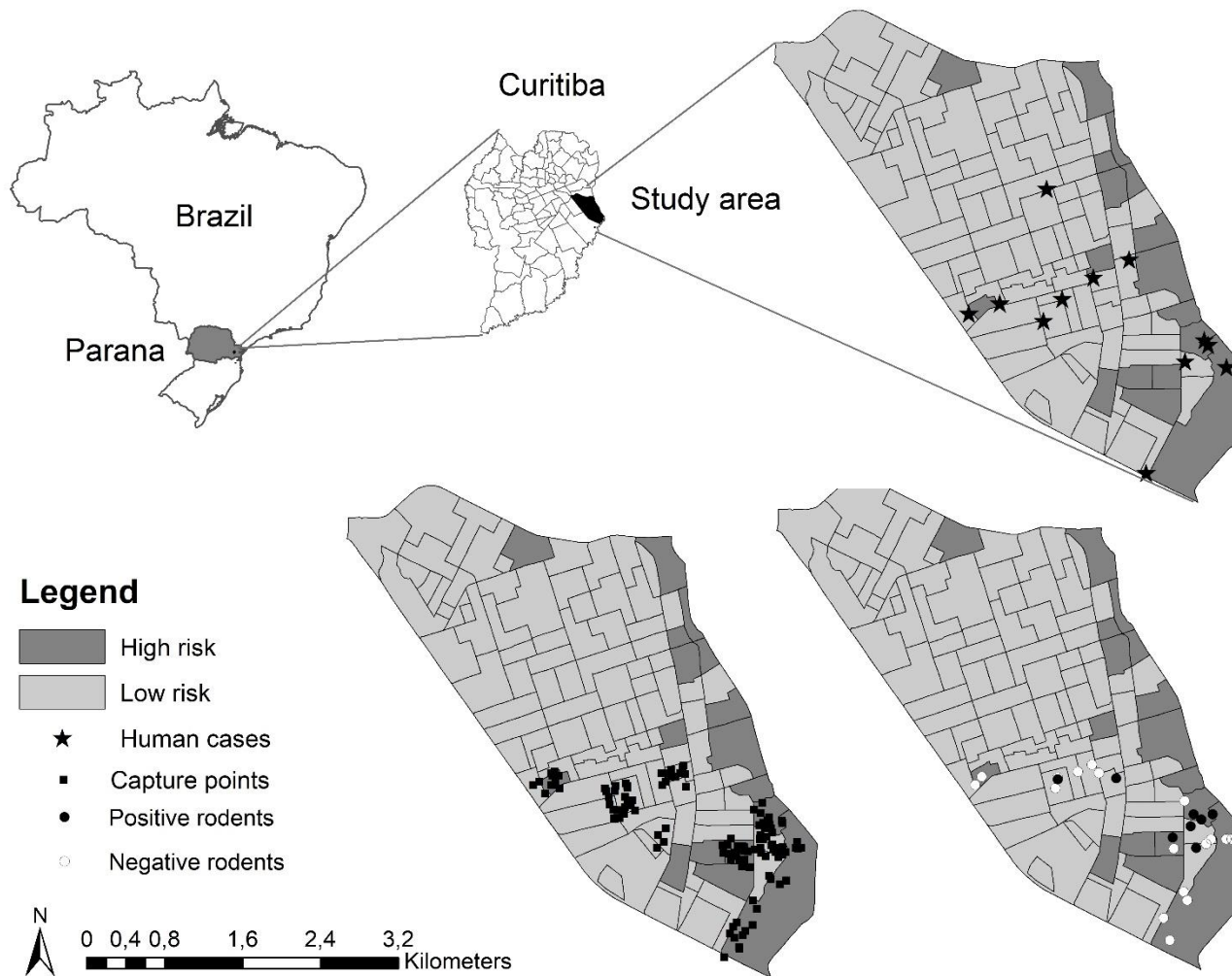


Table 1. Presence or absence of risk factors on census tract and occurrence of human leptospirosis cases in 2014 and 2015, in Cajuru neighborhood (Curitiba, Paraná, Brazil).

Human leptospirosis cases				
Risk factors		Frequency (%)	p-value	OR (CI 95%)
Flood area	Yes	6/42 (14.3)	0.21	2.16 (0.61 – 7.59)
	No	5/70 (7.1)		
Water supply	Yes	10/109 (9.2)	0.16	4.95 (0.41 – 59.52)
	No	1/3 (33.3)		
Water course	Yes	6/43 (14)	0.24	2.07 (0.59 – 7.27)
	No	5/69 (7.2)		
Green coverage	Yes	2/26 (7.7)	0.67	0.71 (0.14 – 3.52)
	No	9/86 (10.5)		
Afforestation	Yes	8/101 (7.9)	0.04	0.22 (0.05 – 1.03)
	No	3/11 (2.3)		
Sewage network	Yes	10/109 (9.2)	0.16	4.95 (0.41 – 59.52)
	No	1/3 (33,3)		
Open sewage	Yes	5/44 (11.4)	0.65	1.32 (0.37 – 4.63)
	No	6/68 (8.8)		
Open garbage	Yes	3/38 (7.9)	0.62	0.70 (0.17 – 2.83)
	No	8/74 (10.8)		
Garbage collection	Yes	11/112 (9.8)	-	-
	No	-		
Dumpster	Yes	2/30 (6.7)	0.49	1.72 (0.35 – 8.48)
	No	9/82 (11)		
Pavement	Yes	10/109 (9.2)	0.16	4.95 (0.41 – 59.52)
	No	1/3 (33.33)		
Rodent complaint	Yes	8/81 (9.9%)	0.97	1.02 (0.25 – 4.13)
	No	3/31 (9.7%)		

Table 2. Presence or absence of risk factors on census tract and occurrence of *Leptospira* spp. kidneys' rats captured in Cajuru neighborhood (Curitiba, Paraná, Brazil).

<i>Leptospira</i> spp. in kidneys' rats				
Risk factors		Frequency (%)	p-value	OR (CI 95%)
Flood area	Yes	15/20 (75)	0.13	4.5 (0.57 – 35.15)
	No	2/5 (40)		
Water supply	Yes	16/21 (76.2)	0.04	0.10 (0.00 – 1.23)
	No	1/4 (25)		
Water course	Yes	10/15 (66.7)	0.86	0.85 (0.15 – 4.81)
	No	7/10 (70)		
Green coverage	Yes	8/11 (72.7)	0.65	1.48 (0.26 – 8.26)
	No	9/14 (64.3)		
Afforestation	Yes	7/10 (70)	0.86	1.16 (0.20 – 6.55)
	No	10/15 (66.7)		
Sewage network	Yes	16/21 (76.2)	0.04	0.10 (0.00 – 1.23)
	No	1/4 (25)		
Open sewage	Yes	4/6 (66.7)	0.93	2.91 (0.28 – 30.29)
	No	13/19 (68.4)		
Open garbage	Yes	5/6 (83.3)	0.35	0.70 (0.17 – 2.83)
	No	12/19 (63.2)		
Garbage collection	Yes	17/25 (68)	-	-
	No	-		
Dumpster	Yes	-	-	-
	No	17/25 (68)		
Pavement	Yes	16/21 (76.2)	0.04	0.10 (0.00 – 1.23)
	No	1/4 (25)		
Rodent complaint	Yes	16/21 (76.2)	0.04	9.60 (0.80 – 114.17)
	No	1/4 (25)		

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

Os roedores são os principais reservatórios de sorovares de *Leptospira* spp. e as eliminam viáveis na urina, independentemente de estarem em uma área de risco ou não. Mas as pessoas só adoecem ao entrarem em contato com urina contaminada do animal, que é favorecido pela presença dos fatores de risco (SARKAR et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009; HAGAN et al., 2016). Os dados de solicitação do serviço de desratização da prefeitura foram utilizados como indicador para presença de ratos no local (OLIVEIRA et al., 2009; URIA; MATEU MAHIQUES; MUGHINI GRAS, 2013). Apesar de as técnicas moleculares em tecido renal e urina apresentarem maior sensibilidade de diagnóstico em ratos, comparado com as técnicas sorológicas, essas como primeiro acesso a dados em áreas sem estudo prévio, podem fornecer informações importantes sobre a contaminação ambiental.

O último mapeamento de áreas de risco no município de Curitiba foi realizado de modo manual em 2008, conforme os problemas relacionados daquele momento. Atualmente, no serviço da prefeitura de Curitiba, para definir área de risco, as equipes se deslocam aos locais com questionários. Devido à pouca quantidade de pessoas na equipe, este trabalho foi descontinuado. A proposta de divisão dos setores censitários como alto e baixo risco foi proposta para otimizar tempo e recursos da equipe, e se válida, expandir para outras áreas.

O setor censitário permite estudar indicadores socioeconômicos em mais detalhes (GRACIE 2014), pois os dados obtidos pelo IBGE nos censos são a melhor aproximação sobre a situação de um local que é possível obter sem identificar a residência. Apesar disso, estes dados podem gerar instabilidade nos cálculos pois são populações pequenas com baixo número de casos, mesmo agregando casos de diversos anos, como realizado neste trabalho (SANTOS; CHOR; WERNECK, 2010; GRACIE et al., 2014).

Dada a heterogeneidade possível dentro de cada setor e que o dado utilizado foi presença ou ausência do fator de risco no setor inteiro, não é possível saber em quantos domicílios o fator estava presente, deste modo, as heterogeneidades individuais não puderam ser avaliadas. Outra questão é que o setor é uma grande unidade, e dentro dele pode haver variações significativas e considerar o setor inteiro como risco ou não risco, pode colocar uma parcela da população sob vigilância desnecessária. Esta é uma importante limitação pois um setor pode ser bastante heterogêneo.

A importância do ambiente nos arredores da residência, para transmissão de leptospirose em ambiente de favela, em países em desenvolvimento já foi descrita e os fatores de risco associados são determinantes na infecção humana (MACIEL et al., 2008).

CONCLUSÕES GERAIS

A leptospirose é uma zoonose negligenciada em grandes centros, que afeta grupos de risco, normalmente marginalizados e vivendo em condições sanitárias precárias. É um problema com efeitos na saúde animal, humana e ambiental, manejável com abordagens relacionados a saúde única (*One Health*). Determinar aonde a transmissão está ocorrendo em uma comunidade é essencial para criar e implementar intervenções efetivas nesses locais. Ainda é necessário aplicar e validar a metodologia descrita, em outras áreas. Porém, com a validação da classificação de risco por setor censitário em um bairro, possibilitará direcionar os trabalhos das prefeituras em locais pontuais e tornará o serviço de vigilância mais eficaz.

Apesar das limitações, esta é a primeira abordagem utilizando diferentes cenários de transmissão de leptospirose dentro de um mesmo bairro, diminuindo os erros relacionados a comparações entre áreas distintas. Foi demonstrado que neste bairro, dentro das áreas de risco, os principais fatores de risco, colocando a população em perigo de infecção são as áreas inundáveis, abastecimento de água, esgoto a céu aberto, domicílio ligado à rede de esgoto, pavimentação e reclamação da presença de roedores.

Estes fatores podem ser manejados para melhoria das condições de vida de populações que vivem em condições insalubres nas favelas e outras áreas de ocupação irregular ou inadequadas. Os investimentos públicos em melhorias de infraestrutura nesses locais podem ser direcionados a realocação de famílias que vivem em áreas de alagamento, sistema de esgotamento sanitário, abastecimento de água, drenagem de chuva, pavimentação das ruas, manejo de roedores e destinação adequada do lixo. No caso da comunidade estudada, legalizar os serviços de reciclagem, para que as pessoas trabalhem na separação do lixo de maneira adequada, prevenindo a infecção.

Outras análises são necessárias para melhor descrever o padrão de infecção neste bairro, assim como validar a divisão em áreas de risco alto e baixo, e deste modo implementar ações de prevenção efetivas para esta e outras grandes populações marginalizadas que vivem nas periferias e favelas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-GARCIA, D. Zip Code-Level Risk Factors for Tuberculosis: Neighborhood Environment and Residential Segregation in New Jersey, 1985-1992. **American Journal of Public Health**, v. 91, n. 5, p. 734–741, 2001.

ADLER, B. **Current Topics in Microbiology and Immunology and Leptospirosis**. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg, 2015.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. Leptospira and Leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, p. 287–296, 2010.

AHMED, A.; GROBUSCH, M.; KLATSER, P. R.; HARTSKEERL, R. A. Molecular Approaches in the Detection and Characterization of Leptospira. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 3, n. 2, 2012.

ARCGIS DESKTOP: 10.1. **Environmental Systems Research Institute** Redlands, CA, 2011. .

ASTÚA, D.; MOURA, R. T.; GRELLE, C. E. V; FONSECA, M. T. Influence of Baits , Trap Type and Position for Small Mammal Capture in a Brazilian Lowland Atlantic Forest. **Boletim do Museu Biológico Mello Leitão**, v. 19, p. 31–44, 2006.

BARATA, R. C. B. Epidemiologia, Saúde Pública, Situação de Saúde e Condições de vida. In: **Condições de vida e situação de saúde**. São Paulo: ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva, 1997. p. 31–75.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Reviews Leptospirosis: A Zoonotic Disease of Global Importance. **The Lancet**, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.

BRASIL. Lei Orgânica 8.080/1990 - Dispõe Sobre as Condições Para a Promoção, Proteção E Recuperação Da Saúde, a Organização E O Funcionamento Dos Serviços Correspondentes E Dá Outras Providências. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF**, 1990.

BRASIL. Manual de Controle de Roedores. **Ministério da Saúde**, p. 132, 2002.

BRASIL. **Abordagens Espaciais na Saúde Pública**. 1ª edição ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006.

BRASIL. **Introdução a estatística espacial para a saúde pública**. 1ª edição ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007.

BRASIL. Guia de Vigilância Em Saúde. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, p. 1–812, 2014.

BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 10 aug. 2017.

COSTA, F. **Estudos Ecológicos sobre Reservatórios urbanos de de Leptospirose em Salvador [Tese de Doutorado]**. 2010. Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, 2010.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015a.

COSTA, F.; PORTER, F. H.; RODRIGUES, G.; FARIAS, H.; DE FARIA, M. T.; WUNDER, E. A.; OSIKOWICZ, L. M.; KOSOY, M. Y.; REIS, M. G.; KO, A. I.; CHILDS, J. E. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* Spp. among Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014a.

COSTA, F.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D. M.; SANTOS, N.; REIS, R. B.; SANTOS, A. C.; FRAGA, D. B. M.; ARAUJO, W. N.; SANTANA, C.; CHILDS, J. E.; REIS, M. G.; KO, A. I. Influence of Household Rat Infestation on *Leptospira* Transmission in the Urban Slum Environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014b.

COSTA, F.; WUNDER, E. A.; DE OLIVEIRA, D.; BISHT, V.; RODRIGUES, G.; REIS, M. G.; KO, A. I.; BEGON, M.; CHILDS, J. E. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2015b.

CURITIBA. **Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Curitiba**. Disponível em: <<http://www.ippuc.org.br>>. Acesso em: 10 aug. 2017.

EASTERBROOK, J. D.; KAPLAN, J. B.; VANASCO, N. B.; REEVES, W. K.; PURCELL, R. H.; KOSOY, M. Y.; GLASS, G. E.; WATSON, J.; KLEIN, S. L. A Survey of Zoonotic Pathogens Carried by Norway Rats in Baltimore, Maryland, USA. **Epidemiology and infection**, v. 135, n. 7, p. 1192–1199, 2007.

EVANGELISTA, K. V. .; COBURN, J. *Leptospira* as an Emerging Pathogen: A Review of Its Biology, Pathogenesis and Host Immune Responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413–1425, 2010.

FARIA, M. T.; CALDERWOOD, M. S.; ATHANAZIO, D. A.; MCBRIDE, A. J. A.; HARTSKEERL, R. A.; PEREIRA, M. M.; KO, A. I.; REIS, M. G. Carriage of *Leptospira Interrogans* among Domestic Rats from an Urban Setting Highly Endemic for Leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, p. 1–5, 2008.

FELZEMBURGH, R. D. M.; RIBEIRO, G. S.; COSTA, F.; REIS, R. B.; HAGAN, J. E.; MELENDEZ, A. X. T. O.; FRAGA, D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; DOS SANTOS, B. L.; SILVA, A. Q.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an Urban Slum Community: Role of Poor Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2927, 2014.

GRACIE, R.; BARCELLOS, C.; MAGALHÃES, M.; SOUZA-SANTOS, R.; GUIMARÃES BARROCAS, P. R. Geographical Scale Effects on the Analysis of Leptospirosis Determinants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10366–10383, 2014.

HAGAN, J. E.; MORAGA, P.; COSTA, F.; CAPIAN, N.; RIBEIRO, G. S.; WUNDER, E. A.; FELZEMBURGH, R. D. M.; REIS, R. B.; NERY, N.; SANTANA, F. S.; FRAGA, D.; DOS SANTOS, B. L.; SANTOS, A. C.; QUEIROZ, A.; TASSINARI, W.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; DIGGLE, P. J.; KO, A. I. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.

HIMSWORTH, C. G.; BIDULKA, J.; PARSONS, K. L.; FENG, A. Y. T.; TANG, P.; JARDINE, C. M.; KERR, T.; MAK, S.; ROBINSON, J.; PATRICK, D. M. Ecology of *Leptospira Interrogans* in Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2270, 2013a.

HIMSWORTH, C. G.; PARSONS, K. L.; JARDINE, C.; PATRICK, D. M. Rats, Cities, People, and Pathogens: A Systematic Review and Narrative Synthesis of Literature Regarding the Ecology of Rat-Associated Zoonoses in Urban Centers. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 6, p. 349–359, 2013b.

KO, A. I.; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JR, W. D. J.; RILEY, L. W. Urban Epidemic of Severe Leptospirosis in Brazil. v. 354, p. 820–825, 1999.

KRØJGAARD, L. H.; VILLUMSEN, S.; MARKUSSEN, M. D. K.; JENSEN, J. S.; LEIRS, H.; HEIBERG, a-C. High Prevalence of *Leptospira* Spp. in Sewer Rats (*Rattus Norvegicus*). **Epidemiology and infection**, v. 137, p. 1586–1592, 2009.

LAROCQUE, R. C.; BREIMAN, R. F.; ARI, M. D.; MOREY, R. E.; JANAN, F. A.; HAYES, J. M.; HOSSAIN, M. A.; BROOKS, W. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis during Dengue Outbreak, Bangladesh. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 766–769, May 2005.

LAU, C. L.; SMYTHE, L. D.; CRAIG, S. B.; WEINSTEIN, P. Climate Change, Flooding, Urbanisation and Leptospirosis: Fuelling the Fire? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 10, p. 631–638, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

MACIEL, E. A. P.; CARVALHO, A. L. F.; NASCIMENTO, S. F.; MATOS, R. B.; GOUVEIA, E. L.; REIS, M. G.; KO, A. I. Household Transmission of *Leptospira* Infection in Urban Slum Communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, 2008.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The Panorama of Animal Leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, Regarding the Seroepidemiology of the Infection in Tropical Regions. **BMC veterinary research**, v. 9, p. 237, 2013.

MCBRIDE, A. J. .; ATHANAZIO, D. A. .; REIS, M. G. .; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 18, p. 376–386, 2005.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRON, I. Saint. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219–2224, 1992.

MWACHUI, M. A.; CRUMP, L.; HARTSKEERL, R.; ZINSSTAG, J.; HATTENDORF, J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003843, 2015.

OLIVEIRA, D. S. C.; GUIMARÃES, M. J. B.; PORTUGAL, J. L.; MEDEIROS, Z. The Socio–demographic, Environmental and Reservoir Factors Associated with Leptospirosis in an Urban Area of North–eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 2, p. 149–157, 2009.

PANTI-MAY, J. A.; CARVALHO-PEREIRA, T. S. A.; SERRANO, S.; PEDRA, G. G.; TAYLOR, J.; PERTILE, A. C.; MINTER, A.; AIRAM, V.; CARVALHO, M.; JÚNIOR, N. N.; RODRIGUES, G.; REIS, M. G.; KO, A. I.; CHILDS, J. E.; BEGON, M.; COSTA, F. A Two-Year Ecological Study of Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) in a Brazilian Urban Slum. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0152511, 2016.

PELLIZZARO, M.; CONRADO, F. de O.; MARTINS, C. M.; JOAQUIM, S. F.; FERREIRA, F.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Serosurvey of *Toxoplasma Gondii* and *Leptospira* Spp. in Captured Rats from Two Zoos in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. no prelo, 2017.

PFEIFFER, D.; ROBINSON, T.; STEVENSON, M.; STEVENS, K. B.; ROGERS, D. J.; CLEMENTS, A. C. **Spatial Analysis in Epidemiology**. 1st. ed. [s.l.] Oxford, 2008.

PICARDEAU, M. Diagnosis and Epidemiology of Leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D. M.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X. T. O.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. **PLoS**

Neglected Tropical Diseases, v. 2, n. 4, p. 11–18, 2008.

SANTOS, S. M.; CHOR, D.; WERNECK, G. Demarcation of Local Neighborhoods to Study Relations between Contextual Factors and Health. **International Journal of Health Geographics**, v. 9, n. 1, p. 34, 2010.

SARKAR, U.; NASCIMENTO, S.; BARBOSA, R.; FOR, M. C.-C. I. of R. F.; LEPTOSPIROSIS DURING AN URBAN EPIDEMICS, R.; NUEVO, H.; KALOFONOS, I. Population-Based Case-Control Investigation of Risk Factors for Leptospirosis during an Urban Epidemic. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 605–10, 2002.

SPSS INC. **SPSS Statistics for Windows, Version 17.0** Chicago, 2008. .

STIMSON, R. J. Spatial Aspects of Epidemiological Phenomena and of the Provision and Utilization of Health Care Services in Australia: A Review of Methodological Problems and Empirical Analysis. **Environmental and Planning A**, v. 12, p. 881–907, 1980.

TASSINARI, W. S.; PELLEGRINI, D. C. P.; SÁ, C. B. P.; REIS, R. B.; KO, A. I.; CARVALHO, M. S. Detection and Modelling of Case Clusters for Urban Leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 13, n. 4, p. 503–512, 2008.

TORGERSON, P. R.; HAGAN, J. E.; COSTA, F.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; GORIS, M. G. A.; STEIN, C.; KO, A. I.; ABELARIDDER, B. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.

URIA, I. T.; MATEU MAHIQUES, J.; MUGHINI GRAS, L. Temporal Distribution and Weather Correlates of Norway Rat (*Rattus Norvegicus*) Infestations in the City of Madrid, Spain. **EcoHealth**, v. 10, n. 2, p. 137–144, 2013.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Molecular Diagnostics for Human Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 440–445, 2016.

ANEXOS

Anexo I – Atestado de aprovação de projeto de pesquisa na CEUA.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Vigilância epidemiológica e determinação de áreas de risco de leptospirose humana a partir do diagnóstico molecular e sorológico de ratos urbanos (*Rattus norvegicus*)" **Protocolo CEUA 0034/2017**, a ser conduzido por Maysa Pelizzaro, responsável/orientador Helio Langoni, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	15/03/2017 a 15/10/2017
Nome Comum / Espécie / Linhagem	RATO / RATTUS NOVERGICUS / Não se aplica
Raça	Não se aplica
Nº de animais machos	60
Nº de animais fêmeas	60
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	300g
Peso médio de animais fêmeas	300g
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 1 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Animais sinantrópicos

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 09/03/2017

PROF.ª ASS. DR.ª IBIARA CORREIA DE LIMA ALMEIDA PAZ
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Cordeiro, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patricia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

Anexo II – Autorização para realização do projeto de pesquisa pela Prefeitura de Curitiba.



PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA
SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE
CENTRO DE SAÚDE AMBIENTAL
UNIDADE DE VIGILÂNCIA DE ZOONOSSES

INFORMAÇÃO

A Prefeitura Municipal de Curitiba, em parceria com a Universidade Federal do Paraná e a Universidade Estadual Paulista, está promovendo um estudo de pesquisa de zoonoses em ratos urbanos, com o objetivo de avaliar a presença e sanidade de roedores sinantrópicos.

Suas ações envolvem captura dos roedores sinantrópicos com uso de armadilhas dispostas em áreas do bairro Cajuru, pelo período de no mínimo 12 horas, e elaboração de um questionário epidemiológico com a população.

A realização do presente estudo, foi autorizada pela Secretaria Municipal da Saúde.

Curitiba, 20 de janeiro de 2017.

Vivien Midori Morikawa
Coordenadora
Unidade de Vigilância de Zoonoses

Anexo III – Termo de consentimento para colocação de armadilhas nas residências dos moradores.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA



Eu, _____, RG: _____ estou sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa de zoonoses em ratos urbanos, cujos objetivos e justificativas são: avaliar a presença e sanidade de roedores sinantrópicos.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir que os pesquisadores envolvidos no referido projeto posicionem uma armadilha pra roedores nas dependências de seu domicílio ou comércio, durante um período de aproximadamente 12 horas.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar.

As pesquisadoras envolvidas com o referido projeto são: Medica Veterinária Maysa Pellizzaro (41 99219-1251) e Ana Carolina Yamakawa (41 99878-9336) e com elas poderei manter contato pelos telefones supracitados.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Curitiba, ____ de _____ de 2017.

Assinatura

Maysa Pellizzaro

Assinatura da pesquisadora responsável