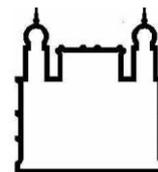




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso De Pós-Graduação Em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**DINÂMICA E DIVERSIDADE DE *LEPTOSPIRA* SPP. DE AMOSTRAS
AMBIENTAIS E SUAS IMPLICAÇÕES NA TRANSMISSÃO DE LEPTOSPIROSE
EM HUMANOS**

DAIANA SANTOS DE OLIVEIRA

**Salvador-Bahia
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**DINÂMICA E DIVERSIDADE DE *LEPTOSPIRA* SPP. DE AMOSTRAS
AMBIENTAIS E SUAS IMPLICAÇÕES NA TRANSMISSÃO DE LEPTOSPIROSE
EM HUMANOS**

DAIANA SANTOS DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Co-Orientador: Prof. Dr. Federico Costa

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia, para obtenção do grau de Doutora.

**Salvador-Bahia
2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Oliveira, Daiana Santos de.
O48d Dinâmica e diversidade de *Leptospira* spp. de amostras ambientais e suas implicações na transmissão de leptospirose em humanos. / Daiana Santos de Oliveira. - 2020.
113 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Leptospirose. 2. Isolamento. 3. Solo. 4. Água de esgoto. 5. Ambiente.
6. Soroprevalência.. I. Título.

CDU 616.986

**“DINÂMICA E DIVERSIDADE DE LEPTOSPIRA SPP. DE AMOSTRAS AMBIENTAIS E SUAS
IMPLICAÇÕES NA TRANSMISSÃO DE LEPTOSPIROSE EM HUMANOS”**

DAIANA SANTOS DE OLIVEIRA

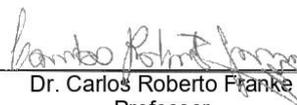
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 22 de setembro de 2020.

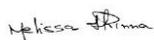
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Paula Carvalho Lage von Buettner
Ristow
Professora
UFBA



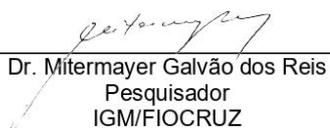
Dr. Carlos Roberto Franke
Professor
UFBA



Dra. Melissa Hanzen Pinna
Professora
UFBA



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código
de Financiamento 001

Fundação de Apoio a Pesquisa (FAPEX)

Fundação de Apoio a Pesquisa (FIOTEC)

National Institutes of Health (NIH)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

AGRADECIMENTOS

A trajetória foi difícil, mas com muita emoção “estou” aqui para agradecer os principais envolvidos nessa conquista...

Agradeço primeiramente ao meu bom Deus por ter me proporcionado a vida e ter me guiado e encorajado para que eu chegasse até aqui. Bem como a toda minha família (meus pais Ailson Oliveira e Tereza Oliveira, Isaque Bressy e minha filha Amanda), vocês são meu porto seguro, obrigada pela compreensão nas horas de ausência e pelo apoio, carinho e torcida ao longo desta árdua caminhada. Minha filhinha como eu te amo, você chegou dando mais cor e sentido para minha vida! Como foi desafiador e ao mesmo tempo foi uma dose extra de coragem e perseverança para dar continuidade a esse sonho. Agradeço também, não menos importante, do incentivo e da ajuda primordial de minhas tias Neomísia e Neusvandira e de meus sogros (Maria Francisca e Uilson Bressy).

Ao meu orientador Mitermayer Reis, o qual, ao longo dessa caminhada, construí uma admiração como pessoa e profissional. Obrigada por ter aceitado me orientar, pelo apoio e incentivo de sempre. Nunca irei esquecer-me da ajuda e compreensão no momento difícil que passei.

Ao meu coorientador Federico Costa, minha especial gratidão por esses nove anos de muito trabalho e aprendizado. Sou imensamente grata pela confiança, paciência, apoio e dedicação durante todos esses anos. Além de todas as oportunidades dadas, e exemplos, tanto profissionais quanto pessoais, e de tudo que me ensinou e continua me ensinando.

À toda equipe de Leptospirose IGM/Fiocruz e aos colegas do LPBM/NEB/Fiocruz, em especial a Ticiane Pereira, Crislaine Gomes, Ramon Andrade, Anderson Oliveira, Camila Jacob, Jaqueline Cruz e todos os outros não citados aqui, obrigada pelos momentos de descontração e pelas trocas de conhecimentos. Especialmente também à Nivison Junior, Fábio Neves e ao professor Luciano Kalabric pela grandiosa ajuda nas análises estatísticas.

À Luciane Amorim pela essencial ajuda nas análises de sequenciamento;

Aos parceiros estrangeiros, Albert Ko e Arnau Casanova pela grandiosa contribuição nos conhecimentos e sugestões para o artigo.

À Coordenação do PGPAT Fiocruz / UFBA e à Cleiton Carneiro da secretaria do LPBM pelo suporte recebido;

Ao Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ/ LPBM), por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro durante meu doutorado;

À Biblioteca da FIOCRUZ-Ba, em especial a dona Ana Maria Fiscina, pela análise do Checklist e formatação da presente Tese;

E não poderia deixar de agradecer a gentil participação dos membros da banca e pelas válidas críticas e sugestões;

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho.

“Eu pedi força e Deus me deu dificuldades para me fazer forte. Pedi sabedoria e Deus me deu problemas para resolver. Pedi prosperidade e Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar. Pedi coragem e Deus me deu perigos para superar. Pedi amor e Deus me deu pessoas para ajudar. Eu não recebi nada do que pedi... Mas recebi tudo que precisava”.

Autor desconhecido.

OLIVEIRA, Daiana Santos de. Dinâmica e diversidade de *Leptospira* spp. de amostras ambientais e suas implicações na transmissão de leptospirose em humanos. 113 f. il. Tese (Doutorado) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Acomete mais de um milhão de pessoas anualmente no mundo, causando aproximadamente 60.000 óbitos. As populações urbanas vulneráveis e carentes de infraestrutura e saneamento básico são as principais afetadas por essa doença. Nestes ambientes, a transmissão ocorre a partir da exposição ao meio ambiente contaminado por *Leptospira*. Estudos prévios demonstraram a presença de espécies de *Leptospira* em fontes ambientais, como solo e água de esgoto. Entretanto, são limitadas as informações sobre a dinâmica e diversidade de *Leptospira* patogênica em diferentes fontes ambientais de áreas urbanas. Muitos estudos são voltados à análise de dados epidemiológicos e de soroprevalência em animais. Porém, a maioria desses estudos leva pouca consideração sobre os determinantes ambientais e co-circulação de diferentes sorogrupos/sorovares. **OBJETIVOS:** O presente estudo teve como objetivos avaliar a presença, diversidade e dinâmica de espécies de *Leptospira* em diferentes fontes ambientais, caracterizar os parâmetros físicos e químicos ambientais associados à *Leptospira* em matrizes aquáticas e caracterizar o perfil epidemiológico de indivíduos com presença de anticorpos anti-*Leptospira* em cinco comunidades urbanas carentes da cidade de Salvador-Ba, que apresentam o saneamento básico precário. **MATERIAL E MÉTODO:** As coletas ambientais de água de esgoto, empoçada e solo foram realizadas no Bairro de Pau da Lima. A partir das análises em ambiente, demonstramos que a água de esgoto, água empoçada e solo são reservatórios de *Leptospira*. **RESULTADO:** Encontramos 36% (121/335) e 34% (115/250) de amostras ambientais positivas para *Leptospira* por qPCR nas amostras de água de esgoto e empoçada, respectivamente. Encontramos uma maior presença e concentração de DNA de *Leptospira* no período de alta precipitação, indicando que a chuva tem papel importante na dispersão e manutenção da bactéria. Nossos resultados também mostraram que fatores físico-químicos como SDT (Sólidos Totais Dissolvidos), salinidade e pH estão associados à presença e concentração da bactéria no ambiente. Utilizando a técnica de isolamento identificamos uma diversidade de espécies de *Leptospira*, foram 52 isolados pertencentes a três clados: patogênica, intermediária e saprofíticas. Resultados do nosso inquerito sorológico com 3010 residentes das comunidades urbanas: Alto do Cabrito, Marechal Rondon, Nova Constituinte, Rio Sena e Pau da Lima evidenciamos padrões epidemiológicos específicos associados à transmissão dos sorovares Copenhageni e Cynopteri. A maior soroprevalência de *Leptospira* sorovar Cynopteri foi para os indivíduos >45 anos de ambos os sexos, que tem exposição ocupacional, anda descalço e apresenta gatos no peridomicílio. A transmissão de Copenhageni foi mais presentes em residentes do sexo masculino e nos indivíduos que vivem em domicílio próximo ao esgoto aberto, sendo que modificações na estrutura do domicílio como elevação no piso e material da parede (concreto e tijolo) são fatores de proteção para a transmissão. **CONCLUSÃO:** Nossos dados apontam a necessidade de estudos relacionados a outros reservatórios animais que podem estar associado ao sorovar Cynopteri. O estudo permitiu prover uma visão integrada do ciclo de transmissão de leptospirose, na perspectiva de saúde única (“one health”). Sendo assim, esses dados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais efetivas de prevenção da doença.

Palavras-chave: Isolamento, físico-químico, solo, água de esgoto, ambiente, soroprevalência.

OLIVEIRA, Daiana Santos de. Dynamics and diversity of *Leptospira* spp. of environmental samples and its implications in the transmission of leptospirosis in humans 113 f. il. Thesis (Doutorado) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leptospirosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira*. It affects more than one million people annually worldwide, causing approximately 60,000 deaths. Urban populations that are vulnerable and lacking infrastructure and basic sanitation are the main affected by this disease. In these environments, transmission occurs from exposure to the environment contaminated by *Leptospira*. Previous studies have demonstrated the presence of *Leptospira* species in environmental sources, such as soil and sewage. However, information on the dynamics and diversity of pathogenic *Leptospira* in different environmental sources in urban areas is limited. Many studies are focused on the analysis of epidemiological and seroprevalence data in animals. However, most of these studies take little account of the environmental determinants and co-circulation of different serogroups / serovars. **OBJECTIVES:** The present study aimed to evaluate the presence, diversity and dynamics of *Leptospira* species in different environmental sources, to characterize the physical and chemical environmental parameters associated with *Leptospira* in aquatic matrices and to characterize the epidemiological profile of individuals with the presence of anti-*Leptospira* antibodies in five underprivileged urban communities in the city of Salvador-Ba, which present precarious basic sanitation. **MATERIAL AND METHOD:** Environmental collections of sewage, pooled water and soil were carried out in the neighborhood of Pau da Lima. From the environmental analysis, we demonstrate that sewage water, pooled water and soil are reservoirs of *Leptospira*. **RESULT:** We found 36% (121/335) and 34% (115/250) of positive environmental samples for *Leptospira* by qPCR in the sewage and standing water samples, respectively. We found a greater presence and concentration of *Leptospira* DNA in the period of high precipitation, indicating that rain plays an important role in the dispersion and maintenance of the bacteria. Our results also showed that physical-chemical factors such as SDT (Total Dissolved Solids), salinity and pH are associated with the presence and concentration of the bacteria in the environment. Using the isolation technique, we identified a diversity of *Leptospira*, were 52 species isolated from three clades: pathogenic, intermediate and saprophytic. Results of our serological survey with 3010 residents of urban communities: Alto do Cabrito, Marechal Rondon, Nova Constituinte, Rio Sena and Pau da Lima show specific epidemiological patterns associated with the transmission of serovars Copenhageni and Cynopteri. The highest seroprevalence of *Leptospira* serovar Cynopteri was for individuals > 45 years old of both sexes, who have occupational exposure, walk barefoot and present cats in the home. Copenhageni transmission was more prevalent in male residents and in individuals living close to the open sewer, and changes in the structure of the household such as elevation in the floor and wall material (concrete and brick) are protective factors for the streaming. **CONCLUSION:** Our data indicate the need for studies related to other animal reservoirs that may be associated with serovar Cynopteri. The study allowed to provide an integrated view of the leptospirosis transmission cycle, from the perspective of a single health (“one health”). Thus, these data can assist in the development of more effective disease prevention strategies.

Keywords: Leptospirosis, isolation, physico-chemical, soil, sewage, environment, soroprevalence.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMJH	Ellinghausen e McCullough modificado por Johnson e Harris
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LIG	<i>Leptospiral immunoglobulin-like</i>
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
LipL32	Lipoproteína de membrana de <i>Leptospira</i> de 32-kDa
MAT	Teste de Microaglutinação Sorológica
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
SPHS	Síndrome de hemorragia pulmonar grave
STAFF	Sulfamethazole, Trimetoprima, Anfotericina B, Fosfomicina, 5-Fluorouracil
TDS	<i>Total Dissolved Solids</i>
STD	Sólidos Totais Dissolvidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	ASPECTOS HISTÓRICOS DA LEPTOSPIROSE.....	14
2.2.	AGENTE INFECCIOSO: <i>Leptospira</i>	14
2.2.1	Microbiologia	14
2.2.2	Taxonomia	15
2.3	CICLO DE TRANSMISSÃO.....	16
2.3.1	Reservatórios animais	16
2.3.2	Hospedeiro acidental	17
2.3.3	Reservatório ambiental	18
2.4	IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DE <i>Leptospira</i> NO AMBIENTE.....	21 21
2.4.1	ISOLAMENTO DE <i>Leptospira</i>	21
2.4.2	BIOLOGIA MOLECULAR.....	22
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE EM HUMANOS	23
2.6	MEDIDAS DE CONTROLE PARA A LEPTOSPIROSE.....	23
3	HIPÓTESES	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	RESULTADOS	28
5.1	OBJETIVO I.....	28
	MANUSCRITO 1.....	29
5.2	OBJETIVO II	38
	MANUSCRITO 2.....	39
5.3	OBJETIVO III.....	49
	MANUSCRITO 3.....	50
5.4	OBJETIVO IV.....	67
	MANUSCRITO 4.....	68
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	100
	APÊNDICE	107

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*. Essa doença apresenta alta morbidade em humanos e animais, sendo responsável por mais de um milhão de casos humanos anuais no mundo (COSTA et al., 2015a). Em países tropicais e em desenvolvimento, a falta de saneamento básico em áreas urbanas carentes, potencializada pelas fortes chuvas, provoca enchentes, inundações, e conseqüentemente um ambiente mais propício para transmissão hídrica da leptospirose (BARCELLOS; SABROZA, 2001; COSTA et al., 2001; TASSINARI et al., 2004). Devido a essas condições climáticas e sociais, a leptospirose urbana tem se tornado um problema de saúde coletiva comum em países como Brasil, Tailândia, Filipinas e Índia, entre outros (ARAÚJO, 2011).

No Brasil, os casos graves de leptospirose são reportados anualmente durante epidemias que ocorrem nos principais centros urbanos do país, tais como Salvador, Rio de Janeiro, São Paulo, Recife e Porto Alegre (KO et al., 1999; BARCELLOS; SABROZA, 2001; TASSINARI et al., 2004; SOARES et al., 2010; HAGAN et al., 2016). A partir da década de 70, devido à rápida urbanização, criaram-se ambientes físicos e sociais favoráveis para ocorrência das epidemias urbanas, alterando o padrão epidemiológico da leptospirose (VINETZ et al., 1996). Essas mudanças ocorreram principalmente em virtude da transição demográfica para os grandes centros urbanos, onde houve como consequência uma aglomeração da população de baixa renda em locais desprovidos de saneamento básico e em condições inadequadas de higiene e saúde (KO et al., 1999). Esse cenário contribuiu consideravelmente para a construção de um ambiente oportuno para possíveis hospedeiros/reservatórios animais, a exemplo dos roedores, tornando a disseminação e o contato com bactérias do gênero *Leptospira* mais frequentes, visto que a mesma tem como principal reservatório natural o *Rattus norvegicus*.

O ciclo de transmissão da leptospirose depende da interação de leptospiros com o reservatório animal e o reservatório ambiental (LEVETT, 2001; OLIVEIRA D.S.; GUIMARAES M.J.; PORTUGAL J.L.; MEDEIROS Z., 2009). Dentre os reservatórios animais, *Leptospira* patogênicas podem infectar várias espécies de animais domésticos, silvestres e sinantrópicos, sendo no ambiente urbano os ratos são os principais reservatórios (FAINE et al., 2000; BARRAGAN et al., 2017). Os humanos, considerados como hospedeiros acidentais, são infectados, assim como os animais por

meio de duas vias: via direta, acontece quando o hospedeiro entra em contato direto com o sangue e urina de animais portadores da bactéria; e a via indireta, ocorre por intermédio do meio ambiente (solo ou água) contaminado com a urina de animais reservatórios ou portadores da bactéria (MCBRIDE et al., 2005; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). A via indireta evidencia a importância do ambiente no ciclo de transmissão.

O gênero *Leptospira* apresenta 66 espécies, com mais de 300 sorovares, agrupados em 30 sorogrupos (PICARDEAU, 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2019; VINCENT et al., 2019). Com base na patogenicidade, o gênero *Leptospira* pode ser dividido em três grandes grupos: saprófitos, que são aquelas capazes de sobreviver e se reproduzir na água e no solo (PICARDEAU et al., 2008); patogênicos, causadoras da leptospirose, encontram no hospedeiro animal e humano um ambiente preferencial para se reproduzirem (JOHNSON et al., 1967; FAINE et al., 2000), e; intermediários, que apesar de terem sido associadas com casos em humanos a sua patogenicidade suscita dúvidas (CHIRIBOGA et al., 2015). Embora haja a distinção clínica dos grupos, geneticamente existem 2 clados (patogênicos e saprófitos) e 4 subclados (Patogênico, intermediário, saprófito S1 e S2) (VINCENT et al., 2019).

Tanto as espécies patogênicas como as espécies intermediárias podem sobreviver em diferentes nichos ambientais, abrangendo desde matrizes aquáticas (rios, córregos e esgoto) a solo (MATTHIAS et al., 2008; PUI et al., 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a). As leptospirose patogênicas podem permanecer vivas no ambiente por dias ou até meses, sendo que alguns fatores ambientais tendem a influenciar no tempo de sobrevivência (BIERQUE et al., 2020). Os parâmetros físico-químicos podem interferir na sobrevivência da *Leptospira*, incluindo temperatura, pH (SMITH et al., 1961; PARKER; WALKER, 2011), salinidade, turbidez, STD (Sólidos Totais Dissolvidos) (TRUEBA et al., 2004; VIAU; BOEHM, 2011) e umidade do solo (ESCÓCIO et al., 2010). Sabe-se que leptospirose apresentam um desenvolvimento ótimo sob uma temperatura de aproximadamente 30°C (FONTAINE; FLORENCE; CHANTAL, 2015), pH de 7,2 a 7,6 (SMITH et al., 1961; BIERQUE et al., 2020) e ambiente úmido (ESCÓCIO et al., 2010). Entretanto, no ambiente natural onde as variações desses parâmetros podem ser diversas, o entendimento sobre a complexa relação dos fatores ambientais e a presença de *Leptospira* patogênicas é ainda escasso. Ainda não se sabe se matrizes aquáticas, de áreas urbanas carentes têm características físico-químicas adequadas para a permanência de leptospirose.

Embora os estudos demonstrem a presença de espécies de *Leptospira* em matrizes ambientais como esgotos e solo, a dinâmica dessa bactéria no ambiente é pouco compreendida (GANOZA et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2018; THIBEAUX et al., 2018). Existe uma carência de evidências sobre a diversidade de *Leptospira* patogênicas em diferentes matrizes de áreas urbanas. A maior parte dos estudos sobre leptospirose esteve voltado à análise de dados epidemiológicos e de soroprevalência em roedores (COSTA et al., 2014; FELZEMBURGH et al., 2014; HAGAN et al., 2016). Porém, a maioria desses estudos não levou em consideração os determinantes ambientais e co-circulação de diferentes sorogrupos/sorovares.

O presente estudo teve como objetivos: (i) avaliar a presença, diversidade e dinâmica de espécies de *Leptospira* em diferentes nichos ambientais de uma área urbana, (ii) caracterizar os parâmetros físicos e químicos ambientais que estão associados com a presença e concentração de *Leptospira* em matrizes aquáticas, e (iii) caracterizar o perfil epidemiológico de indivíduos com presença de anticorpos anti-*Leptospira* em comunidades urbanas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA LEPTOSPIROSE

A leptospirose foi formalmente descrita pela primeira vez em 1886, pelo patologista Adolf Weil, na Alemanha, ao observar, em seres humanos, sinais clínicos de icterícia, nefrite e comprometimento hepático. Após essa descrição, a doença passou a ser conhecida como “Doença de Weil” ou “Tríade de Weil” (FAINE et al., 2000). A leptospirose era considerada uma doença de padrão ocupacional ou rural que acometia principalmente pessoas que trabalhavam em contato com esgotos e que exerciam atividades agrícolas e de recreação (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003). Popularmente ficou conhecida como febre dos pântanos, febre dos arrozais, febre outonal, tifo canino e febre dos nadadores (BRASIL, 2010).

Em 1915, no Japão, os médicos japoneses Inada e Ido (INADA, R.; IDO, 1915) isolaram, pela primeira vez, a bactéria a partir de sangue de trabalhadores acometidos da doença de Weil em minas. No ano de 1917, Ido e colaboradores, demonstraram o papel dos ratos como hospedeiro animal do patógeno (NOGUCHI, 1917). No mesmo ano, Aragão identificou a presença do sorovar *Icterohaemorrhagiae* em *Rattus norvegicus* no Rio de Janeiro (ARAGÃO, 1917). No ano seguinte, em 1918, Hideyo Noguchi propôs a criação do gênero *Leptospira*, denominando a espécie de *Leptospira icterohaemorrhagiae*, devido a sua morfologia espiralada (FAINE et al., 2000). Os primeiros casos de leptospirose no Brasil foram relatados no período de 1910 a 1940, sendo primeiramente confundidos com a febre amarela pelas semelhanças nos sinais e sintomas. As diferentes formas clínicas da leptospirose foram caracterizadas somente na década de 1930 (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001). Posteriormente, no ano de 1960, foram notificados vários surtos urbanos nas grandes metrópoles brasileiras (GONÇALVES et al., 2006).

2.2. AGENTE INFECCIOSO: *Leptospira*

2.2.1 Microbiologia

Leptospiras são bactérias muito finas que medem 0,1 µm de diâmetro por 6,0 a 25 µm de comprimento (BHARTI et al., 2003). A palavra *Leptospira* origina-se de

leptós, que em grego significa fino, e *spira*, que em latim significa espira. Essas espiroquetas apresentam em suas extremidades ganchos e endoflagelos, que permitem uma maior motilidade, principalmente em ambientes úmidos (FAINE et al., 1999).

Essas espiroquetas possuem características da parede celular semelhantes às bactérias Gram-negativas (BHARTI et al., 2003). Isso é devido à arquitetura de sua parede apresentar dupla-membrana, uma interna associada com a parede celular de peptidoglicanos, e uma externa composta por fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). São microrganismos aeróbios obrigatórios, possuem o crescimento lento, sendo considerados fastidiosos. No que diz respeito às fontes de nutrientes, necessitam de meios enriquecidos com vitaminas B2 e B12, ácidos graxos de cadeia longa, sais de amônia, além de albumina bovina sérica (BSA) e soro de coelho (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001). Em razão de suas exigências nutricionais, o meio de cultura Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris (EMJH) é o mais utilizado para o cultivo de *Leptospira in vitro* (ELLINGHAUSEN; MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON et al., 1967).

2.2.2 Taxonomia

O gênero *Leptospira*, pertencente à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae (FAINE et al., 2000). Esse gênero é dividido em mais de 300 sorovares, sendo diferenciados pelas relações antigênicas (PICARDEAU, 2017). Os sorovares antigenicamente semelhantes são agrupados em sorogrupos (YASUDA et al., 1987). A partir de 1989, com o desenvolvimento da biologia molecular, o gênero *Leptospira* foi classificado, com base na similaridade do DNA (BHARTI et al., 2003), e atualmente foi classificado em dois grandes clados: saprófitas, espécies capazes de sobreviver e se reproduzir no ambiente e que não causam infecções; e patogênicas, espécies causadoras da leptospirose em humanos e animais. Esses clados são subdivididos em dois subclados cada: P1 (patogênicos), P2 (intermediários), S1 (saprofíticos) e S2 (novo subclado de saprofíticos) (VINCENT et al., 2019).

Desta forma, atualmente, o gênero *Leptospira* compreende 66 espécies. Dessas, 35 espécies foram identificadas previamente: 13 pertencentes ao grupo I “Patogênico” (*L. adleri*, *L. alexanderi*, *L. alstoni*, *L. barantonii*, *L. borgpetersenii*, *L. ellisii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. mayottensis*, *L. noguchii*, *L. santarosai* e *L.*

weilii), 11 ao grupo II “Intermediário” (*L. broomii*, *L. fainei*, *L. hakeii*, *L. hartskeerlii*, *L. inadai*, *L. licerasiae*, *L. perolatii*, *L. neocaledonica*, *L. saintgironisiae*, *L. venezuelensis* e *L. wolffii*) e 11ao grupo III “Saprófitico” (*L. biflexa*, *L. brenneri*, *L. harrisiae*, *L. idonii*, *L. Levettii*, *L. macculloughii*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii* e *L. yanagawae*) (THIBEAUX et al., 2018). As outras 4 espécies novas foram identificadas no Japão *Leptospira johnsonii* sp. nov., *Leptospira ellinghausenii* sp. nov. *Leptospira ryugenii* sp. nov. e *Leptospira kobayasihii* – citadas no Vincent et al., 2019 e 25 novas espécies isoladas recentemente em amostras de solo e água, *Leptospira kemamanensis*, *Leptospira andrefontaineae*, *Leptospira bandrabouensis*, *Leptospira bouyouniensis*, *Leptospira congkakensis*, *Leptospira dzianensis*, *Leptospira dzoumogneensis*, *Leptospira fletcheri*, *Leptospira fluminis*, *Leptospira gomenensis*, *Leptospira ilyithenensis*, *Leptospira jelokensis*, *Leptospira kanakyensis*, *Leptospira langatensis*, *Leptospira montravelensis*, *Leptospira mtsangambouensis*, *Leptospira noumeaensis*, *Leptospira ognonensis*, *Leptospira perdikensis*, *Leptospira. putramalaysiae*, *Leptospira sarikeiensis*, *Leptospira selangorensis*, *Leptospira semungkisensis*, *Leptospira koniamboensis*, *Leptospira bourretii* (THIBEAUX et al., 2018; VINCENT et al., 2019). E outras duas espécies recentemente isoladas de fontes ambientais, *L. yasudae* e *L. stimsonii* (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019).

2.3 CICLO DE TRANSMISSÃO

O ciclo de transmissão da leptospirose depende da interação de aspectos importantes relacionados ao reservatório animal, hospedeiro acidental e o reservatório ambiental. Sendo o último considerado um elo importante na transmissão entre os animais e humanos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Os componentes do ciclo de transmissão serão minudenciados a seguir.

2.3.1 Reservatórios animais

Existe uma diversidade de hospedeiros e reservatórios/hospedeiros de manutenção de leptospirosas, estes incluem animais de produção e criados como companhia (suínos, bovinos, eqüinos, ovinos e caninos) (LILENBAUM et al., 2008; KURILUNG et al., 2017; ALMEIDA et al., 2019), sinantrópicos (roedores) (CALDERÓN et al., 2014; COSTA et al., 2015b) e silvestres (morcego, sariguê,

veados) (WILSON et al., 1998; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007; GOMARD et al., 2016). Alguns sorovares de leptospiras são comumente associados a um hospedeiro específico, de modo que estes são considerados adaptados à determinada espécie animal (BHARTI et al., 2003). Estudos que visam identificar as espécies de *Leptospira* presentes no ambiente podem ser usados para inferir os prováveis hospedeiros animais. Por exemplo, as associações de reservatórios e sorovares mais conhecidas são: sorovares Pomona, Tarassovi e Bratislava com suínos; sorovares Hardjobovis e Pomona com bovinos; sorovar Canicola com caninos; sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni com roedores, Cynopteri e Wolffi com morcegos (BHARTI et al., 2003).

Os roedores sinantrópicos são considerados os principais reservatórios naturais, sendo os principais responsáveis pela transmissão de *Leptospira* no ambiente urbano (DE FARIA et al., 2008). Isto se deve ao fato dos roedores apresentarem características fundamentais à manutenção das leptospiras *in vivo*, tais como: infecção renal crônica com excreção de *Leptospira* contínua; pH da urina relativamente alcalina; além de não manifestar sinais e sintomas clínicos típicos da doença. Deste modo, esses animais podem alojar as leptospiras nos rins, excretando-as vivas e em concentrações elevadas, pela urina no meio ambiente (SAMPAIO et al., 2011; COSTA et al., 2015b; BARRAGAN et al., 2017).

A ampla distribuição geográfica dos roedores sinantrópicos é uma das principais causas da leptospirose ser um problema global. O *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e o *R. norvegicus* (ratazana de esgotos) são os mais comuns reservatórios da *Leptospira*, porém estudos epidemiológicos e de biologia molecular indicam que *R. norvegicus* é a principal espécie transmissora da doença em ambientes urbanos (TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007; OLIVEIRA D.S.; GUIMARAES M.J.; PORTUGAL J.L.; MEDEIROS Z., 2009).

2.3.2 Hospedeiro acidental

No ciclo de transmissão de *Leptospira*, o homem é tido como hospedeiro acidental e terminal, apesar de estudo demonstrar que os humanos podem desenvolver leptospirose assintomática em regiões hiperendêmicas (GANOZA et al., 2010). O perfil epidemiológico da população urbana afetada no Brasil consiste de adultos jovens, do sexo masculino, residentes em áreas urbanas e infectados a partir de exposição ocupacional (REIS, 2008). Algumas profissões facilitam o contato com as leptospiras,

como trabalhadores em limpeza e desentupimento de esgotos, garis, catadores de lixo, agricultores, veterinários, tratadores de animais, pescadores, militares e bombeiros, dentre outras (BRASIL, 2005).

A epidemiologia da leptospirose é complexa, dado os vários fatores demográficos, sócio-ambientais e comportamentais que podem influenciar no risco de transmissão e conseqüentemente no aumento da incidência e surtos de leptospiroses (FELZEMBURGH, 2014). Desta forma, estudar o perfil sorológico anti-*Leptospira* dos residentes de comunidades urbanas, considerando as distinções dos sorovares infectantes, pode contribuir para um melhor entendimento das características que contribuem para a transmissão e assim, facilitar o desenvolvimento de medidas de controle da doença.

2.3.3 Reservatório ambiental

O ambiente desempenha um papel importante no ciclo da transmissão da leptospirose, uma vez que pode favorecer a manutenção e a disseminação da *Leptospira* (BARRAGAN et al., 2017). Estudos indicam que *Leptospira* patogênicas podem persistir no ambiente e, como conseqüência, favorece o contato com os animais e humanos (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003; SCHREIER et al., 2012; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a). Não há um padrão que determine o tempo de sobrevivência de *Leptospira* patogênica no ambiente, ressaltando a escassez de estudos com esse objetivo. A variação na persistência de algumas horas a vários meses foi demonstrada para diferentes espécies e sorovares em fontes aquáticas, como água da torneira, do rio, do mar, destilada e de esgotos (CHANG; BUCKINGHAM; TAYLOR, 1948; FONTAINE; FLORENCE; CHANTAL, 2015; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a). Em estudos com solo foi demonstrada sobrevida que varia de algumas horas a 190 dias (KIRSCHNER; MAGUIRE, 1957; OKAZAKI; RINGEN, 1957).

Presume-se que leptospirosas patogênicas têm a capacidade de sobreviver no ambiente, mas não de se reproduzem. No entanto, há evidências que sustentam a hipótese de que o solo pode ser um possível reservatório ambiental ou, pelo menos, um portador temporário, inclusive para as espécies patogênicas (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a; BIERQUE et al., 2020). Essa hipótese emerge das circunstâncias que *Leptospira* patogênicas podem sobreviver no ambiente por meses (BIERQUE et al., 2020).

As fortes chuvas atuam no sentido de promover um ambiente mais propício para transmissão hídrica, de modo que ao provocar enchentes e inundações, facilitam uma maior extensão à disseminação da bactéria e a exposição das pessoas ao agente (Figura 2) (BARCELLOS; SABROZA, 2001; COSTA et al., 2001; TASSINARI et al., 2004; PELISSARI et al., 2012). *Leptospira* patogênicas são liberadas por meio da urina de roedores na superfície do solo (COSTA et al., 2015b; SCHNEIDER et al., 2018), onde podem persistir por um período prolongado (THIBEAUX et al., 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a). Durante eventos de fortes chuvas, *Leptospira* patogênicas podem ser mobilizadas e ressuspensas no solo juntamente com sedimentos e direcionadas para esgotos abertos e drenagem com escoamento; como resultado há um aumento da turbidez e do TDS (VIAU; BOEHM, 2011; GARCÍA-ALJARO et al., 2017; BIERQUE et al., 2020).

Segundo Di Bernardo (1993) a turbidez é um parâmetro que quantifica a resistência encontrada na água para que a luz passe por ela. Essa resistência é causada por partículas em suspensão. De fato, turbidez, é uma medida indireta de sólidos em suspensão. Assim, turbidez e TDS poderiam ser usadas como medida de associação das condições ambientais favoráveis à sobrevivência de *Leptospira*.

Outros fatores físicos e químicos podem influenciar na sobrevivência de *Leptospira*, incluindo temperatura, pH e salinidade (CHANG; BUCKINGHAM; TAYLOR, 1948; SMITH et al., 1961; PARKER; WALKER, 2011; VINOD KUMAR et al., 2015). Experimentos conduzidos em laboratório mostraram que leptospiros patogênicas não conseguem crescer a 13°C, enquanto leptospiros saprófitas crescem a temperaturas entre 11-13°C, sendo um desenvolvimento bom em temperatura de em torno 30°C, para ambas (FONTAINE; FLORENCE; CHANTAL, 2015). No que diz respeito ao pH, o intervalo de 7,2 a 7,6 favorece o crescimento ótimo tanto de patogênicas como de saprófitas, sendo sensíveis ao pH ácido inferior a 7,0 (SMITH et al., 1961). Leptospiros não sobrevivem à alta taxa de salinidade onde a salinidade é em média 35 ‰ (CHANG; BUCKINGHAM; TAYLOR, 1948; OKAZAKI; RINGEN, 1957; HENRY; JOHNSON, 1978). Por outro lado, em outro estudo, mostrou que em uma solução com baixa concentração de sal (0,13% NaCl), a sobrevivência da *Leptospira* pode diminuir (TRUEBA et al., 2004). No entanto, esses estudos não retrataram um cenário em condições ambientais de áreas urbanas. Embora o estudo de Viau e Boehm (2011) tenha encontrado associação positiva de *Leptospira* de turbidez e salinidade com amostras de águas superficiais de riacho Havaí (VIAU; BOEHM, 2011).

A umidade também pode afetar a persistência de *Leptospira* no ambiente, sendo que o maior teor de umidade do solo está associado à sobrevivência da bactéria (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a). O solo apresenta um sistema dinâmico e organizado formado de resíduos de origem vegetal, animal e outros produtos que controlam a dinâmica populacional da microbiota, estabelecendo condições necessárias para a sobrevivência e proliferação de uma variedade de organismos (PEREIRA, 2008).

A composição granulométrica do solo influencia na capacidade de retenção da água e manutenção da umidade, logo o tipo de solo está diretamente relacionado com a permanência das leptospiros. Sabe-se que o maior número de isolados de *Leptospira* provenientes de solos ocorre onde há mais de 65% de umidade, sendo raramente positivos em solos arenosos (HENRY; JOHNSON, 1978). Solos arenosos por terem o diâmetro de suas partículas maiores que os solos argilosos fazem com que as leptospiros sejam liberadas no ambiente na presença de chuvas e inundações. Por outro lado, os solos argilosos possuem maior capacidade de retenção de água devido à presença de poros muito menores do que nos solos arenosos, permitindo que as leptospiros fiquem aderidas à matriz (ESCÓCIO et al., 2010).

Outro fator importante é a altitude, considerando que nas áreas mais baixas de comunidades urbanas carentes, geralmente ocorre o maior número de casos de leptospirose (REIS et al., 2008a). Isso pode ser explicado porque os fundos de vales podem concentrar coleções de água ou interferir no fluxo das águas de enchentes e de desastres naturais estabelecendo um importante meio de transmissão (BARCELLOS; SABROZA, 2001; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018b).

A presença de outros microrganismos também pode ter influência na sobrevivência da *Leptospira* patogênica no habitat ambiental (VINOD KUMAR et al., 2015). Estudos abordam que leptospiros têm a capacidade de formar biofilmes (RISTOW et al., 2008) e agregados com outros microrganismos, como por exemplo, a bactéria *Azospirillum brasilense* (TRUEBA et al., 2004; KUMAR et al., 2019) mecanismos estes que poderiam facilitar a sua permanência em nichos ecológicos. Além disso, esta forma de vida (biofilme) pode ter envolvimento no ciclo celular e na ecologia de muitos microrganismos, contribuindo assim para o seu crescimento (HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W. ; STOODLEY, 2004).

2.4 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DE *Leptospira* NO AMBIENTE

2.4.1 Isolamento de *Leptospira*

O isolamento dos patógenos é muito utilizado nas investigações epidemiológicas, pois é possível a identificação da espécie e o sorovar de *Leptospira* envolvidos em surtos, ou mesmo a espécie circulante em um determinado local. Isso permite melhor compreensão do ciclo zoonótico da região, facilitando e melhorando a elaboração de políticas para o controle da doença (JOHNSON et al., 1967; BIERQUE et al., 2020).

O isolamento pode ser feito em diferentes amostras ambientais, tais como solo e matrizes aquáticas. As condições de cultivo e isolamento *in vitro* a partir de amostras ambientais são desafiadoras, devido à diversidade de microrganismos presentes no ambiente (THIBEAUX et al., 2018). O cultivo em meio de cultura enriquecido permite o crescimento tanto de espécies de bactérias do gênero *Leptospira* quanto de outras bactérias, mas devido à competição por nutrientes e características metabólicas, o isolamento de espécies patogênicas de *Leptospira* é bastante prejudicado (FAINE et al., 1999). Historicamente, o isolamento de cepas patogênicas era por meio da inoculação do cultivo ambiental em animais susceptíveis. No entanto, essa técnica atualmente é inaceitável por razões éticas (BIERQUE et al., 2020).

Para isso, foram desenvolvidas algumas metodologias a fim de minimizar esses problemas. Um mecanismo físico bastante utilizado é o sistema de filtração, embora muito eficaz, é possível a perda de clones de leptospiros presentes na amostra inicial. Alguns autores têm padronizado o uso de antibióticos combinados como alternativa química, por exemplo, o STAFF (Sulfamethazole, Trimetoprima, Anfotericina B, Fosfomicina, 5-Fluorouracil) que permite o crescimento de bactéria do gênero *Leptospira* e a inibição de um alto espectro de contaminantes (CHAKRABORTY et al., 2011). Porém, nesse contexto, não é possível a separação das estirpes patogênicas das saprofíticas de *Leptospira*. Em conjunto, foi desenvolvido também o isolamento de *Leptospira* ambiental a partir de meio de cultura EMJH sólido em placa (THIBEAUX et al., 2018), de modo que é possível a separação de colônias de leptospiros e de outras bactérias.

2.4.2 Biologia Molecular

As ferramentas de biologia molecular vêm sendo a cada dia mais empregadas para a identificação de patógenos. Com o desenvolvimento do método de PCR, tornou-se possível pesquisar o material genético de *Leptospira* em diversas amostras clínicas: como sangue total, soro, tecidos e urina (LEVETT, 2001), bem como em amostras ambientais (GANOZA et al., 2006). Este método pode ser utilizado tanto com propósitos clínicos quanto para estudos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose.

Nos âmbitos epidemiológicos e ecológicos, os avanços contínuos da técnica permitiram, com maior precisão, identificar e quantificar *Leptospira* presente em uma variedade de amostras ambientais (GANOZA et al., 2006; TANSUPHASIRI et al., 2006; LUCHINI et al., 2008; AVIAT et al., 2009; VIAU; BOEHM, 2011). Foi documentada a presença de *Leptospira*, detectada por PCR quantitativa (qPCR), em amostras de solo e água de diferentes fontes e locais geográficos, incluindo poças e sistema de drenagens em áreas urbanas de Filipinas, Japão (SAITO et al., 2013) e Malásia (BENACER et al., 2013), bem como em poças, áreas de irrigação, rio e outras fontes de água abertas nas áreas rurais da Malásia (RIDZLAN et al., 2010), Havaí (VIAU; BOEHM, 2011) e em solo (SCHNEIDER et al., 2018).

O qPCR apresenta uma alta sensibilidade e especificidade (CRODA et al., 2007). Esta técnica além de permitir a detecção e amplificação do gene alvo permite quantificar a carga bacteriana presente na amostra (SMYTHE et al., 2002; AHMED; ANTHONY; HARTSKEERL, 2010). Os alvos moleculares mais comumente pesquisados são os genes 16S e 23S rRNA (WOO et al., 1997; TANSUPHASIRI et al., 2006). Outros estudos fizeram o uso de primers específicos para o gene *lipL32* (lipoproteína de membrana de *Leptospira* de 32-kDa) (HAAKE et al., 2000), que permite amplificar apenas *Leptospira* patogênica, validado tanto para amostras aquáticas (RIEDIGER et al., 2016; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018b), como amostras de solo (SCHNEIDER et al., 2018).

Dentre as 66 espécies de *Leptospira* identificadas, 20 tiveram o genoma sequenciado e apresentam mais de 400 sequências disponíveis nos bancos de dados de sequenciamento. Com o surgimento de novas técnicas de sequenciamento com um custo menor e maior eficiência, se tornou mais acessível a realização de estudos relacionados à diversidade genômica de diferentes isolados de *Leptospira* e correlacioná-los com dados clínicos e epidemiológicos (VINCENT et al., 2019).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE EM HUMANOS

O diagnóstico laboratorial consiste de métodos indiretos (ensaios sorológicos, baseados nas reações imunológicas) e de métodos diretos (demonstração de antígenos ou isolamento da bactéria *in vitro*). Os testes sorológicos são majoritariamente utilizados para o diagnóstico da leptospirose. Estes testes consistem em detectar anticorpos anti-*Leptospira* presentes no soro. A detecção de anticorpos específicos acontece em aproximadamente sete dias após o início dos sintomas.

Os ensaios sorológicos podem ser divididos em dois grupos: gênero-específicos e sorogrupo-específicos (LEVETT, 2001). Entre os métodos gênero-específicos o rotineiramente utilizado é o teste Ensaio imunoenzimático (ELISA) IgM (MCBRIDE et al., 2005). No sorogrupo-específico, o Teste de Microaglutinação (*microscopic agglutination test* ou MAT) é considerado o teste padrão-ouro sorológico. O MAT baseia-se em determinar o título anticorpos (IgM e/ou IgG) e a sua especificidade de sorogrupo presentes no soro do paciente (LEVETT, 2003). Isto se dá por meio da reação de aglutinação dos anticorpos com os antígenos dos lipopolissacarídeos presentes na parede das leptospiros. Este teste apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, um título $\geq 1:800$ é indicativo de infecção recente (CUMBERLAND et al., 2001).

2.6 MEDIDAS DE CONTROLE PARA A LEPTOSPIROSE

As medidas preventivas da leptospirose têm sido feitas a partir de esforços adotados ao controle químico de animais reservatórios, além da produção de vacinas e medicamentos. Entretanto, tais medidas não têm se mostrado eficientes, como evidenciado pelos indicadores de morbimortalidade da leptospirose (COSTA et al., 2015a). O controle de roedores é muitas vezes difícil pela falta de recurso disponível, principalmente nas favelas urbanas - onde os humanos são mais acometidos pela doença - pelo fato das condições de saneamento e infraestrutura serem mais precárias.

Uma vacina, por vez, não está disponível para o uso humano na maioria dos países (BHARTI et al., 2003) e a vacinação existente para os animais não protege contra todos os sorovares descritos do gênero *Leptospira* (SONADA et al., 2018). Isso por conta da sua especificidade, sendo necessário o uso da vacina que combata o sorovar prevalente de cada região (BOLIN et al., 1991).

Essas deficiências indicam a necessidade da identificação prévia da diversidade de espécies e sorovares de *Leptospira* nas áreas endêmicas, com o intuito de produzir vacinas mais abrangentes e eficazes (BHARTI et al., 2003; SILVA et al., 2007). Além do desenvolvimento de medidas preventivas para otimizar recursos humanos, financeiros e materiais. Um aspecto crítico no desenvolvimento de estratégias de prevenção é a identificação de fontes e áreas de risco na transmissão da doença. No entanto, muitas destas medidas carecem de evidência científica devido à falta de conhecimento sobre a dinâmica da leptospirose no ambiente.

Esforços vêm sendo feitos no desenvolvimento de estratégias de prevenção associadas à identificação de momentos e áreas de risco na transmissão da doença (BRASIL, 2009). Condições ambientais precárias, abastecimento de água insuficiente e sistemas de esgotos inadequados são frequentemente citados como os maiores obstáculos para o controle do desenvolvimento de surtos e epidemias. Dentro das atividades de saúde coletiva, o saneamento é um dos mais importantes meios de prevenção para eventuais ocorrências de doenças, entretanto sua efetividade na prevenção da leptospirose não tem sido avaliada.

Alguns fatores devem ser levados em consideração na determinação das áreas de risco, que podem ser definidas após o mapeamento dos locais prováveis de infecção de cada caso, associando-as: às áreas com antecedentes de ocorrência da doença em humanos e/ou em animais; aos fatores ambientais predisponentes, como topografia, hidrografia, temperatura, umidade, precipitações pluviométricas, disposição, coleta e destino do lixo; aglomerações populacionais e aos níveis de infestação de roedores e de outros animais domésticos e silvestres potencialmente transmissores na área em questão (BRASIL, 2009, 2010). A associação desses fatores permite uma melhor caracterização e quantificação da exposição e seus possíveis determinantes (REIS et al., 2008b; HAGAN et al., 2016). Vale ressaltar, que é fundamental a integração das unidades de vigilância epidemiológica e as instituições de pesquisa para a detecção de casos de leptospirose e o direcionamento de ações de controle mais específicas da doença (KOURY; SILVA, 2006).

Os esforços para descrever a epidemiologia da leptospirose e assim elaborar medidas de controle devem considerar como os reservatórios ambientais, que mantêm e transmitem doenças, influenciam na dinâmica, sobrevivência da bactéria e, finalmente, na distribuição e transmissão aos seres humanos. No quadro desta Tese, exploramos a

epidemiologia da leptospirose em cinco comunidades urbanas localizada na cidade do Salvador-Brasil.

3. HIPÓTESES

- 1) A presença e concentração de *Leptospira* em amostras ambientais urbanas são influenciadas por padrões climáticos, geográficos e físico-químicos.
- 2) A diversidade de espécies do gênero *Leptospira* em ambiente urbano é alta.
- 3) O perfil epidemiológico anti-*Leptospira* de residentes de comunidades urbanas difere a depender da sorovariante infectante.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a dinâmica e a diversidade de *Leptospira* spp. em amostras ambientais e avaliar as implicações na transmissão da leptospirose em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Ba.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a presença de *Leptospira* patogênica em amostras de esgoto e águas empoçadas;
- 2) Caracterizar a variação espaço-temporal na concentração bacteriana ambiental, em uma área de elevada transmissão de leptospirose;
- 3) Determinar se fatores físico-químicos ambientais influenciam na concentração de *Leptospira* patogênica em água de esgoto, em uma área de elevada prevalência de leptospirose;
- 4) Avaliar a diversidade de *Leptospira* em amostras ambientais de áreas urbanas;
- 5) Analisar comparativamente determinantes demográficos e sócio-ambientais associados à exposição a *Leptospira interrogans* Copenhageni e *Leptospira kirschneri* Cynopteri em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Brasil.

5. RESULTADOS

5.1 OBJETIVO I:

Avaliar a presença de *Leptospira* patogênicas em amostras de esgoto e águas empoçadas, bem como caracterizar a variação espaço-temporal na concentração bacteriana, em uma área de elevada transmissão de leptospirose.

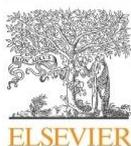
MANUSCRITO 1

Artigo publicado em Water Research, 2017.

Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment.

Arnau Casanovas-Massana, Federico Costa, Irina N. Riediger, Marcelo Cunha, Daiana de Oliveira, Diogenes C. Mota, Erica Sousa, Vladimir A. Querino, Nivisson Nery Jr., Mitermayer G. Reis, Elsie A. Wunder Jr., Peter J. Diggle, Albert I. Ko.

APRESENTAÇÃO: Este artigo contempla a investigação proposta no primeiro objetivo específico da presente tese. Teve como objetivo principal investigar a presença e concentração de *Leptospira* patogênica em águas de esgoto e água empoçada de uma favela urbana endêmica para leptospirose, além de avaliar se a dinâmica espaço-temporal do patógeno explica a variação do risco de infecção. Os resultados demonstram que a água de esgoto tem uma carga de *Leptospira* patogênica que varia de acordo com os níveis dos vales e a precipitação de chuva.



Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment



Arнау Casanovas-Massana ^{a,1}, Federico Costa ^{a,b,c,1}, Irina N. Riediger ^{b,d}, Marcelo Cunha ^e, Daiana de Oliveira ^b, Diogenes C. Mota ^b, Erica Sousa ^b, Vladimir A. Querino ^b, Nivisson Nery Jr. ^b, Mitermayer G. Reis ^{a,b}, Elsie A. Wunder Jr. ^a, Peter J. Diggle ^f, Albert I. Ko ^{a,b,*}

^a Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public Health, Yale University, 60 College Street, New Haven, CT, USA

^b Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rua Waldemar Falcão, 121, Salvador, Bahia, Brazil

^c Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Rua Basílio da Gama, s/n, Campus Universitário Canela, Salvador, Bahia, Brazil

^d Laboratório Central do Estado do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, Rua Sebastiana Santana Fraga, 1001, Guatupê, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil

^e Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

^f Faculty of Health and Medicine, University of Lancaster, Lancaster LA1 4YG, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2017

Received in revised form

20 November 2017

Accepted 29 November 2017

Available online 30 November 2017

Keywords:

Leptospira

Leptospirosis

Surface water

Public health

Sewage

Urban slum

ABSTRACT

Leptospirosis has emerged as an important urban health problem as slum settlements have expanded worldwide. Yet the dynamics of the environmentally transmitted *Leptospira* pathogen has not been well characterized in these settings. We used a stratified dense sampling scheme to study the dynamics of *Leptospira* abundance in surface waters from a Brazilian urban slum community. We collected surface water samples during the dry, intermediate and rainy seasons within a seven-month period and quantified pathogenic *Leptospira* by quantitative PCR (qPCR). We used logistic and linear mixed models to identify factors that explained variation for the presence and concentration of *Leptospira* DNA. Among 335 sewage and 250 standing water samples, *Leptospira* DNA were detected in 36% and 34%, respectively. Among the 236 samples with positive results geometric mean *Leptospira* concentrations were 152 GEq/mL. The probability of finding *Leptospira* DNA was higher in sewage samples collected during the rainy season when increased leptospirosis incidence occurred, than during the dry season (47.2% vs 12.5%, respectively, $p = 0.0002$). There was a marked spatial and temporal heterogeneity in *Leptospira* DNA distribution, for which type of water, elevation, and time of day that samples were collected, in addition to season, were significant predictors. Together, these findings indicate that *Leptospira* are ubiquitous in the slum environment and that the water-related risk to which inhabitants are exposed is low. Seasonal increases in *Leptospira* presence may explain the timing of leptospirosis outbreaks. Effective prevention will need to consider the spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters to reduce the burden of the disease.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leptospirosis is a widespread zoonotic disease that causes more than 1 million cases and 50,000 deaths each year (Costa et al., 2015; Torgerson et al., 2015). The disease ranges from mild flu-like symptoms to severe complications, such as Weil's disease and

pulmonary hemorrhagic syndrome, for which case fatality is 5 to >40% (Haake and Levett, 2015; Ko et al., 2009). Pathogenic *Leptospira* colonize the kidneys of a broad range of mammalian species and are shed in the urine into the environment where they survive for periods that range from a few hours to several months depending on the species, serovar and the characteristics of the environmental matrix (Hellstrom and Marshall, 1978; Khairani-Bejo et al., 2004; Okazaki and Ringen, 1957; Thibeaux et al., 2017; Trueba et al., 2004). Leptospirosis is an environmentally-transmitted disease: human infection occurs primarily through contact of abraded skin or mucous membranes with contaminated

* Corresponding author.

E-mail address: albert.ko@yale.edu (A.I. Ko).

¹ These authors contributed equally.

environment, most notably water (Ko et al., 2009). However, there is a lack of knowledge regarding the abundance and distribution of pathogenic *Leptospira* in surface waters that serve as a transmission source in endemic areas. Moreover, the environmental factors that influence their abundance and distribution, and therefore the risk of infection, are poorly understood.

Leptospirosis has recently emerged as a major public health problem among impoverished urban settlements in tropical and subtropical developing countries (Karande et al., 2002; Ko et al., 1999; Kyobutungi et al., 2008; Riley et al., 2007). Inadequate sanitation in these settings, specifically precarious sewer systems and trash accumulation, promotes the thriving of rodents, which are major reservoirs of pathogenic *Leptospira* (Costa et al., 2014; Panti-May et al., 2016; Riley et al., 2007; Unger et al., 2016). 865 million people resided in urban slums in 2012 and this number is expected to double by 2025 (UN-HABITAT, 2013). Consequently, the burden of the disease will continue to increase in the coming years.

Exposure to contaminated water is a well-recognized risk factor for leptospirosis in urban slums. Climatic conditions leading to an increased human exposure to water appear to be important drivers for disease transmission. Leptospirosis outbreaks frequently occur during periods of seasonal rainfall and flooding in the urban slum setting (Ko et al., 1999; Tassinari et al., 2004), as well as in other epidemiological situations where transmission is endemic (Desvars

et al., 2011; Ko et al., 2009; Lau et al., 2016; Smith et al., 2013; Tangkanakul et al., 2005; Weinberger et al., 2014), or following extreme weather events (Agampodi et al., 2014; Amilasan et al., 2012; Karande et al., 2002; Trevejo et al., 1998). In addition, the proximity of households to open drainage systems and direct contact with sewage, flooding water and runoff have been associated with increased risk of infection in prospective, cross-sectional and case control studies (Barcellos and Sabroza, 2001; Felzemburgh et al., 2014; Navegantes de Araújo et al., 2013; Oliveira et al., 2009; Reis et al., 2008; Sarkar et al., 2002). Furthermore, pathogenic *Leptospira* have been detected in sewers, streams and puddles from endemic areas (Ganoza et al., 2006; Kurilung et al., 2017; Muñoz-Zanzi et al., 2014; Saito et al., 2013; Sumanta et al., 2015). Altogether, this highlights the key role of surface waters in the transmission of leptospirosis in urban slums.

Yet the abundance and distribution of pathogenic *Leptospira* in the surface waters of endemic areas have not been well characterized. To date, only one study performed in Peru has succeeded in quantifying pathogenic *Leptospira* in the waters of an urban slum, reporting mean concentrations around 1000 leptospires/ml (count range 2–1286) (Ganoza et al., 2006). In this study, we aimed to provide high-resolution information on the presence and concentration of pathogenic *Leptospira* in an urban slum at high-risk for leptospirosis, and to evaluate whether the spatiotemporal

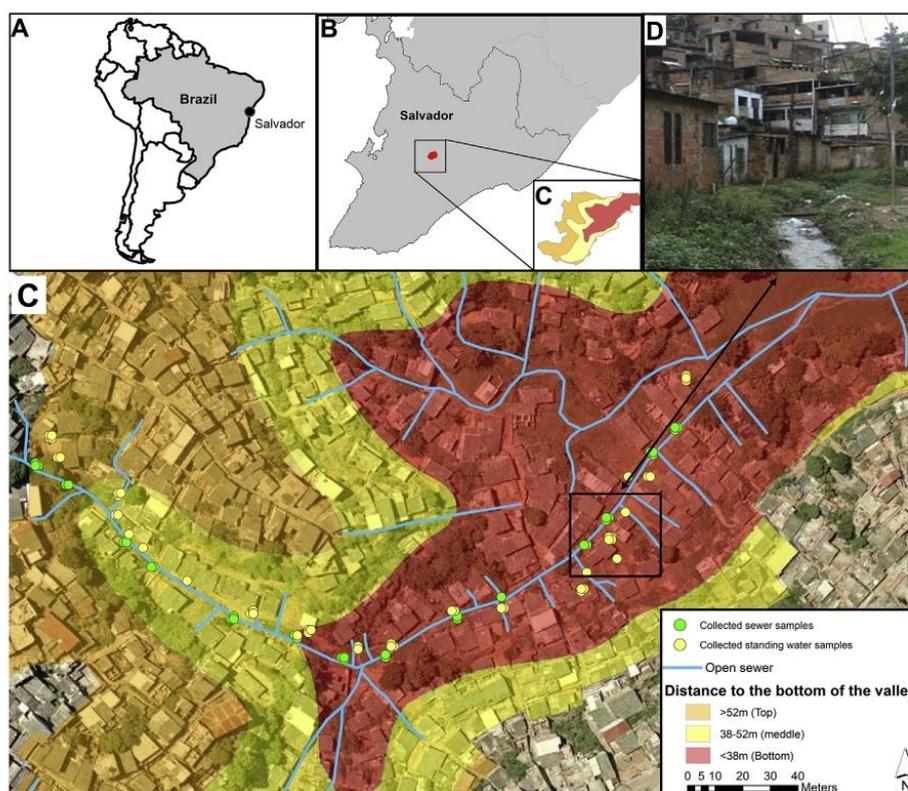


Fig. 1. Pau da Lima community in the city of Salvador, Brazil. (A) Location of Salvador in South America. (B) Location of the study site (red) within the city. (C) Sampling sites along the open sewer in the studied valley. In orange, yellow and red, areas of the valley above 52 m (valley top), between 52 and 38 m (valley middle), and below 38 m (valley bottom), respectively, as measured from the lowest point of the valley. (D) Photograph of a representative section of the open sewer at the bottom of the valley.

dynamics of the pathogen explained the variation in risk of infection. To this end, we performed a dense sampling of the surface waters from a Brazilian urban slum with high infection rates (37.8 per 1000 individuals per year) (Hagan et al., 2016) where leptospirosis outbreaks occur each year in the rainy season (Ko et al., 1999; Sarkar et al., 2002). We collected 585 samples of sewage and standing water from different elevations within this urban slum across a seven-month period that spanned the dry, intermediate and rainy seasons. Presence/absence of pathogenic *Leptospira*, and concentrations in positive samples, were estimated by quantitative-PCR (qPCR) and subsequently modeled using logistic and linear mixed models, respectively, to identify the factors that explained their spatial and temporal variation.

2. Methods

2.1. Study site

The study was conducted in Pau da Lima, an urban slum community located in the city of Salvador, Brazil (Fig. 1A). The study site has been previously described in detail (Reis et al., 2008; Unger et al., 2016). Briefly, the community consists of four valleys with an area of 0.46 km² (Fig. 1B) and has a population of 12,651 inhabitants (Felzemburgh et al., 2014). The slum has a precarious sanitary infrastructure with open sewers and rainwater drainage that overflow during heavy rainfall events, leading to frequent flooding in valley bottoms during the rainy season. Salvador has a typical tropical rainforest climate (Köppen classification: Af) with relatively stable temperatures throughout the year daily mean, and average high and low values; 25.3 °C, 28.2 °C, and 22.7 °C, and high relative humidity (average, 80.9%). The average annual precipitation is 2144 mm, with a monthly average rainfall of over 60 mm, indicating that there is no authentic dry season. However, the period from April to July has an average rainfall of over 200 mm/month (Brazilian National Institute of Meteorology, 2015) and it is locally considered as the rainy season.

2.2. Sampling design and collection

One of the valleys in the Pau da Lima community with similar environmental features and risk factors for leptospirosis than the other valleys (Felzemburgh et al., 2014; Hagan et al., 2016) was selected for the longitudinal survey of surface waters. The valley selected had a slightly smaller surface and a lower incidence of violence, which allowed for a denser sampling and facilitated the access to the sampling sites. The stratified sampling scheme was designed to collect 672 water samples from three strata of sampling sites based on elevation (valley top, middle and bottom) and three collection periods (rainy, intermediate and dry) during the seven-month period from July 2011 to January 2012 inclusive. The valley was divided into three sections of approximately 30,000 m², which corresponded to above 52 m (valley top), between 38 and 52 m (valley middle), and below 38 m (valley bottom), measured from the lowest point of the valley. We stratified sites according to elevation since previous studies found that leptospirosis infection risk was inversely associated with household elevation (Hagan et al., 2016). Fourteen paired sampling sites were selected along a continuous section of the major open sewer that flows from the top to the bottom of the valley. Among the 14 paired sampling sites, four, eight and sixteen sites were distributed at the valley top, middle and bottom sections, respectively. Within each valley section, paired sampling sites were approximately 30 m apart from each other. For each paired site, sampling was performed at two locations that were 5 m apart between sewer confluences (Fig. 1C). At each of the 28 sampling points, samples were collected from the

open sewer and from standing water located in an area contiguous to the sewer. Standing water was defined as any accumulation of water without connection to a sewer or other water flow. If standing water was not available in the area adjacent to the sewer, the sample was collected within a radius of 15 m from the established site, or otherwise not collected.

Samples were collected during three sampling campaigns: July 2011, November 2011 and January 2012 (Fig. 2). The sampling months were selected based on the historical average monthly rainfall (1996–2009); those months with an average precipitation higher than 200 mm were considered as the rainy season, those with less than 100 mm were the dry season, and those with a precipitation between 100 and 200 mm were the intermediate season (Fig. S1). Measures of daily rainfall were obtained from a municipal weather station located 0.9 km away from the study site. Within each sampling period, samples were collected at each of the 28 sampling points on three days each week, both in the morning (from 8 a.m. to 10 a.m.) and in the afternoon (from 4 p.m. to 6 p.m.). Because of the correlation between leptospirosis incidence and seasonal rainfall (Ko et al., 1999), samples were collected for two consecutive weeks in July 2011, but only one week in November 2011 and January 2012. Sample collection points were georeferenced and entered in a Geographic Information System (GIS) database (Reis et al., 2008) during the first sampling campaign to facilitate the return to the same sites in the subsequent campaigns. Aliquots of 50 mL of sewage or standing water were collected in sterile polyethylene containers using aseptic techniques at the selected sites and times, and refrigerated at 4 °C up to 18 h before processing.

2.3. Quantification of *Leptospira* DNA in surface water

DNA was extracted following a procedure described previously (Riediger et al., 2016). Briefly, samples were homogenized by inversion and a 40-mL aliquot was centrifuged at 15,000g for 20 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was recovered and frozen at –80 °C. Pellets were then thawed in batches of 23 samples and DNA was extracted using the PowerSoil[®] DNA Isolation kit (MoBio) following the manufacturer's instructions. An extraction blank consisting of ultrapure water was added to each extraction batch to monitor for cross-contamination.

Pathogenic *Leptospira* were quantified using a TaqMan[®] assay targeting a fragment of *lipL32* gene (Stoddard et al., 2009) with minor modifications on a 7500 Fast Real-Time PCR thermocycler (Applied Biosystems). Calibration curves based on genomic DNA from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (Nascimento et al., 2004) were run on each plate and used to transform quantification cycles (Cq) to concentrations (genome equivalents (GEq)/reaction). Non-template controls were randomly included in all rows of each plate to discard the presence of contaminating DNA. Samples, controls and calibrators were run in duplicate. All negative controls (extraction blanks and non-template controls) were negative in all cases. qPCR inhibition was monitored using a specifically designed Internal Amplification Control (IAC) plasmid tested in singleplex reactions. See Supplementary Material for further details on the qPCR assay, calibrators, genome equivalent calculations, inhibition assay and estimation of the correction factor. DNA extractions and qPCR analyses were performed according to the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines (Bustin et al., 2009).

To confirm the specificity of the qPCR in detecting pathogenic *Leptospira*, 15% of the samples with a positive result in each sampling season were randomly selected for DNA sequencing. The qPCR products were loaded in a 2% agarose gel, submitted to

electrophoresis and then purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. Purified products were Sanger sequenced using primer LipL32-45F, edited using BioEdit 7.2.5 (Ibis Biosciences) and compared to the sequences available in GenBank using BLAST.

2.4. Data treatment

Samples were considered positive when both qPCR replicates showed amplification before a Cq of 40. Samples with a single positive reaction were submitted to an additional qPCR in duplicate. If in this second qPCR the sample amplified in either of the replicates, it was considered positive. The GEq per reaction in all positive qPCR replicates were averaged, normalized by the volume of water analyzed, and \log_{10} -transformed to obtain concentrations in GEq/mL. To account for the DNA loss during sample processing and DNA extraction, *Leptospira* GEq concentrations were corrected using a calibration curve generated in sewage spiked with known concentrations of *L. interrogans* (Riediger et al., 2016) (Supplementary Material).

Positive qPCR samples with concentrations below the 95% hit-rate lower limit of detection of the qPCR (18 GEq/mL) (Riediger et al., 2016) were included in the positivity analysis but were excluded in the concentration analysis. In addition, standing water samples that could not be collected due to the absence of water were treated as negatives for modeling purposes since this absence implied no risk for leptospirosis infection.

2.5. Statistical analysis

Logistic and linear mixed models were used to analyze the occurrence of a positive *Leptospira* sample and the \log_{10} *Leptospira* concentration in positive samples, respectively. In both models, we accounted for the repeated-measure structure of the data by including random effect terms for the sampling location, week and day within week. Surface water type, season, period of the day and elevation were included as fixed effects. Elevation was treated as a three-level factor (top, middle and bottom). We first selected only variables that were statistically significant in their respective univariate random effect models (logistic or linear). After including these significant variables in a general model, all possible interactions were tested. As a last step of the modeling strategy, fixed and interaction terms that did not remain significant were eliminated. In all steps, likelihood ratio tests were used for the inclusion or elimination of variables ($p < 0.05$). Random terms were kept in the models even if their respective variances were relatively small given the intrinsic expected correlation in the space and time (location, week and day within the week). In the resulting logistic and linear mixed models, we calculated the predicted probability of finding a surface water sample with *Leptospira* DNA and the predicted *Leptospira* DNA concentration according to specific interactions by centering the remaining variables on their observed mean values (Fox, 2003). When a factor with more than two levels was included in the model according to the likelihood ratio criterion described above, we assessed the significance of differences between factor levels using post-hoc pairwise tests (Lenth, 2016). Analyses were conducted using the statistical software R v3.1 (R Core Team, 2013), with lme4 (Bates et al., 2015), lsmeans (Lenth, 2016), lmerTest (Kuznetsova et al., 2013) and Effects (Fox and Hong, 2009) packages. Cohen's kappa was used to estimate the strength of agreement between sewage and standing water samples collected in the same site. Comparisons were made using Welch's *t*-test in GraphPad Prism v7.01.

2.6. Leptospirosis incidence

Severe leptospirosis cases in the metropolitan region of Salvador within the study period were identified from an active surveillance program at the state infectious diseases hospital (Couto Maia Hospital). The study team prospectively evaluated admissions to identify suspected cases who met the clinical definition for severe leptospirosis (Ko et al., 1999) and enrolled patients per written informed consent protocols approved by the ethics committees of the Oswaldo Cruz Foundation and Yale University.

3. Results

3.1. Rainfall pattern and leptospirosis incidence

During the study period, the rainfall pattern differed from the historical pattern described for the city of Salvador, Brazil (Brazilian National Institute of Meteorology, 2015). We observed a higher mean cumulative monthly rainfall in November 2011 compared to July 2011 and January 2012 (329.1 mm vs 81.9 and 36.4 mm, respectively, Fig. S1). Therefore, the sampling period in July 2011 was defined as the intermediate season, November 2011 as the rainy season, and January 2012 as the dry season.

A total of 101 severe leptospirosis cases were reported citywide during the 7-months study period, with an incidence of 3.8 cases per 100,000 inhabitants. The number of cases peaked in the rainy season (November 2011) with 6–13 cases per week following intense rainfall events (Fig. 2). In the dry and intermediate seasons, 0 to 5 cases were reported each week.

3.2. Specificity of *Leptospira* qPCR assay

To verify whether the qPCR reaction was specifically detecting pathogenic *Leptospira* in surface water samples, we partially sequenced the *lipL32* amplicon from 36 samples (15.3%) out of 236 qPCR-positive samples. These samples were randomly selected and came from all seasons, types of water, collection times and locations and comprised samples with all the range of estimated concentrations. All 36 sequenced samples showed their highest similarity to other *Leptospira lipL32* gene sequences deposited in GenBank (*Leptospira* sp. (24), *L. interrogans* (11) and *L. borgpetersenii*

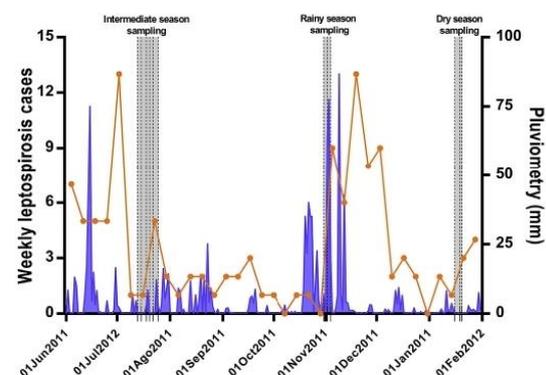


Fig. 2. Weekly severe leptospirosis cases identified at the state infectious diseases hospital (orange) and precipitation (blue) during the study period. The shaded areas denote the three sample collection campaigns during the intermediate, rainy and dry seasons. The vertical dashed lines indicate the collection days in each sampling campaign.

(1)), irrespective of the *Leptospira* DNA concentration of the sample (see Table S1 for sequence accession numbers and highest hits). This result confirmed that the *lipL32* qPCR method is highly specific for the detection of pathogenic *Leptospira* in complex environmental surface water matrices.

3.3. Distribution and quantification of *Leptospira* DNA in surface waters

A total of 585 samples (335 sewage and 250 standing water) were collected in Pau da Lima and tested by qPCR for the presence of pathogenic *Leptospira*. 86 standing water samples could not be collected because no accumulation of water was found in the designated sampling area and one sewage sample was lost during processing (Table 1).

Among 585 samples collected, 236 (40%) were positive for *Leptospira* DNA (36% of 335 sewage samples, and 46% of 250 standing water samples, respectively). Sewage showed the highest positive proportion in the rainy season, with up to 50% of 84 samples positive, and the lowest in the dry season with only 15% of 83 samples positive. In addition, more sewage samples were positive for pathogenic *Leptospira* DNA at the bottom of the valley (41% of 191 samples) than in the middle and top areas of the valley. In contrast, the proportion of positive samples in standing water was more stable across seasons and elevations (Table 1). When accounting for non-collected samples the overall positivity decreased to 34% for standing water. Standing water was less frequently found in the middle of the valley and during the dry season with only 46% and 57% of samples collected, respectively. As a result, the overall standing water positivity in the middle of the valley and the dry season was particularly affected, with a reduction of approximately a 50% (Table 1). Furthermore, sewage and standing water samples collected in the morning and afternoon had similar positivity ratios. Finally, the strength of agreement between the results obtained for paired sewage and standing water samples collected in the same site was only 'fair' (62% observed agreements; $\kappa = 0.21 \pm 0.06$) (Table S2).

Among 231 qPCR positive samples with concentrations above the lower limit of detection, the geometric mean concentration and count range of *Leptospira* DNA was 152 [21–17,378] GEq/mL (143 [22–2187] and 166 [20–17,378] GEq/mL in sewage and standing water, respectively). Overall, mean geometric *Leptospira* DNA concentrations in surface water from the urban slum surveys were generally low and did not vary substantially with respect to type of water, season of collection, elevation in the valley and period of collection (Fig. 3).

3.4. Spatial and temporal predictors of *Leptospira* DNA presence and concentration

The final logistic mixed model for the probability of finding a positive sample for *Leptospira* DNA included fixed terms (elevation), fixed terms with interactions (surface water type, season, and period of collection) and random effects (location, week, and day within week) (Table 2). Elevation was included in the model as a fixed term indicating that the localization of the sample in the valley modified their probability of being positive for *Leptospira* independently of the other variables. The modeled probability of finding a positive sample, with all variables other than elevation set at their observed mean values, was higher in the bottom of the valley (38%) than in the middle (22%) or the top (29%), although the differences with respect to the top section were not statistically significant ($p = 0.0007$ and $p = 0.269$, respectively) (Fig. 4A).

In addition, the model included two significant interaction terms: season and type of water, and season and period of collection. The analysis of the interaction between season and type of water showed that sewage samples in the rainy season and the intermediate season had higher probabilities to be positive (47% and 37%, respectively) than those in the dry season (13%; $p = 0.0002$ and $p < 0.0001$, respectively). In contrast, in standing water samples the probability of being positive did not vary significantly between seasons (Fig. 4B). Furthermore, in the rainy season sewage samples showed significantly higher probabilities to be positive than standing water ones (47% and 27%, respectively; $p = 0.0096$). On the contrary, in the dry season, standing water samples were more likely to show positive results, although the difference was not statistically significant (24% and 12%, respectively; $p = 0.0553$) (Fig. 4B). However, when considering all seasons together no difference was found between the overall positivity of sewage and standing water (36% and 34%, respectively, $p = 0.6028$). Regarding the interaction between the season and the period of collection, the model showed that in the rainy season samples had higher probabilities to be positive in the morning than in the afternoon (49% and 26%, respectively; $p = 0.0038$), whereas no differences were found between the intermediate and dry seasons (Fig. 4C). To sum up, the logistic mixed model revealed that elevation, season, type of water, and period of collection were spatial and temporal predictors of the probabilities of finding *Leptospira* positive samples in the surface waters of the urban slum.

The final linear mixed model for the concentration of *Leptospira* DNA in positive samples included only season and period of collection as fixed effects and random effects for location, week and day within week. The other variables (type of water and elevation)

Table 1
Collection success and occurrence of pathogenic *Leptospira* in sewage and standing water samples from the urban slum community. The samples are stratified by season, elevation, and period of collection. The overall positivity used for modeling purposes was calculated by considering non-collected standing water samples as negative.

	Sewage samples				Standing water samples			
	Targeted	Collected ^a	Positive	Overall positivity	Targeted	Collected	Positive	Overall positivity
TOTAL	336	335	121 (36%)	36%	336	250 (74%)	115 (46%) (46.6%)	34%
Seasons								
Intermediate	168	168	67 (40%)	40%	168	141 (84%)	67 (48%)	40%
Rainy	84	84	42 (50%)	50%	84	61 (73%)	26 (42%)	31%
Dry	84	83	12 (15%)	15%	84	48 (57%)	22 (46%)	26%
Elevation								
Top	48	48	14 (29%)	29%	48	34 (71%)	17 (50%)	35%
Middle	96	96	28 (29%)	29%	96	44 (46%)	21 (48%)	22%
Bottom	192	191	79 (41%)	41%	192	172 (90%)	77 (45%)	40%
Period								
Morning	168	168	65 (39%)	39%	168	132 (79%)	64 (49%)	38%
Afternoon	168	167	56 (34%)	34%	168	118 (70%)	51 (43%)	30%

^a The percentages of collected sewage samples are omitted because only one sample could not be collected and tested for *Leptospira* presence.

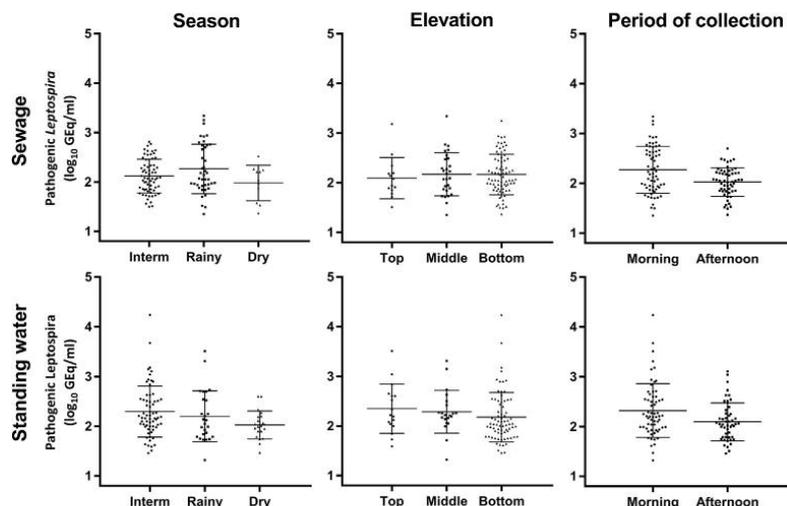


Fig. 3. Concentration of pathogenic *Leptospira* spp. in sewage and standing water samples from Pau da Lima stratified by season, elevation and time of collection. The geometric mean and standard deviation are shown for each group of samples.

Table 2

Estimated regression parameters and standard errors in the final logistic and linear mixed models on the probability of finding a positive sample and \log_{10} concentration for *Leptospira* DNA, respectively. (*) $p = 0.05$ (**) $p = 0.01$; (***) $p = 0.001$.

	Coefficient estimate (SE)	
	Logistic model for probability	Linear model for concentration
Intercept	-1.57 (0.39) ***	1.92 (0.09) ***
Intermediate season	1.36 (0.42) **	0.16 (0.08)
Rainy season	1.35 (0.47) **	0.18 (0.09) *
Standing water	0.77 (0.40)	—
Morning period	0.00 (0.39)	0.09 (0.15) ***
Top elevation	-0.39 (0.20)	—
Middle elevation	-0.74 (0.25) ***	—
<i>Interaction terms</i>		
Intermediate season X Standing water	-0.77 (0.46)	—
Rainy season X Standing water	-1.64 (0.52) **	—
Intermediate season X Morning period	0.10 (0.45)	—
Rainy season X Morning period	0.97 (0.52)	—

were not statistically significant in the final model (Table 2). In the rainy season, positive samples had significantly higher concentrations of *Leptospira* DNA when compared to the dry season (162 and 107 GEq/mL, respectively; $p = 0.0429$). Moreover, samples collected in the morning showed higher concentrations than those collected in the afternoon (180 and 108 GEq/mL, respectively; $p < 0.0001$). However, despite being statistically significant, these differences were small (less than 0.25 \log_{10} units in all cases), which implied that the geometric means in positive samples were virtually the similar regardless of type of water, elevation, season or period of collection.

4. Discussion

In this study, we aimed to determine the abundance of pathogenic *Leptospira* in the surface waters of an urban slum with high risk for leptospirosis infection, and to evaluate how their presence and concentration varied across space and time. We found that pathogenic *Leptospira* are ubiquitous in sewage and standing water (>33% positivity) albeit in concentrations that are generally low (around 150 GEq/mL). Our results indicate that pathogenic *Leptospira* have a heterogeneous spatial and seasonal distribution in

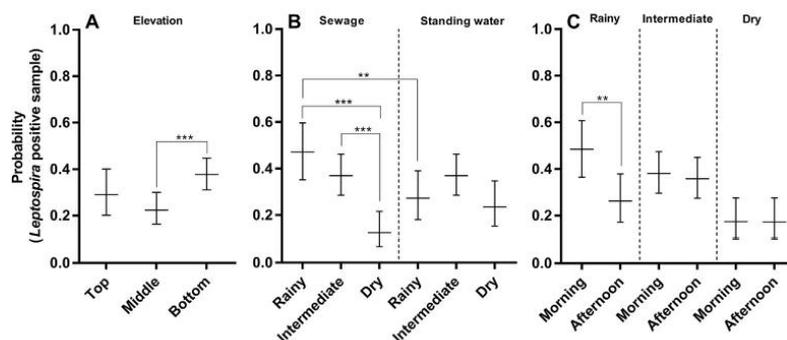


Fig. 4. Predicted probability of finding a *Leptospira* DNA positive sample in the final logistic mixed model according to specific interactions. (A) Elevation (B) Interaction of season and type of water (C) Interaction of season and period. Probabilities were calculated by centering the remaining variables on their observed mean values and are expressed as decimals with 95% confidence intervals. (**) $p = 0.01$; (***) $p = 0.001$.

our study site, being more prevalent towards the lower areas of the valley and in the rainiest months. Nevertheless, despite the spatial and seasonal variation, there is a widespread and persistent but low environmental burden across the study site.

The probability of finding positive *Leptospira* samples in the sewage of the urban slum presented a seasonal pattern. The number of positive samples increased during the rainy season, reaching its minimum during the dry season (Table 1 and Fig. 4). This increased positivity may be due to a combination of factors such as a mobilization of pathogenic *Leptospira* from soil reservoirs because of rainfall, a dissolution of environmental biofilms (Barragan et al., 2011), or an enhanced survival due to higher levels of oxygen or the dilution of sewage toxic compounds (Chang et al., 1948), among others. The specific dynamics of mobilization, dispersion and survival of pathogenic *Leptospira* in water and soil deserve further studies. The seasonal pattern observed in our study site is consistent with the increased number of severe leptospirosis cases reported in the metropolitan area of Salvador, Brazil 1–4 weeks after intense rainfall events (Fig. 2). This seasonal distribution has been reported in other settings around the world where large epidemics occur in the rainy season preceded by episodes of heavy rainfall such as tropical storms, typhoons or monsoons (Amilasan et al., 2012; Karande et al., 2002; Tangkanakul et al., 2005). The increased contact with potentially contaminated water and soil due to flooding and runoff has been hypothesized as the main driver of leptospirosis outbreaks (Amilasan et al., 2012; Bourhy et al., 2012; Hagan et al., 2016; Karande et al., 2005, 2002). Together with this exposure factor, our results provide the first empirical data showing that in the rainy season surface waters, and sewage in particular, are more likely to contain pathogenic *Leptospira* and thus, there is a higher environmental risk circulating in the urban slum.

Both sewage and standing water samples were potential reservoirs of pathogenic *Leptospira* in the environment. Up to 50% of sewage samples were positive in the rainy season, which suggests that in the rainy periods, sewers and its overflow are drivers of infection. In contrast, in the dry season standing water samples showed substantially -although not significantly-higher positivity ratios than sewage and, in general, they presented a diminished temporal variability (Table 1 and Fig. 4B). The differences between sewage and standing water were further accentuated by the weak positivity concordance observed in paired samples (Table S2). Taken together, these results lead us to hypothesize that sewage and standing water are two distinct ecological reservoirs of the pathogen. Consequently, the mechanisms that influence the presence of pathogenic *Leptospira* in sewage and standing water (input from the animal reservoir, effect of rainfall and run-off, survival kinetics, etc.) may have different spatiotemporal dynamics in each reservoir. Other studies in the Peruvian Amazon, Southern Chile, and Indonesia have also reported high positivity ratios in puddles (Ganoza et al., 2006; Muñoz-Zanzi et al., 2014; Sumanta et al., 2015). Puddles are abundant and ubiquitous in our study site, being found in areas such as the middle of the informal net of unpaved paths that connect the urban slum, and in the yards of houses. These areas are heavily used by community dwellers and may be a more accessible source of pathogenic *Leptospira* than the open sewers that, although precarious, have some degree of canalization. Since leptospirosis is endemic in the study site with cases occurring year-round (Fig. 2), we believe that standing water may play a role in leptospirosis transmission, particularly in between rainfall events when the accidental contact with sewage and runoff is diminished. Therefore, public health authorities need to consider standing water as a source of pathogenic *Leptospira* along with sewage when designing interventions aimed at reducing the transmission of the disease.

We identified a spatial distribution of positive samples with a higher environmental risk in the bottom of the valley, despite the small dimensions of our study site. Previous studies in this urban slum showed that lower household elevation was a risk factor for leptospirosis infection presumably because lower elevations are a proxy for higher flooding risk during rainfall events (Hagan et al., 2016) and contact with mud after flooding is associated with higher risks of infection (Felzemburgh et al., 2014; Reis et al., 2008). Since open sewers, rainwater drainages, and non-canalized runoff converge towards the bottom of the valley, surface water in these areas and particularly sewage, may be receiving the influence from all the water basin increasing the probability of finding *Leptospira* positive samples. Overall, this spatial heterogeneity highlights that small-scale changes in the environmental features may substantially contribute to differences in the risk of infection.

The concentration of pathogenic *Leptospira* in positive surface water samples was predominantly low. The clear majority of samples had concentrations ranging from 20 to 1000 GEq/mL, with an average around 150 GEq/mL. To date, there is only one other study that has succeeded in quantifying pathogenic *Leptospira* in surface waters of urban areas, where they found mean concentrations around 1000 cells/mL (Ganoza et al., 2006). This discrepancy may be explained by the fact that the 16S rRNA gene-based qPCR used in that study (Smythe et al., 2002) was not completely specific for pathogenic *Leptospira* (Viau and Boehm, 2011), which resulted in the detection of *Leptospira* of unknown pathogenicity (Ganoza et al., 2006). On the contrary, the *lipL32* qPCR used in our study was highly specific for pathogenic *Leptospira* (Stoddard et al., 2009), which validates our results.

However, the low surface water loads detected in our study contrasted with the high infection rates reported in the community (35.4–37.8 per 1000 individuals per year) (Felzemburgh et al., 2014; Hagan et al., 2016). The inoculum doses required for human infection are still unknown, but our findings indicate that the concentration circulating in the water is rarely higher than 1000 GEq/mL. This concentration is several orders of magnitude lower than the doses required to cause infection through natural routes in animal models of infection. The conjunctival route shows LD₅₀ values of 2×10^5 in Guinea Pigs (Lourdault et al., 2009) and doses as high as 10^8 leptospores to cause 100% death in Golden Syrian hamsters (Wunder et al., 2016a, 2016b). Notably, cuts and abrasions in the skin are an effective route of infection in grivet monkeys and Guinea Pigs (Palmer et al., 1987; Zhang et al., 2012) and have been associated with increased risks for human infection in multiple epidemiological studies (Chusri et al., 2012; Hochedez et al., 2011; Leal-Castellanos et al., 2003). While we cannot rule out the presence of additional infection sources with higher concentrations, previous epidemiological studies performed in this site have consistently pointed out to open sewers as main drivers of infection (Felzemburgh et al., 2014; Hagan et al., 2016; Reis et al., 2008). Thus, we speculate that a mechanism by which the infectious dose substantially decreases, possibly the disruption of skin barriers, enables the transmission of *Leptospira* in waters with low concentrations. Further epidemiological and experimental studies are required to confirm this hypothesis and to determine whether this route of transmission is the main source of the disease in the study site.

As a limitation of our study, the *lipL32* qPCR assay used in our experiments had a detection limit of 18 cells/mL (Riediger et al., 2016). Based on our results, it is possible that concentrations under this limit may be occurring in the surface waters of our study site. If that is the case, the positive proportions reported here might be underestimated. Nevertheless, qPCR does not provide information regarding the viability of bacteria because DNA from metabolically inactive or dead cells can persist for a variable time in the

environment (Nocker and Camper, 2009). Since only viable cells have the potential to cause infection, quantitative qPCR-based results may be overestimating the environmental risks. Furthermore, although we identified a higher prevalence of *Leptospira* positive samples in the rainy season, this study was not designed to explore the specific effect of rainfall events in the dynamics of the pathogen. Thus, we only captured big seasonal differences and not the short-term variability in positivity and concentration that is likely occurring due to mobilization and runoff after rainfall. Such study is needed to understand the immediate impact of rain intensity and frequency in the environmental load and the risks of infection. Finally, this study focused on the surface water reservoirs. Soil and mud are other environmental reservoirs of pathogenic *Leptospira* that have received little attention in the literature and, may be essential to understanding the global dynamics of pathogenic *Leptospira* in the environment.

5. Conclusions

- The presence of pathogenic *Leptospira* exhibited a clear seasonal pattern in the surface waters of the urban slum, particularly in sewage, an epidemiologically proven source of infection. This is the first empirical evidence that the water-related risk to which inhabitants of an endemic area are exposed increases in the rainy season. Thus, the seasonal peaks of severe leptospirosis may be not only due to an increased exposure to contaminated sources, but also to a higher environmental risk, which modifies the current view on leptospirosis transmission after rainfall events.
- The water-related risk for leptospirosis was spatially heterogeneous, being more prevalent in sewage samples towards the bottom of the valley. This finding is remarkable when considered the small size of the study site. Furthermore, it indicates that preventive measures need to account for the spatial variation for the risk of the disease.
- In addition to sewage, standing water is a reservoir of pathogenic *Leptospira* in the urban slum environment. Their relatively stable positivity across seasons and elevations, suggests that standing water may be relevant for the transmission of the disease, especially in between rainfall events. Consequently, the closing of open sewers alone, a common public health measure, may not be sufficient to eliminate the water-related transmission of the disease.
- The concentration of pathogenic *Leptospira* in surface waters was generally low (mean concentration 152 GEq/mL) which contrasts with previous environmental studies and the high infection rates reported in this urban slum. Further epidemiological and experimental research is necessary to understand the natural history of leptospirosis infection and its correlation with low infectious doses.
- Pau da Lima, our study site in Salvador, Brazil, has similar characteristics to other marginalized communities around the world. Hence, our results may help to understand the drivers of the temporal and spatial variability in urban leptospirosis epidemics. This knowledge is essential to implement timely and efficient measures to reduce the burden of leptospirosis worldwide.

Acknowledgements

The authors thank the joint collaborative effort of the resident associations, community leaders and residents, which constitute the Urban Health Council of Pau da Lima. This research was supported by the National Institutes of Health research grants R01 AI052473, U01 AI088752, R25 TW009338, R01 TW009504 and R01

AI121207. INR was supported by Ph.D. scholarship (BEX 066509-6) from the Brazilian Ministry of Education.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.068>.

References

- Agampodi, S.B., Dahanayaka, N.J., Bandaranayaka, A.K., Perera, M., Priyankara, S., Weerawansa, P., Matthias, M.A., Vinetz, J.M., 2014. Regional differences of leptospirosis in Sri Lanka: observations from a flood-associated outbreak in 2011. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2626.
- Amilasan, A.S.T., Ujiie, M., Suzuki, M., Salva, E., Belo, M.C.P., Koizumi, N., Yoshimatsu, K., Schmidt, W.P., Marte, S., Dimaano, E.M., Villarama, J.B., Ariyoshi, K., 2012. Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 91–94.
- Barcellos, C., Sabroza, P.C., 2001. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad. Saude Publica* 17, Suppl, 59–67.
- Barragan, V.A., Mejia, M.E., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R.A., Haake, D.A., Trueba, G.A., 2011. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Curr. Microbiol.* 62, 1802–1806.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48.
- Bourhy, P., Collet, L., Lernout, T., Zinini, F., Hartskeerl, R.A., van der Linden, H., Thiberge, J.M., Diancourt, L., Brisse, S., Giry, C., Pettinelli, F., Picardeau, M., 2012. Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *J. Clin. Microbiol.* 50, 307–311.
- Brazilian National Institute of Meteorology (INMET), 2015. Available online: <http://www.inmet.gov.br/>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Chang, S.L., Buckingham, M., Taylor, M.P., 1948. Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*: IV. Survival in water and sewage: destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *J. Infect. Dis.* 82, 256–266.
- Chusri, S., Sritairatchai, S., Hortiwahul, T., Charoenmak, B., Silpapojakul, K., 2012. Leptospirosis among river water rafters in Satoon, Southern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 95, 874–877.
- Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003898.
- 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., 2014. 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.* 14, 33–40.
- Desvars, A., Jégo, S., Chiroleu, F., Bourhy, P., Cardinal, E., Michault, A., 2011. Seasonality of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. *PLoS One* 6, e20377.
- 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., 2014. 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.* 8, e2927.
- Fox, J., 2003. Effect Displays in R for Generalised Linear Models. *J. Stat. Softw.* 8, 1–27.
- Fox, J., Hong, J., 2009. Effect Displays in R for Multinomial and Proportional-Odds Logit Models: Extensions to the effects Package. *J. Stat. Softw.* 32, 1–24.
- Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richards, D., Brouwer, K., Cunningham, C.B., Segura, E.R., Gilman, R.H., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med.* 3, 1329–1340.
- Haake, D.A., Levett, P.N., 2015. Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 65–97.
- 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., 2016. Spatiotemporal determinants of urban leptospirosis transmission: Four-year prospective cohort study of slum residents in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004275.
- Hellstrom, J.S., Marshall, R.B., 1978. Survival of *Leptospira interrogans* serovar pomona in an acidic soil under simulated New Zealand field conditions. *Res. Vet. Sci.* 25, 29–33.
- Hochedez, P., Rosine, J., Théodore, R., Abel, S., Bourhy, P., Picardeau, M., Quénel, P., Cabié, A., 2011. Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 621–626.
- Karande, S., Gandhi, D., Kulkarni, M., Bharadwaj, R., Pol, S., Thakare, J., De, A., 2005.

- Concurrent outbreak of leptospirosis and dengue in Mumbai, India, 2002. *J. Trop. Pediatr.* 51, 174–181.
- Karande, S., Kulkarni, H., Kulkarni, M., De, A., Varaiya, A., 2002. Leptospirosis in children in Mumbai slums. *Indian J. Pediatr.* 69, 855–858.
- Khairani-Bejo, S., Bahaman, A.R., Zamri-Saad, M., Mutalib, A.R., 2004. The survival of *Leptospira interrogans* in the Malaysian environment. *J. Anim. Vet. Adv.* 3, 123–129.
- Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., Riley, L.W., 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 354, 820–825.
- Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M., 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747.
- Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V., Prapasarakul, N., 2017. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Res. Vet. Sci.* 115, 146–154.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2013. lmerTest: Tests for Random and Fixed Effects for Linear Mixed Effect Models (Lmer Objects of lme4 Package). R Package, Version 2. .
- Kyobutungi, C., Ziraba, A.K., Ezeh, A., Yé, Y., 2008. The burden of disease profile of residents of Nairobi's slums: results from a demographic surveillance system. *Popul. Health Metr.* 6, 1.
- Lau, C.L., Watson, C.H., Lowry, J.H., David, M.C., Craig, S.B., Wynwood, S.J., Kama, M., Nilles, E.J., 2016. Human Leptospirosis Infection in Fiji: An Eco-epidemiological Approach to Identifying Risk Factors and Environmental Drivers for Transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004405.
- Leal-Castellanos, C.B., Garcia-Suarez, R., Gonzalez-Figueroa, E., Fuentes-Allen, J.L., Escobedo-De la Peña, J., 2003. Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. *Epidemiol. Infect.* 131, 1149–1156.
- Lenth, R.V., 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmmeans. *J. Stat. Softw.* 69, 1–33.
- Lourdault, K., Aviat, F., Picardeau, M., 2009. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 58, 648–655.
- Munoz-Zanzi, C., Mason, M.R., Encina, C., Astroza, A., Romero, A., 2014. *Leptospira* contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 6666–6680.
- Nascimento, A.L., Ko, A.I., Martins, E.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Ho, P.L., Haake, D.A., Verjovski-Almeida, S., Hartskeerl, R.A., Marques, M.V., Oliveira, M.C., Menck, C.F., Leite, L.C., Carrer, H., Coutinho, L.L., Degraive, W.M., Dellagostin, O.A., El-Dorry, H., Ferro, E.S., Ferro, M.I., Furlan, L.R., Gamberini, M., Gigliotti, E.A., Goes-Neto, A., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Harakava, R., Jeronimo, S.M., Junqueira-de Azevedo, I.L., Kimura, E.T., Kuramae, E.E., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Marino, C.L., Nunes, L.R., de Oliveira, R.C., Pereira, G.G., Reis, M.S., Schriefer, A., Siqueira, W.J., Sommer, P., Tsai, S.M., Simpson, A.J., Ferro, J.A., Camargo, L.E., Kitajima, J.P., Setubal, J.C., Van Sluys, M.A., 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 186, 2164–2172.
- Navegantes de Araújo, W., Finkmoore, B., Ribeiro, G.S., Reis, R.B., Felzemburgh, R.D.M., Hagan, J.E., Reis, M.G., Ko, A.I., Costa, F., 2013. Knowledge, attitudes, and practices related to Leptospirosis among urban slum residents in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 359–363.
- Nocker, A., Camper, A.K., 2009. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 137–142.
- Okazaki, W., Ringen, L.M., 1957. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am. J. Vet. Res.* 18, 219–223.
- Oliveira, D.S.C., Guimaraes, M.J.B., Portugal, J.L., Medeiros, Z., 2009. The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 149–157.
- Palmer, M.F., Waitkins, S.A., Fitzgeorge, R.B., Baskerville, A., 1987. Experimental Infection of Monkeys with *Leptospira interrogans* Serovar hardjo. *Epidemiol. Infect.* 98, 191–197.
- 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., 2016. A Two-Year Ecological Study of Norway Rats (*Rattus norvegicus*) in a Brazilian Urban Slum. *PLoS One* 11, e0152511.
- R Core Team, 2013. A Language and Environment for Statistical Computing. 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., 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e228.
- Riediger, I.N., Hoffmaster, A.R., Casanovas-Massana, A., Biondo, A.W., Ko, A.I., Stoddard, R.A., 2016. An Optimized Method for Quantification of Pathogenic *Leptospira* in Environmental Water Samples. *PLoS One* 11, e0160523.
- Riley, L.W., Ko, A.I., Unger, A., Reis, M.G., 2007. Slum health: diseases of neglected populations. *BMC Int. Health Hum. Rights* 7 (2).
- Saito, M., Villanueva, S.Y.A.M., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., Asoh, T., Ozuru, R., Gloriani, N.G., Yanagihara, Y., Yoshida, S.I., 2013. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 601–609.
- Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalofonos, I., Kalafanos, I., Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G., Ko, A.I., 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610.
- Smith, J.K.G., Young, M.M., Wilson, K.L., Craig, S.B., 2013. Leptospirosis following a major flood in Central Queensland, Australia. *Epidemiol. Infect.* 141, 585–590.
- Smythe, L., Smith, I., Smith, G., Dohnt, M., Symonds, M., Barnett, L., McKay, D., 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis.* 2, 13.
- Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–255.
- Sumanta, H., Wibawa, T., Hadisusanto, S., Nuryati, A., Kusnanto, H., 2015. Spatial Analysis of *Leptospira* in Rats, Water and Soil in Bantul District Yogyakarta Indonesia. *Open J. Epidemiol.* 5, 22–31.
- Tangkanakul, W., Smits, H.L., Jatanasen, S., Ashford, D.A., 2005. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36, 281–288.
- Tassinari, W.D.S., Pellegrini, D.D.C.P., Sabroza, P.C., Carvalho, M.S., 2004. Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996–1999. *Cad. Saude Publica/Minist. Saude Fund. Oswaldo Cruz. Esc. Nac. Saude Publica* 20, 1721–1729.
- Thibeaux, R., Geroult, S., Benezec, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., Bierque, E., Goarant, C., 2017. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005414.
- 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., Abela-Ridder, B., 2015. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0004122.
- Trejejo, R.T., Rigau-Perez, J.G., Ashford, D.A., McCure, E.M., Jarquin-Gonzalez, C., Amador, J.J., los Reyes, J.O., Gonzalez, A., Zaki, S.R., Shieh, W.-J., McLean, R.G., Nasci, R.S., Weyant, R.S., Bolin, C.A., Bragg, S.L., Perkins, B.A., Spiegel, R.A., 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage - Nicaragua, 1995. *J. Infect. Dis.* 178, 1457–1463.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., Haake, D., 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* 7, 35–40.
- UN-HABITAT, 2013. State of the World's Cities 2012/2013-Prosperty of Cities.
- Unger, A., Ko, A., Douglass-Jaime, G., 2016. Favela Health in Pau da Lima, Salvador, Brazil. In: Corburn, J., Riley, L. (Eds.), *Slum Health*. University of California Press, Berkeley, CA, pp. 105–117.
- Viau, E.J., Boehm, A.B., 2011. Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawaiian coastal streams. *J. Water Health* 9, 637–646.
- Weinberger, D., Baroux, N., Grangeon, J.-P., Ko, A.I., Goarant, C., 2014. El Niño Southern Oscillation and leptospirosis outbreaks in New Caledonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2798.
- Wunder, E.A., Figueira, C.P., Benaroudj, N., Hu, B., Tong, B.A., Trajtenberg, F., Liu, J., Reis, M.G., Charon, N.W., Buschiazzo, A., Picardeau, M., Ko, A.I., 2016a. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. *Mol. Microbiol.* 101 (3), 457–470.
- Wunder, E.A., Figueira, C.P., Santos, G.R., Lourdaul, K., Matthias, M.A., Vinetz, J.M., Ramos, E., Haake, D.A., Picardeau, M., Dos Reis, M.G., Ko, A.I., 2016b. Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. *Infect. Immun.* 84, 2105–2015.
- Zhang, Y., Lou, X.-L., Yang, H.-L., Guo, X.-K., Zhang, X.-Y., He, P., Jiang, X.-C., 2012. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect. Dis.* 12, 20.

5.2 OBJETIVO II:

Determinar se fatores físico-químicos ambientais influenciam na concentração de *Leptospira* patogênica em água de esgoto, em uma área de elevada prevalência de leptospirose.

MANUSCRITO 2

Artigo submetido em Tropical Medicine and Infectious Disease.

Relationship between physicochemical variables and the concentration of pathogenic *Leptospira* in waters of an urban slum in Salvador, Bahia, Brazil

Daiana Santos de Oliveira, Vladimir Airam Querino da Silva, Yeonsoo Sara Lee, Marcelo Cunha, Nivison Nery Junior, Louisa Wessels Perelo, Juan Carlos Rossi Alva, Albert Icksang Ko, Mitermayer G Reis, Arnau Casanovas-Massana, Federico Costa.

APRESENTAÇÃO: Este artigo contempla o segundo objetivo específico da presente Tese, que consiste em avaliar se fatores físico-químicos ambientais influenciam na presença e concentração de *Leptospira* patogênica na água empoçada e de esgoto. Este trabalho contribui para a caracterização dos parâmetros físico-químicos tais como TDS, salinidade e pH, preditores da presença de *Leptospira* em matrizes aquáticas de áreas urbanas.



Relationship between physicochemical characteristics and pathogenic *Leptospira* in urban slum waters

Daiana de Oliveira^{1*}, Vladimir Airam Querino da Silva^{2*}, Yeonsoo Sara Lee^{3,4}, Marcelo Cunha⁵, Nivison Nery Jr^{1,3}, Louisa Wessels Perelo², Juan Carlos Rossi Alva⁶, Albert I. Ko^{1,4}, Mitermayer G. Reis^{1,4,7}, Arnau Casanovas-Massana^{4,7,&}, Federico Costa^{1,3,4,&}

*These authors equally contributed to this study

‡These authors equally contributed to this study

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40296-710, Salvador, Bahia, Brazil.

²Department of Environmental Engineering, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Rua Aristides Novis, 02, Federação, CEP 40210-630, Salvador, Bahia, Brazil.

³Instituto da Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Rua Basílio da Gama, 316, Canela, CEP 40110-040, Salvador, Bahia, Brazil.

⁴Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, 60 College St, New Haven, Connecticut, 06510, USA.

⁵National School of Public Health, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁶Universidade Católica do Salvador, Av. Prof. Pinto de Aguiar, 2589 - Pituaçu, CEP 41740-090, Salvador, Bahia, Brazil.

⁷Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Praça XV de novembro, s/n - Largo do Terreiro de Jesus, CEP 40026-010, Salvador, Bahia, Brazil.

Running head: Pathogenic *Leptospira* and TDS in water

&Corresponding author: Federico Costa (fcosta2001@gmail.com)

Abstract: Leptospirosis, a zoonosis caused by pathogenic *Leptospira*, primarily affects tropical, developing regions, especially communities without adequate sanitation. Outbreaks of leptospirosis and endemic transmission have been linked with the presence of pathogenic *Leptospira* in water. Consequently, research on the environmental phase of the pathogen is of epidemiological importance, especially to unravel the dynamics of transmission. In this study, we measured the physicochemical characteristics (temperature, pH, salinity, turbidity, electrical conductivity, and total dissolved solids [TDS]) of surface waters from an urban slum in Salvador, Brazil. These characteristics were associated, by logistic and linear regression modeling, to the amount of pathogenic *Leptospira* DNA. We found that TDS-adjusted salinity increases the chance of finding pathogenic *Leptospira* in water by 10 times. As well as, high pH was associated with an increase in the concentration of *Leptospira* DNA. These markers can contribute to the environmental characterization favorable to the maintenance of *Leptospira* levels and to the identification of probable sources of risk in urban slum environments.

Keywords: Leptospirosis, environmental, sewer, standing, LipL32, pH, salinity, TDS.

1. Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease with global distribution that has emerged as a health problem in urban slum communities in tropical and developing countries [1] and causes over 1 million cases and almost 60,000 deaths every year [2]. The disease includes a range of manifestations: from a sub-clinical illness or mild influenza-like symptoms to severe complications, such as Weil's disease and pulmonary hemorrhagic syndrome for which mortalities are 10% and 50%, respectively [3]. Leptospirosis is caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. Pathogenic *Leptospira*

colonize and thrive in the kidneys of domestic and wild mammals, notably in rodents who act as chronic carriers, and shed the pathogens in urine [3]. Human infection occurs through contact with infected animal urine, or soil and water contaminated with pathogenic *Leptospira* [4]. Therefore, the environment plays a central role in the spillover infections from animals to humans.

Outbreaks of leptospirosis and endemic transmission have been linked with the presence of pathogenic *Leptospira* in water [5]. Consequently, research on the environmental phase of the pathogen is of epidemiological importance, especially to unravel the dynamics of transmission. Physicochemical variables such as temperature, salinity, turbidity and TDS have been associated with *Leptospira* presence in aquatic environments and survival under laboratory-controlled conditions [6-10]. In general, slightly alkaline waters, high turbidities favor the survival of the bacterium [9,10]. However, there is a gap of knowledge in understanding measurements of physicochemical variables in leptospire-contaminated waters in natural environments. Viau and Boehm (2011) found a strong positive association of *Leptospira* with turbidity and salinity streams from Hawaii [11]. Yet, there is a lack of studies with data from waters from urban slums, where large outbreaks of leptospirosis are reported annually [12-14]. In these settings, the lack of sanitary infrastructure and high rates of rat infestation substantially increase human exposure to contaminated environments [15]. In this study, we aimed to investigate the physicochemical parameters of the waters from an urban slum in Brazil and determine association with the presence and concentration of pathogenic *Leptospira*.

2. Materials and Methods

We analyzed water sewage and standing water samples collected in a previous study, aimed to characterize the spatio-temporal distribution of pathogenic *Leptospira* [16] to evaluate associations with physicochemical characteristics. The samples were collected in Pau da Lima, Salvador, Brazil, characterized as a urban slum community, precarious housing, poverty, high population density, trash accumulation and lack of sanitary and sewer infrastructure. Study previously in this neighborhood presentation high leptospirosis infection rates with 37.8 cases per 1,000 inhabitants [17].

We collected samples from 14 sampling sites distributed across an open sewer that flows from the top to the bottom of one of the valleys. Four samples were collected at each site, two from the open sewer and two from standing water located close to the sewer. Sewage was defined as a continuous and open channel that carries household wastewater and rain. Standing water was defined as bodies of water accumulated on the ground level, with no connection to sewage or other running water, located at up to 10m from the sewer. Samples were collected in the morning and afternoon of the same day, for three non-consecutive days within week periods in July 2011, and in January 2012. Aliquots of 50 mL of sewage and standing water were collected in sterile containers using aseptic techniques and processed within 6 hours after collection. The physicochemical parameters in each water sample were measured following standard procedures [18]. Temperature was measured in situ before sample collection. The pH was determined with a digital pH meter (inoLab) and turbidity using a spectrophotometer (Hach Lange). Salinity, electric conductivity, and total dissolved solids (TDS) were measured using a multiparameter probe (Tetracon 325). The presence and concentration of pathogenic *Leptospira* in all samples was determined using a qPCR targeting the lipL32 gene as described prior by group [16]. The published results on *Leptospira* concentration from that study were used as outcome of this work for subsequent statistical analyses in combination with the newly measured physicochemical parameters [16].

Averages and standard deviations of physicochemical variables (temperature, pH, turbidity, TDS, salinity and electric conductivity), and the geometric mean and range of *Leptospira* concentrations were calculated for positive samples. Multiple logistic and linear regressions were used to investigate the relationship between water physicochemical parameters and the presence and concentration of pathogenic *Leptospira*. To select the best model, physicochemical variables were iteratively included to examine individual effects. The parameters that presented a value of $p < 0.20$ were included in the multivariate model. The best models were selected based on the lowest AIC value. The final adjusted logistic and linear models accounted for multicollinearity and interaction

between variables. All analyses were performed using Rv.3.5.1. The significance was assessed for $p < 0.05$.

3. Results

A total of 284 water samples (166 samples of sewage, and 118 standing water) were collected (Table S1). The mean temperature, pH, TDS, electrical conductivity and salinity were different between water samples that contained pathogenic *Leptospira* and negative water samples (Table 1). Turbidity was the only parameter that did not show a significant difference between positive and negative water samples. The mean pH was 7.1 for positive water samples, versus 7.3 negative water samples ($p = 0.02$). The mean turbidity was slightly higher in positive samples, while temperature, TDS, salinity and water conductivity were parameters higher in negative samples ($p < 0.05$) (Table 1). In an additional analysis (Table S2), we observed that there is a significant difference in the all physicochemical characteristics by water type ($p < 0.05$). The mean pH was 7.3 for sewage water samples, versus 7.1 standing water samples. The mean TDS and salinity were higher in sewage water samples than standing water samples (652 mg/L versus 359 mg/L and 0.37‰ versus 0.12 ‰, respectively).

Table 1. Physicochemical parameters (mean, standard deviation and p-value) among of pathogenic *Leptospira* positive and negative samples measured in the water samples collected in Pau da Lima.

	Overall	Positive	Negative	P
Temperature (°C)	25.7±2.35	25.3±2.44	26± 2.27	<0.01
pH	7.2±0.61	7.1±0.60	7.3 ±0.61	0.02
Turbidity (NTU)	325±284	352±292	310±279	0.23
Total dissolved solids (TDS) (mg/L)	533±281	436±209	592±302	<0.01
Salinity (‰)	0.28±0.306	0.24±0.35	0.30±0.27	0.01
Electrical conductivity (µS)	0.99±0.55	0.92±0.60	1.04±0.50	0.01

The analysis of parameters for logistic and linear final models (estimation and odds ratio, respectively) is presented in Table 2. The univariate logistic model for the presence of pathogenic *Leptospira* showed that temperature, pH, TDS, salinity and conductivity were all significant parameters (Table S3). Salinity and electrical conductivity showed a high correlation (0.94), with the salinity remaining in the final model. However, in the final multivariate model, shown in Table 2, only TDS and salinity were significant (OR= 0.99, $p < 0.001$ and OR= 10.1, $p < 0.05$, respectively). The increase in unit salinity is associated with a 10x increase in the chance of finding *Leptospira* when adjusted with TDS (Table 2). In addition, the final model included two significant interaction terms: pH and type of water, and TDS and type of water. The analysis of the interaction between pH and type of water showed that sewage samples with high pH had a 25% reduction in the chance of finding samples with presence of *Leptospira* than standing water. Overall, an increase in unit TDS reduced the chance of finding *Leptospira* by approximately 1%. However, when evaluating TDS with interaction with the type of water, it was noted that there is an increase of approximately 0.05% in the chance of finding *Leptospira* in sewage when compared to standing water (Table 2). In addition, GAM analysis identified a positive relationship between TDS and positivity rate for the TDS interval of 15-200 mg/L and a negative relationship between those variables for the TDS interval 200-1,000 mg/L (Figure 1A).

Table 2. Estimated regression parameters (Odds ratio and confidence interval) in the final logistic and parameters (coefficient and confidence interval) in the final linear models on the chance and probability of finding a positive sample and log10 concentration of *Leptospira*, respectively. (***) $p < 0.01$, (**) $p < 0.05$, (*) $p < 0.1$

	Logistic model		Linear model	
	Odds Ratio	95% CI	Coefficient	CI
pH	1.13	0.52–2.47	0.28**	0.09–0.48
Turbidity	-	-	0.00	-0.00–0.00
TDS	0.99***	0.98–0.99	-	-
Salinity	10.1*	1.30–91.07	-0.52	-1.34–0.30
Interaction terms				
pH x Water	0.75**	0.61–0.93	-	-
TDS x Water	1.00***	1.00–1.01	-	-
Salinity x Water	-	-	0.37	-0.15–0.89

p-value *** <0.001 , ** <0.01 , * <0.05

The univariate linear model analyzed the concentration of pathogenic *Leptospira* as associated to temperature, pH, turbidity, salinity and electric conductivity ($p < 0.2$). The final linear model for the concentration of pathogenic *Leptospira* identified only pH as a significant parameter ($p < 0.001$). Increases in pH were associated with increased concentrations of pathogenic *Leptospira* (Figure 1C). Turbidity was associated with *Leptospira* concentration, which was important in the adjustment of the final model. The increase in a turbidity unit was associated with an increase in the concentration of *Leptospira*.

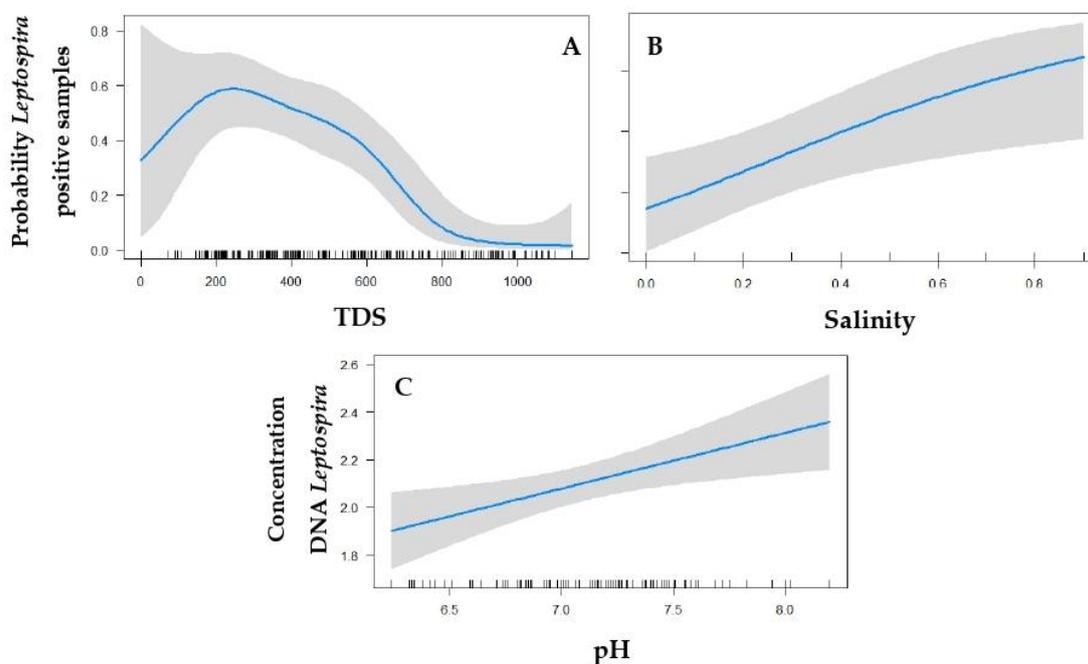


Figure 1. Probability of finding *Leptospira* DNA positive water samples in the final logistic model according to TDS (A) and Salinity (B). Probability of finding *Leptospira* DNA concentration water samples in the final linear model according to pH (C). The blue line denotes the predicted chance/probability and the grey area the 95% confidence interval. Ticks on the X-axis denote individual measurements.

4. Discussion

Water physicochemical properties have been suggested to be essential for understanding the maintenance of pathogenic *Leptospira* and consequently environmental transmission. In this study, specific physicochemical characteristics were differentially related to the presence and load of leptospire identified in water samples from an urban slum. Among the parameters analyzed, TDS, salinity and pH were associated with positivity *Leptospira* in aquatic matrices, while only pH was associated to the pathogen concentration. We also found significant differences in physicochemical characteristics between sewer and standing water which affected the chances to identify positive *Leptospira* samples.

We observed a general negative association between TDS and *Leptospira* positivity rate, but up to a certain threshold. This negative association was driven by TDS values superior to 300 mg/L. The reduction of *Leptospira* maybe explained by the fact that a high concentration of TDS can be lethal to aquatic organisms, causing an osmotic shock [19]. This effect may affect *Leptospira*'s osmoregulatory strength (for example), reflecting on the ability to adapt to the environment [20]. Besides that, consequence of the excess of soil particles in aquatic bodies is the reduction of light penetration in water and, as a result, the photosynthesis of organisms is reduced. In this scenario, a drop in the oxygen supply present in this medium is possible, thus affecting *Leptospira*'s survival, because these bacteria are obligatory aerobic [21].

Previous works have hypothesized that survival of pathogenic *Leptospira* in water may increase by aggregation of this bacterium to suspended soil particles [10] or to other microorganisms [22]. We observed a positive trend between TDS and *Leptospira* positivity rate for the TDS interval between 0 and 300 mg/L, but the lower sample size in this subgroup prevented the appropriated statistical evaluation of this trend. The interaction between TDS and type of water with *Leptospira* positivity rate also support this trend, as observed by higher proportion of *Leptospira* positive samples in sewage water where TDS is lower compared to standing water (data no shown).

We found that an increase in 1% on salinity was associated to a tenfold increase in *Leptospira* positivity rate. These findings corroborate the study by Viau and Boehm, 2011, which found a positive association between *Leptospira* DNA concentration and salinity rate. However, Khairani-Bejo (2004) found that the duration of *Leptospira* decreased as the salinity increases, where the organism dies in seawater, where the salinity is on average 35 ‰. In another study, it showed that even in a solution with low salt concentration (0.13% NaCl), *Leptospira*'s survival can decrease, promoting inhibition in the energetic function of this bacterium [10].

The analysis of the interaction between pH and water type showed a negative association, contrary to our hypothesis, sewage samples with acidic pH increase the chance of finding samples with the presence of *Leptospira* when compared to standing water. However, pH was positively associated with pathogenic *Leptospira* load. Similar, previous laboratory studies demonstrate that *Leptospira* survival improves in basic environments [8,23,24]. Ideal pH value for survival is close to neutral [21] and extreme pH values are lethal for pathogenic leptospire. A previous controlled laboratory study shows that even under identical conditions it shows different survival patterns among different serovars. They reported that *Leptospira* serovar Icterohaemorrhagiae increased the survival time for months at pH above pH 7.0 [21,23]. It is known that the pH of water affects the availability of micronutrients and extreme values can have a toxic effect for some microorganisms [19].

We did not find an association between turbidity and *Leptospira* concentration. Our results are different from the ones reported by Viau and Boehm (2011), which found a significant correlation between turbidity and the concentration of *Leptospira* in the river waters in Hawaii. However, the qPCR approach used in Hawaii was not specific for pathogenic *Leptospira* and detected intermediate and pathogenic species. Alternatively, the relationship between turbidity and or TDS and *Leptospira* may be related to the phenomena of precipitation, mobilization, and dilution. Pathogenic *Leptospira* is released by rodents on the soil surface [25,26], where they persist for a prolonged period [27-29]. During heavy rain events, pathogenic *Leptospira* can be mobilized and resuspended from the soil

reservoir along with sediments and directed to open sewers and drainage with runoff, as a result, increasing turbidity and TDS [11,30].

The average temperature in the waters at Pau da Lima was 25°C, and the values did not vary with the types of water. This is according to previous laboratory study that showed water temperature range between 25–30°C allows the survival of pathogenic *Leptospira* [8], for example, Fontaine et al. 2015, observed that the greatest *Leptospira*'s survival on days with temperatures of 20°C and 30°C [31]. One of the limitations of our study was because we did not measure the dissolved oxygen in the water samples, which vary with temperature [32].

5. Conclusions

In conclusion, this study provides novel field data indicating that there exists a relationship between physicochemical variables (specifically TDS, salinity and pH) and the presence and pathogenic *Leptospira* concentration in water in urban slums. Further studies should aim to examine causality and confounding factors not considered in this analysis (i.e. rainfall intensity, presence of animal reservoirs, geographical diversity, etc.). These physicochemical markers can contribute to the environmental characterization favorable to the maintenance of *Leptospira* levels and to the identification of probable sources of risk in urban slum environments.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Distribution of collected samples, presented by collected period and water type, Table S2: Physicochemical parameters (mean and standard deviation) and concentration of pathogenic *Leptospira* (geometric mean and count range among positive samples) measured in the standing and sewage water samples collected in Pau da Lima; Table S3: Estimated regression parameters in the bivariate logistic (Odds ratio and confidence interval) and linear (coefficient and confidence interval) in the models on the probability of finding a positive sample and log₁₀ concentration of *Leptospira*, respectively. Analysis of the interaction of chemical physical parameters by water type. (***) $p < 0.01$, (**) $p < 0.05$, (*) $p < 0.1$.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, Daiana Oliveira, Vladimir Airam, Arnau Casanovas and Federico Costa, methodology, Daiana Oliveira, Vladimir Airam, Arnau Casanovas, Federico Costa; validation, Nivison Nery, Daiana Oliveira and Federico Costa, formal analysis, Nivison Nery, Marcelo Cunha, Daiana Oliveira and Federico Costa; investigation, Daiana Oliveira and Federico Costa.; resources, Federico Costa, Mitermayer Reis, Albert Ko, Juan Carlos Rossi; Louisa Perelo; data curation, Daiana Oliveira and Nivison Nery; writing—original draft preparation, Daiana Oliveira, Sara Lee and Vladimir Airam; writing—review and editing, Daiana Oliveira, Sara Lee, Federico Costa, Mitermayer Reis, Arnau Casanovas and Nivison Nery; supervision, Federico Costa; funding acquisition, Federico Costa. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research received no external funding by Oswaldo Cruz Foundation and Secretariat of Health Surveillance, Brazilian Ministry of Health, the National Institutes of Health (grants numbers R01 AI052473, U01 AI088752, R01 TW009504, R25 TW009338 and R01 AI121207) and by the Wellcome Trust (102330/Z/13/Z).

Acknowledgments: This work could not have been accomplished without the joint collaborative effort of the resident associations, community leaders and residents, which constitute the Urban Health Council of Pau da Lima. We thank the Fábio Neves and Luciano Kalabric for their help with statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Torgerson, P.R.; Hagan, J.E.; Costa, F.; Calcagno, J.; Kane, M.; Martinez-Silveira, M.S.; Goris, M.G.; Stein, C.; Ko, A.I.; Abela-Ridder, B. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis* 2015, 9, e0004122, doi:10.1371/journal.pntd.0004122.
2. 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 Negl Trop Dis* 2015, 9, e0003898, doi:10.1371/journal.pntd.0003898.
3. Ko, A.I.; Goarant, C.; Picardeau, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009, 7, 736-747, doi:10.1038/nrmicro2208.
4. McBride, A.J.; Athanazio, D.A.; Reis, M.G.; Ko, A.I. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2005, 18, 376-386.
5. Ganoza, C.A.; Matthias, M.A.; Collins-Richards, D.; Brouwer, K.C.; Cunningham, C.B.; Segura, E.R.; Gilman, R.H.; Gotuzzo, E.; Vinetz, J.M. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 2006, 3, e308, doi:10.1371/journal.pmed.0030308.
6. Chang, S.L.; Buckingham, M.; Taylor, M.P. Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*; survival in water and sewage; destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *J Infect Dis* 1948, 82, 256-266.
7. Okazaki, W.; Ringen, L.M. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am J Vet Res* 1957, 18, 219-223.
8. Parker, J.; Walker, M. Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Vet Microbiol* 2011, 152, 146-150, doi:10.1016/j.vetmic.2011.04.028.
9. Petrino, M.G.; Doetsch, R.N. 'Viscotaxis', a new behavioural response of *Leptospira interrogans* (biflexa) strain B16. *J Gen Microbiol* 1978, 109, 113-117, doi:10.1099/00221287-109-1-113.
10. Trueba, G.; Zapata, S.; Madrid, K.; Cullen, P.; Haake, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 2004, 7, 35-40.
11. Viau, E.J.; Boehm, A.B. Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawaiian coastal streams. *J Water Health* 2011, 9, 637-646, doi:10.2166/wh.2011.064.
12. Agampodi, S.B.; Dahanayaka, N.J.; Bandaranayaka, A.K.; Perera, M.; Priyankara, S.; Weerawansa, P.; Matthias, M.A.; Vinetz, J.M. Regional differences of leptospirosis in Sri Lanka: observations from a flood-associated outbreak in 2011. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8, e2626, doi:10.1371/journal.pntd.0002626.
13. Ko, A.I.; Galvao Reis, M.; Ribeiro Dourado, C.M.; Johnson, W.D., Jr.; Riley, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 1999, 354, 820-825.
14. Trevejo, R.T.; Rigau-Perez, J.G.; Ashford, D.A.; McClure, E.M.; Jarquin-Gonzalez, C.; Amador, J.J.; de los Reyes, J.O.; Gonzalez, A.; Zaki, S.R.; Shieh, W.J., et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 1998, 178, 1457-1463.
15. Corburn, J.; Riley, L. *Slum Health From the Cell to the Street*, 1 ed.; University of California Press: 2016.
16. Casanovas-Massana, A.; Costa, F.; Riediger, I.N.; Cunha, M.; de Oliveira, D.; Mota, D.C.; Sousa, E.; Querino, V.A.; Nery, N., Jr.; Reis, M.G., et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. *Water Res* 2018, 130, 176-184, doi:10.1016/j.watres.2017.11.068.
17. Hagan, J.E.; Moraga, P.; Costa, F.; Capian, N.; Ribeiro, G.S.; Wunder, E.A., Jr.; Felzemburgh, R.D.; Reis, R.B.; Nery, N.; Santana, F.S., 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.
18. American Public Health Association (APHA). *Standard method for examination of water and wastewater*. 21 ed.; APHA, Ed. Washington, DC., 2005.
19. Agoro, M.A.; Okoh, O.O.; Adefisoye, M.A.; Okoh, A.I. Physicochemical Properties of Wastewater in Three Typical South African Sewage Works. *Pol. J. Environ. Stud.* 2018, 27, 491-499, doi:10.15244/pjoes/74156.
20. Matsunaga, J.; Lo, M.; Bulach, D.M.; Zuerner, R.L.; Adler, B.; Haake, D.A. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun* 2007, 75, 2864-2874, doi:10.1128/IAI.01619-06.
21. Faine, S. *Leptospira and leptospirosis*; CRC Press Inc.: 1994.

22. Kumar, K.V.; Lall, C.; Raj, R.V.; Vedhagiri, K.; Vijayachari, P. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 2015, 91, doi:10.1093/femsec/fiv051.
23. Smith, C.E.; Turner, L.H. The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bull World Health Organ* 1961, 24, 35-43.
24. Smith, D.J.; Self, H.R. Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. *J Hyg (Lond)* 1955, 53, 436-444.
25. Costa, F.; Wunder, E.A., Jr.; 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 Negl Trop Dis* 2015, 9, e0003819, doi:10.1371/journal.pntd.0003819.
26. Schneider, A.G.; Casanovas-Massana, A.; Hacker, K.P.; Wunder, E.A., Jr.; Begon, M.; Reis, M.G.; Childs, J.E.; Costa, F.; Lindow, J.C.; Ko, A.I. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl Trop Dis* 2018, 12, e0006415, doi:10.1371/journal.pntd.0006415.
27. Casanovas-Massana, A.; Pedra, G.G.; Wunder, E.A., Jr.; Diggle, P.J.; Begon, M.; Ko, A.I. Quantitative survival of *Leptospira interrogans* in soil and water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 2018, 10.1128/AEM.00507-18, AEM-00507, doi:10.1128/AEM.00507-18.
28. Khairani-Bejos, S.B., A.R.; Zamri-Saad, M. & Mutalib, A.R. The survival of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the Malaysian Environment *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2004, 3, 123-129.
29. Thibeaux, R.; Geroult, S.; Benezech, C.; Chabaud, S.; Soupé-Gilbert, M.-E.; Girault, D.; Bierque, E.; Goarant, C. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2017, 11, e0005414, doi:10.1371/journal.pntd.0005414.
30. Martín-Díaz, J.; García-Aljaro, C.; Pascual-Benito, M.; Galofré, B.; Blanch, A.R.; Lucena, F. Microcosms for evaluating microbial indicator persistence and mobilization in fluvial sediments during rainfall events. *Water Research* 2017, 123, 623-631, doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.017.
31. Andre-Fontaine, G.; Aviat F Fau - Thorin, C.; Thorin, C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water.
32. Metcalf & Eddy, I. *Wastewater engineering : treatment and reuse*; Fourth edition / revised by George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel. Boston : McGraw-Hill, [2003] ©2003: 2003.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1: Distribution of collected samples, presented by collected period and water type.

Period	Sewage water		Standing water		Positive samples/ samples collected
	Collected samples	Positive samples	Collected samples	Positive samples	
July	84	38 (45%)	70	35 (50%)	73/154 (47%)
January	82	12 (15%)	48	22 (46%)	34/130 (26%)
Total	166	50 (30%)	118	57 (48%)	107/284(38%)

Table S2. Physicochemical parameters (mean and standard deviation) and concentration of pathogenic *Leptospira* (geometric mean and count range among positive samples) measured in the standing and sewage water samples collected in Pau da Lima.

	Overall	Sewage	Standing	P
Temperature (°C)	25.7±2.21	25.9±2.05	25.3± 2.38	0.01
pH	7.2±0.45	7.3±0.32	7.1 ±0.56	<0.01
Turbidity (NTU)	298±223	229±151	395±270	<0.01
Total dissolved solids (TDS) (mg/L)	530±272	652±219	359±247	<0.01
Electrical Conductivity (µS)	0.98±0.47	1.20±0.35	0.67±0.44	<0.01
Salinity (‰)	0.26±0.25	0.37±0.20	0.12±0.23	<0.01
<i>Leptospira</i> concentration (GEq/mL)	194±205.7	181±153.5	205±243.3	0.94

Table S3: Estimated regression parameters in the bivariate logistic (Odds ratio and confidence interval) and linear (coefficient and confidence interval) in the models on the probability of finding a positive sample and log10 concentration of *Leptospira*, respectively. Analysis of the interaction of chemical physical parameters by water type. (***) $p < 0.01$, (**) $p < 0.05$, (*) $p < 0.1$

	Logistic model			Linear model		
	<i>Odds Ratio</i>	<i>95%CI</i>	<i>p</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>CI</i>	<i>P</i>
Temperature	0.86	0.76 – 0.96	0.009	-0.04	-0.07 – -0.00	0.05
Temperature :Water	1.02	1.01 – 1.04	0.011	0	-0.01 – 0.00	0.692
pH	0.45	0.26 – 0.79	0.006	0.23	0.06 – 0.40	0.01
pH :Water	1.09	1.02 – 1.17	0.01	0.01	-0.01 – 0.03	0.491
Turbidity	1	1.00 – 1.00	0.132	0	-0.00 – 0.00	0.125
Turbidity :Water	1	1.00 – 1.00	0.019	0	-0.00 – 0.00	0.221
TDS	1	1.00 – 1.00	<0.001	0	-0.00 – 0.00	0.822
TDS :Water	1	1.00 – 1.00	0.044	0	-0.00 – 0.00	0.82
Salinity	0.27	0.09 – 0.74	0.013	0.28	-0.06 – 0.62	0.101
Salinity :Water	0.63	0.29 – 1.29	0.221	0.24	0.02 – 0.45	0.03
EletrConduc	0.48	0.28 – 0.82	0.009	0.19	0.01 – 0.37	0.04
EletrConduc :Water	0.99	0.66 – 1.44	0.951	0.16	0.05 – 0.27	0.01

5.3 OBJETIVO III:

Avaliar a diversidade de espécies de *Leptospira* em amostras ambientais de áreas urbanas.

MANUSCRITO 3

Artigo a ser submetido em XX.

Diversidade de *Leptospira* spp. isolada de amostras de solo em uma comunidade urbana vulnerável do Brasil.

Daiana De Oliveira, Arnau Casanovas-Massana, Luciane Amorim Santos, Ramon Reinalde, Anderson Oliveira, Federico Costa, Mitermayer G. Reis

APRESENTAÇÃO: Este artigo contempla o terceiro objetivo específico da presente tese, que consiste em investigar a diversidade *Leptospira* spp. presente em amostras ambientais (solo) de uma comunidade endêmica para leptospirose. Identificamos espécies patogênicas e intermediárias, indicando risco de transmissão para os residentes.

Título: Diversidade de *Leptospira* spp. isoladas de amostras de solo em uma comunidade urbana vulnerável do Brasil.

Autores e filiações

DAIANA DE OLIVEIRA¹, ARNAU CASANOVAS-MASSANA², LUCIANE AMORIM SANTOS^{3,4,5}, RAMON REINALDE¹, ANDERSON OLIVEIRA¹, FEDERICO. COSTA^{1,2,6}, MITERMAYER G. REIS^{1,2,7}

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brasil, 40296-710.

²Department of Epidemiology of Microbial Disease, Yale School of Public Health, 60 College St, New Haven, United States, CT 06511.

³Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brasil, 41150-000.

⁴Universidade Católica do Salvador, Salvador, Brasil, 41740-090.

⁵Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil, 40.110-040.

⁶Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil, 40.110-040.

⁷Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil, 40.110.040.

Autor correspondente: Federico Costa (federico.costa@ufba.br)

Resumo (contagem de palavras): 369

Texto (contagem de palavras): 3857

Título curto: Diversidade genética de *Leptospira* em solo.

Palavras chaves: Isolamento, STAFF, ambiente.

SUMÁRIO

A leptospirose é uma zoonose de grande impacto para saúde pública, causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*. Comunidades urbanas carentes, com saneamento básico precário e oferta inadequada de água encanada, são locais mais propensos dos indivíduos se infectarem e desenvolverem leptospirose. Existem poucos relatos sobre a diversidade de *Leptospira* no ambiente de áreas endêmicas para leptospirose no Brasil. A principal dificuldade em isolar esta bactéria no ambiente, está relacionada à competição por nutrientes entre as espécies saprofíticas e patogênicas e de outras bactérias. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar as espécies de bactérias do gênero *Leptospira* presentes no solo de uma comunidade urbana endêmica em Salvador - Brasil. Coletamos um total de 40 amostras de solo de três áreas no bairro de Pau da Lima no período de março a julho de 2017. Para o isolamento das leptospirosas, utilizamos combinação de cinco agentes antimicrobianos padronizados previamente (sulfametoxazol, trimetoprima, anfotericina B, fosfomicina e 5- fluorouracil). As culturas identificadas de bactérias com morfologia helicoidal, compatíveis com o gênero *Leptospira* foram semeadas nas placas com meio EMJH sólido até obtenção de uma cultura pura. Os isolados de *Leptospira* foram submetidos à extração de DNA e em seguida ao sequenciamento genético, com base na análise filogenética do gene 16S rRNA. As sequências consenso de cada isolado foram construídas usando o programa BioEdit 7.2.5 (IbisBiosciences) e comparadas utilizando BLAST com as sequências disponíveis no NCBI. As árvores foram visualizadas e editadas utilizando a ferramenta FigTree v1.4.4. Entre as 40 amostras de solo coletadas, identificamos a presença de bactérias do gênero *Leptospira* em todas as amostras, sendo que algumas amostras foram identificadas mais de um isolado, totalizando em 52 isolados. Realizamos o sequenciamento de 50 isolados, com base em nossas análises, foi identificado um isolado pertencente ao clado de espécie patogênica correspondente à sequência consenso H (representado pelas espécies *L. yasudae*, *L. dzianensis* e *L. mayottensis*) e dois isolados pertencentes ao clado de espécie intermediária, correspondente à sequência consenso D (espécies a *L. johnsonii*, *L. neocaledonica*, *L. saintgironsiae* e *L. koniamboensis*). Os demais isolados pertenciam às espécies não patogênicas de *Leptospira*. Estes dados demonstram a diversidade de *Leptospira* viáveis circulantes no ambiente, a qual o homem e os animais podem estar expostos.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de elevado impacto para saúde pública, causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*. Estima-se que a leptospirose é responsável por mais de um milhão de casos humanos anualmente no mundo (COSTA et al., 2015a). Sua taxa anual de letalidade é de aproximadamente 10% nos quadros graves, chegando a alcançar a 50% nos casos com hemorragia pulmonar (GOUVEIA et al., 2008). A doença apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo países tropicais subdesenvolvidos e em desenvolvimento os mais vulneráveis ao acometimento de epidemias durante os períodos de intensa precipitação pluviométrica (VINETZ et al., 1996; BARCELLOS; SABROZA, 2001).

Comunidades urbanas carentes, locais desprovidos de saneamento básico e água encanada, oferecem maiores riscos à leptospirose, uma vez que o ambiente tem papel importante no ciclo de transmissão (KO et al., 1999). As leptospirosas patogênicas precisam do hospedeiro animal e/ou humano para se reproduzirem, tendo o ambiente (água e solo) como um meio de manutenção e disseminação (FAINE et al., 2000; PICARDEAU et al., 2008). Na comunidade urbana do presente estudo, o principal reservatório animal da *Leptospira* é *Rattus norvegicus*, reconhecido como rato de esgoto (COSTA et al., 2014). O patógeno coloniza os túbulos proximais renais desses roedores, estabelecendo uma infecção crônica, onde é excretado com a urina em concentrações elevadas ($\sim 10^7$ células de bactéria / ml) no ambiente (ATHANAZIO et al., 2008; COSTA et al., 2015b). Os residentes destas comunidades são infectados pelo contato direto com a urina contaminada ou pelo contato indireto com o ambiente contaminado com *Leptospira* (HAGAN et al., 2016).

Estudos epidemiológicos mostram que *Leptospira interrogans* acomete principalmente os ratos (COSTA et al., 2014), porém nas áreas urbanas outros animais podem servir de hospedeiro para *Leptospira* spp. distintas, contribuindo assim para a diversidade de espécies no ambiente. Existem evidências que *Leptospira* pode permanecer viável por dias no meio ambiente a depender de alguns fatores, tais como características microbiológicas e físico-químicas, que estão relacionados diretamente com a sobrevivência do patógeno (DIESCH et al., 1969; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018a). Por exemplo, durante os períodos de alta pluviosidade aumenta o risco de transmissão da leptospirose como consequência da mobilização das leptospirosas sobreviventes para as camadas superficiais do solo (SMITH; SELF, 1955; SAITO et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2018).

Enquanto a dinâmica e diversidade de *Leptospira* têm sido bem estudadas em humanos existe uma lacuna no conhecimento sobre a influência do ambiente em relação a esses parâmetros. A maioria dos estudos que tem avaliado a diversidade de *Leptospira* no ambiente foi realizada a partir de sequenciamento genético de produtos de PCR provenientes de amostras de água e solo (SATO et al., 2019). Entretanto, estes estudos não permitem identificar se o material genético obtido nessas amostras era originado de bactérias vivas.

O uso da técnica de isolamento de *Leptospira* ambientais além de confirmar a viabilidade da bactéria, possibilita melhor caracterização da sua patogenicidade, virulência e metabolismo mediante estudos *in vitro* e *in vivo*. Também, pode contribuir com informações fundamentais para investigações epidemiológicas tais como, identificação de espécies envolvidas em surtos, distribuição e diversidade dos sorovares circulantes em determinada área. De modo que esses conhecimentos, em conjunto, propiciam uma melhor compreensão do ciclo zoonótico e do direcionamento de estratégias de controle apropriadas para a doença (TERPSTRA, 2003). Entretanto,

poucos estudos têm sido bem sucedidos em isolar *Leptospira* patogênica no ambiente, uma das razões seria competição de nutrientes entre as espécies saprofitas e patogênicas e de outras bactérias (BARRAGAN et al., 2017). Nesta disputa de nutrientes a *Leptospira* patogênica é prejudicada, pelo fato de seu metabolismo ser mais lento (FAINE et al., 1999).

Em estudos prévios, a identificação de espécie de *Leptospira* patogênica, proveniente de amostras ambientais, foi possível a partir da técnica de isolamento por inoculação *in vivo* em animais (KIM, 1987). No entanto, essa técnica atualmente é inaceitável por razões éticas. O desenvolvimento de novas metodologias de isolamento, com coquetéis de antibióticos (para a inibição de amplo espectro de bactérias) (CHAKRABORTY et al., 2011) têm provido oportunidades de isolamento e a identificação de bactérias do gênero *Leptospira*. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a diversidade de bactérias do gênero *Leptospira* de solo em uma comunidade urbana com elevada incidência de leptospirose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de estudo: Pau da Lima

A área de estudo está localizada no bairro de Pau da Lima, na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. A área possui uma elevada densidade populacional, com mais de 16.000 habitantes residindo em 0.43 Km² (REIS et al., 2008). O bairro possui pouca infraestrutura com edificações desordenadas sem esgotos fechados e sem rede fluvial para escoamento adequado das águas em épocas de chuvas. A rede de esgoto da área drena os resíduos oriundos das residências e da água das chuvas. Os habitantes desta área apresentam elevada taxa de infecção assintomática por *Leptospira* 35.4/1000 habitantes (HAGAN et al., 2016), assim como elevada incidência de casos graves de leptospiroses 19,8/100.000 (FELZEMBURGH et al., 2014).

Desenho amostral

Realizamos coleta de solo em 40 locais distribuídos em três vales, a priori, considerados de elevado risco de transmissão do patógeno. Foram coletadas amostras em pontos que preenchiam os seguintes critérios: 1) ter domicílios onde residiam pessoas infectadas por *Leptospira* durante o período de 2014 e 2015, 2) presença de *R. norvegicus* colonizados por *Leptospira* neste período (dados não publicados). As coletas das amostras de solo ocorreram em três momentos diferentes: 1ª coleta: 10 amostras em 10 domicílios do Vale IV na área de estudo, durante março de 2017 (41mm de precipitação de chuva, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia INMET); 2ª coleta: 10 amostras em 10 domicílios do Vale II em abril de 2017 (25mm de precipitação de chuva, segundo o INMET); 3ª coleta: 20 amostras em 20 domicílios do Vale I em Julho de 2017 (35mm de precipitação de chuva, segundo o INMET).

As amostras de solo foram coletadas na sua maioria, em solo argiloso, lugares úmidos, sombrios e próximos ao esgoto. Para cada ponto de coleta, delimitamos uma área de cinco centímetros quadrados e 3-5 centímetros de profundidade. Antes da coleta foram retirados os detritos (folhas, vegetação, objetos inanimados etc.) da superfície do solo e logo em seguida coletados aproximadamente 15 g de solo com auxílio de uma espátula de madeira que era trocada para cada coleta. Cada amostra de solo foi armazenada em tubos de plásticos estéreis com rosca (tipo Falcon) e identificada com data e local da coleta. Os tubos com as amostras foram transportados em galerias de isopor, na temperatura ambiente para o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular

(LPBM) da FIOCRUZ-Ba, visando o processamento do material no dia da coleta. Não existiu necessidade da aprovação do comitê de ética para a realização das coletas.

Isolamento de *Leptospira*

Para isolamento foram adicionados 10 ml de água destilada estéril a 5g da amostra de solo. Essa mistura foi homogeneizada por 10 minutos em agitador orbital e em seguida colocada para sedimentar por 30 min. Logo após, 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um tubo contendo 2,5 mL de meio EMJH (2x concentrado) suplementado com soro de coelho inativado (a 56°C por 20 min) e 500uL de coquetel de antibióticos STAFF (Sulfamethazole, Trimetoprima, Anfotericina B, Fosfomicina, 5-Fluorouracil) (CHAKRABORTY et al., 2011; THIBEAUX et al., 2018) com pequenas modificações. Finalmente, os tubos foram incubados na estufa a 30°C. As culturas foram visualizadas no microscópio de campo escuro diariamente. Quando observada a presença de bactérias com morfologia helicoidal, típicas do gênero *Leptospira*, mantivemos o crescimento da cultura até a concentração aproximada de 10⁸ leptospiras/ mL, para o posterior congelamento com DMSO (125uL de DMSO para 5 mL de cultura) e posterior análise de identificação da espécie mediante a testes moleculares.

As culturas contendo espiroquetas e contaminantes foram filtradas com 2 mL da cultura por meio de um filtro estéril de 0,45 µm e seguido por subcultivo em meio EMJH sólido a 30°C. Brevemente, foram feitas três diluições da cultura, de 1: 100; 1: 1.000; e 1: 10.000. De cada diluição, foram retiradas 100 µl e semeadas em 10 ml Ágar EMJH em placa. As leituras iniciais foram feitas depois de três dias de incubação, em seguida semanalmente por 3 meses. A confirmação macroscópica das colônias positivas foi a partir da observação de colônias subsuperficiais individuais, esbranquiçadas e confirmada microscopicamente com o esfregaço da colônia em uma lâmina (THIBEAUX et al., 2018). Posteriormente, as culturas foram mantidas em meio EMJH líquido até seguir a etapa do congelamento como descrito acima.

Análise Filogenética de *Leptospira*

Para extração do DNA, foram utilizadas culturas de cada isolado de *Leptospira* cultivadas em EMJH a 30°C até a fase estacionária. Em seguida, 3 mL da cultura foram centrifugados a 5000 g durante 10 minutos e o *pellet* foi submetido a extração de DNA utilizando o DNA automatizado Maxwell® 16 celular Purification Kit (Promega, Madison, WI), seguindo as orientações do fabricante.

A determinação da sequência do gene 16S rRNA e análise filogenética foi realizada mediante amplificação de um fragmento do gene de RNAr 16S com *primers* universais 8f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1592r (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µl utilizando uma concentração final de 1 x tampão de PCR, 2,5 U de Taq polimerase, 200 pM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo, 0,4 µm de *primers*, e 2 uL de DNA molde. As condições de PCR foram: 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos. Utilizou-se uma fase de extensão final de 72°C durante 7 minutos. Os produtos destas amplificações foram purificados com o kit de purificação de PCR QIAquick® (QiagenInc, EUA). Os produtos foram sequenciados utilizando os iniciadores de Sanger 8f e 1592r. As sequências consensus de cada isolado foram construídas usando o programa BioEdit 7.2.5 (IbisBiosciences) e comparadas utilizando BLAST com as sequências disponíveis no NCBI.

Para a identificação das espécies das 50 sequências geradas por este trabalho, foi realizada a análise filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA. Para isto, sequências referências das 66 espécies de *Leptospira* foram baixadas do GenBank assim como uma sequência de *Leptonema illini*, usada como grupo externo. As sequências referências foram alinhadas junto com as 50 sequências dos novos isolados utilizando a ferramenta de alinhamento múltiplo MAFFT (v. 1. 4. 0). A reconstrução filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada utilizando a ferramenta IQ-TREE v.1.6.12 (MINH et al., 2020) aplicando o modelo de substituição de nucleotídeo Tamura Nei com frequência de bases empírica, proporção de sítios invariáveis e distribuição gama (TN+F+I+G4). A análise de *Bootstrap* (1000 repetições) foi usado para calcular o suporte estatístico dos ramos da árvore filogenética. As árvores foram visualizadas e editadas utilizando a ferramenta FigTree v1.4.4.

Os números de acesso das sequências referências utilizadas foram: NZ_NPDU01000149.1; NZ_AHMT02000010.1; NZ_JQRS01000211.1; RQEY01000009.1; NZ_RQHT01000002.1; NZ_NPDS01000015.1; NC_010602.1; NC_008508.1; NZ_RQFM01000022.1; MN061028; NZ_NPDQ01000021.1; NZ_AHMO02000008.1; NZ_RQGQ01000010.1; NZ_RQEX01000021.1; RQHS01000013.1; BFAZ01000021.1; NZ_NPEF01000404.1; NZ_AKWZ02000002.1; RQET01000006.1; RQEV01000006.1; NZ_RQFA01000016.1; NZ_NPEI01000024.1; NZ_NPDX01000001.1; NZ_NPDL01000022.1; RQHW01000025.1; RQHV01000033.1; NZ_AHMM02000015.1; NC_004342.2; NZ_RQGR01000009.1; BFAY01000017.1; NZ_RQFG01000020.1; RQGG01000027.1; NZ_AHOC02000006.1; NZ_AHMP02000003.1; BFBA01000021.1; RQFY01000010.1; NZ_RQER01000003.1; NZ_NPDM01000014.1; NZ_AHOO02000011.1; NPEK01000266.1; NZ_CP024871.1; NZ_AKXE01000007.1; NZ_RQFN01000011.1; RQHK01000002.1; NPEA01000026.1; NZ_AKWY02000013.1; RQFK01000032.1; RQGD01000030.1; RQGA01000012.1; NZ_NPDZ01000033.1; MN062724; BFBB01000019.1; NPDR01000026.1; NZ_CP006694.1; RQGF01000009.1; NZ_RQES01000004.1; RQEP01000024.1; NZ_QHCS01000002.1; NZ_AOGW02000008.1; NZ_CP015217.1; NZ_AOGY02000072.1; NZ_NETS01000003.1; NZ_AHOR02000010.1; NZ_AOGZ02000014.1; NZ_AKWX02000004.1; NZ_AOGX02000021.1; NZ_QHCU01000018.1; AY714984.

RESULTADOS

Dentre as 40 amostras de solo coletadas no bairro de Pau da Lima, Salvador-BA identificamos a presença de bactérias do gênero *Leptospira* em todas as amostras, sendo que em algumas amostras foi identificado mais de um isolado, totalizando 52 isolados. No entanto, foi possível realizar o sequenciamento de 50 sequências, pois dois isolados tiveram as sequências falhas.

Para o agrupamento das espécies, utilizou-se sequências do gene 16S rRNA. Considerando que este gene é igual ou muito similar entre muitas espécies, as sequências com maior similaridade foram agrupadas em uma sequência consenso representativa do conjunto de espécies. Esta sequência consenso foi utilizada na filogenia (Tabela S1). Foi identificado um isolado que se encontra agrupado junto com a sequência representativa do Consenso H. Este consenso é composto pelas espécies patogênicas *L. Yasudae*, *L. dzianensis* e *L. mayottensis*. Dois isolados se agruparam dentro do grande clado de espécies intermediárias, apresentando uma maior similaridade com a consenso D, composto pelas espécies *L. Johnsonii*, *L.*

neocaledonica, *L. saintgironsiae* e *L. koniamboensis*. Os outros 47 isolados foram agrupados no clado de espécies de *Leptospira* não patogênicas, sendo 43 mais relacionadas com a sequência consenso A, composto pelas espécies *L. brenneri*, *L. perdikensis*, *L. bourretii*, *L. congkakensis*, *L. mtsangambouensis*, *L. noumeaensis*, *L. kanakyensis*, *L. jelokensis*, *L. levettii*, *L. macculloughii*. Os demais quatro isolados se agruparam com a Consenso B, representada pelas espécies *L. bandrabouensis*, *L. bouyouniensis*, *L. kemamanensis*, *L. harrisiae* (Tabela 1 e Figura 1).

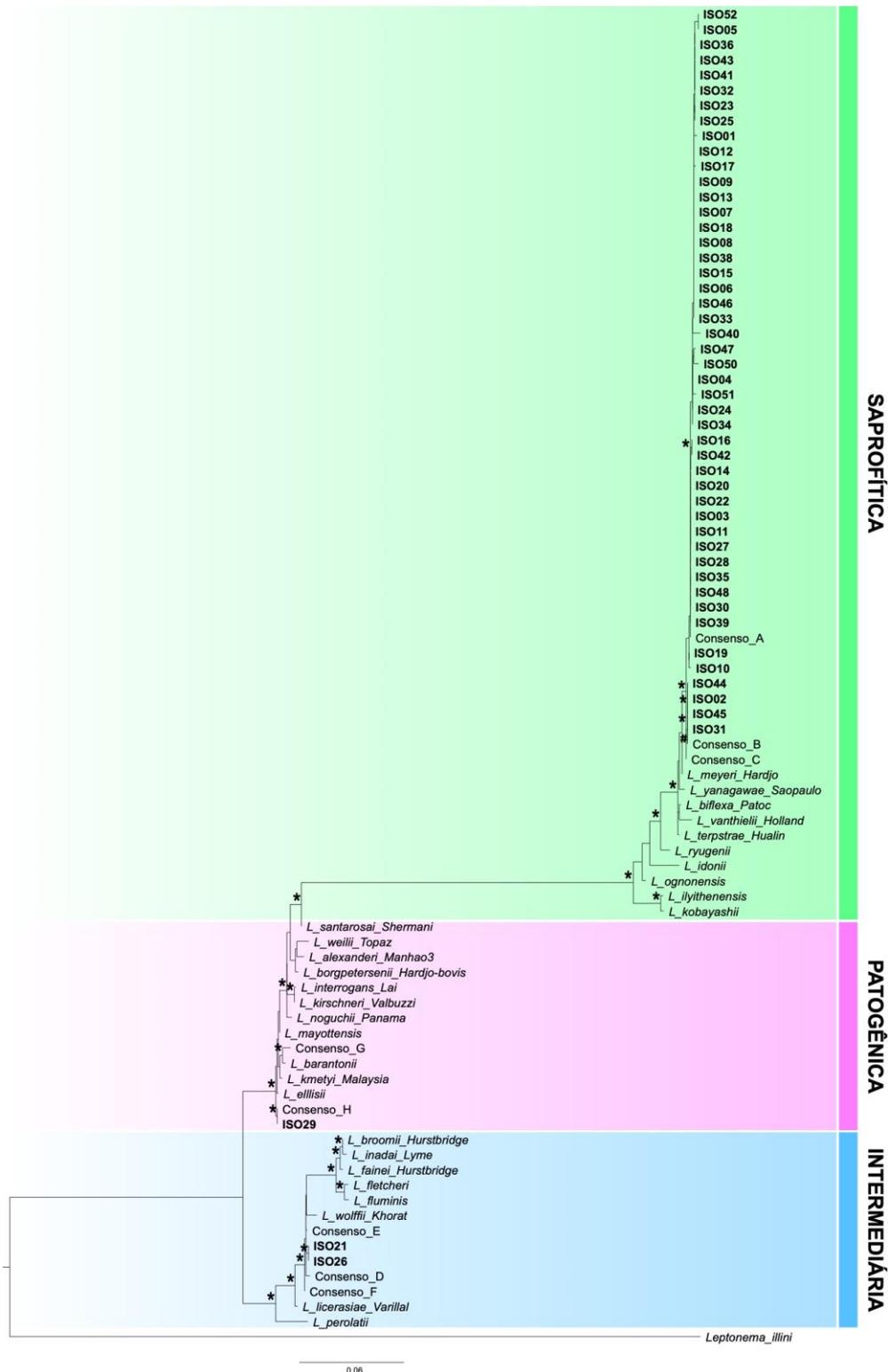


Figura 1. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança dos isolados ambientais baseado no gene 16S rRNA. Os isolados deste estudo estão em negrito. O clado de espécies saprofiticas está destacado em verde, o de patogênicas em lilás e intermediárias em azul. *Leptonema illini* foi usada como grupo externo e os ramos com valores de Bootstrap maiores do que 70% estão marcados com asterisco (*).

Tabela 1: Espécies e tamanho das sequências de cada isolado

Grupo	Consenso	Isolado	Tamanho (pb)	Nº de acesso
P1 – Patogênica	Consenso H	ISO29	1375	
	<i>L. dzianensis</i>			
	<i>L. mayottensis</i>			
	<i>L. yasudae</i>			
P2 – Intermediária	Consenso D	ISO21	963	
	<i>L. johnsonii</i>	ISO26	963	
	<i>L. neocaledonica</i>			
	<i>L. saintgironsiae</i>			
	<i>L. koniamboensis</i>			
		ISO01	717	
		ISO03	797	
		ISO04	472	
		ISO05	386	
		ISO06	970	
		ISO07	926	
		ISO08	966	
		ISO09	952	
		ISO10	954	
		ISO11	548	
		ISO12	954	
		ISO13	926	
	ISO14	858		
	ISO15	968		
	ISO16	942		
	ISO17	953		
S1 – Saprofítica	Consenso A	ISO18	931	
	<i>L. brenneri</i>	ISO19	961	
	<i>L. perdikensis</i>	ISO20	869	
	<i>L. bourretii</i>	ISO22	849	
	<i>L. congkakensis</i>	ISO23	1371	
	<i>L. mtsangambouensis</i>	ISO24	1371	
	<i>L. noumeaensis</i>	ISO25	1371	
	<i>L. kanakyensis</i>	ISO27	1035	
	<i>L. jelokensis</i>	ISO28	1052	
	<i>L. levettii</i>	ISO30	1371	
	<i>L. macculloughii</i>	ISO32	1370	
		ISO33	1077	
		ISO34	1378	
		ISO35	1369	
		ISO36	1362	
		ISO38	448	
		ISO39	1371	
	ISO40	1369		
	ISO41	1367		
	ISO42	1343		
	ISO43	1367		
	ISO46	1063		
	ISO47	1369		
	ISO48	1370		
	ISO50	1346		
	ISO51	711		
	ISO52	982		
	Consenso B	ISO02	829	

<i>L. bandrabouensis</i>	ISO31	969
<i>L. bouyouniensis</i>	ISO44	1076
<i>L. kemamanensis</i>	ISO45	1339
<i>L. harrisiae</i>		

DISCUSSÃO

O gênero *Leptospira* apresenta uma elevada diversidade, no momento com 66 espécies identificadas (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019; VINCENT et al., 2019). No presente estudo, conseguimos identificar uma alta taxa de isolados ambientais pertencentes à bactéria do gênero *Leptospira*, sendo que todas as amostras foram positivas. Foi identificado um isolado pertencente ao clado de espécie patogênica correspondente à sequência consenso H (representado pelas espécies *L. yasudae*, *L. dzianensis* e *L. mayottensis*) e dois isolados pertencentes ao clado de espécie intermediária, correspondente à sequência consenso D (espécies a *L. johnsonii*, *L. neocaledonica*, *L. saintgironsiae* e *L. koniamboensis*). Os demais isolados pertenciam às espécies não patogênicas de *Leptospira*.

Os nossos isolados se agrupam às espécies recentemente caracterizadas e por isso tem poucos dados na literatura sobre essas espécies. O isolado pertencente ao clado patogênico estava relacionado ao grupo de três espécies, tais elas: *L. dzianensis* isolada previamente de amostra de água em Dziani, Mayotte (VINCENT et al., 2019), *L. mayottensis* isolada de paciente com leptospirose em Mayotte (Oceano Índico) (BOURHY et al., 2014) e *L. Yasudae*, essa espécie foi primeiramente descrita pelo estudo feito por Casanovas e col. 2019 ao isolá-la em amostra de solo da mesma comunidade urbana do presente estudo. Apesar de ter sido agrupada no clado de espécies patogênicas, ainda não está clara sua virulência, pois no modelo em hamster não apresentou sinais de infecção (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019). No entanto, é necessário avaliar seu papel na infecção em outros modelos animais. O isolamento dessa bactéria é muito importante para a caracterização de sua patogenicidade e avaliação do seu papel no risco de infecção aos humanos e animais.

Também identificamos isolados que se agrupam com o grupo intermediário composto pelas espécies: *L. neocaledonica* e *L. saintgironsiae* foram isolados previamente de amostra de solo e *L. koniamboensis* de amostra de água na Província do Norte da Nova Caledônia (THIBEAUX et al., 2018; VINCENT et al., 2019), e *L. Johnsonii* foi primeiramente isolada de amostra de solo do Japão, porém ainda não está clara a sua virulência dessas espécies (MASUZAWA et al., 2018; VINCENT et al., 2019). As espécies intermediárias embora não sejam consideradas tão virulentas quanto às espécies do grupo patogênico, foram isoladas de animais e em casos de leptospirose humana com baixa gravidade (CHIRIBOGA et al., 2015; PICARDEAU, 2017). Vale ressaltar que nos últimos 18 anos de vigilância ativa ainda não foi descrito nenhum caso de leptospirose causada por espécies intermediárias no mesmo ambiente urbano (KO et al., 1999; FELZEMBURGH et al., 2014; TORGERSON et al., 2015; HAGAN et al., 2016). A ocorrência das diferentes espécies de *Leptospira* pode estar relacionada com a fonte de infecção e diretamente associada a um hospedeiro específico, considerando que alguns sorovares de *Leptospira* são adaptados a uma determinada espécie animal. Identificar as espécies e sorovares de *Leptospira* circulantes no ambiente é importante para identificação do provável hospedeiro animal responsável pela manutenção e disseminação do patógeno em áreas endêmicas.

No presente estudo não isolamos a principal espécie de *Leptospira* causadora das infecções locais. Estudos prévios de soroprevalência com ratos (COSTA et al., 2014) e humanos (HAGAN et al., 2016), na mesma área de estudo, têm identificado que a espécie de *L. interrogans* é a mais frequente na região. Nossa hipótese é que *L. interrogans* estava presente, porém em baixa concentração e sobrevida curta, não sendo possível a detecção pela técnica de isolamento. Não sabemos a concentração mínima de *Leptospira* requerida do ambiente para a recuperação pela técnica de isolamento. Em

um estudo prévio, realizado com microcosmo, indicou que a medição de DNA de *Leptospira* patogênica por qPCR não representa apropriadamente se as bactérias estão vivas no ambiente (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018b).

Por outro lado, identificamos em todas as amostras analisadas bactérias pertencentes a espécies de *Leptospira*, representando uma ampla distribuição de bactérias desse gênero nessa comunidade urbana. Em outros estudos foram encontradas em taxas menores, de 40%, 46% realizados no Filipinas e Japão respectivamente (SAITO et al., 2013) e 37% em outro estudo realizado no Japão (MASUZAWA et al., 2018). No entanto, a maioria dos isolados era pertencente a espécies saprofíticas. Espécies saprofíticas são caracterizadas por não causarem doença, quando entram em contato com o homem, o sistema imunológico inato rapidamente consegue debelar a infecção (MERI et al., 2005). A presença de *Leptospira* não patogênicas na quase totalidade das amostras de solo examinados e contatos frequentes dos indivíduos residentes com essas bactérias poderia estar conferindo imunidade cruzada contra *Leptospira* patogênica.

Nessas comunidades em que o contato com o ambiente contaminado é muitas vezes inevitável, a transmissão no ambiente peri-domiciliar é a via de infecção mais frequente. Foi previamente identificado que o contato com lama no ambiente peri-domiciliar (HAGAN et al., 2016) e residir a menos de 20 metros de esgoto aberto (REIS et al., 2008) foram evidenciados como fatores de maior risco de adquirir a doença. Assim, o solo pode atuar como fonte do patógeno, dependendo da localização específica e condições climáticas. Há fortes evidências que sustentam a hipótese de que o solo pode ser o habitat original do gênero *Leptospira*, inclusive as espécies patogênicas, uma vez que elas podem sobreviver nesse ambiente por meses (BIERQUE et al., 2020).

Tivemos o cuidado de coletar as amostras de solo do tipo argiloso e em ambientes úmidos. Sabe-se que a umidade é um fator importante para a persistência da *Leptospira*, sendo o maior teor de umidade do solo associado à sobrevivência da bactéria (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018b). O maior número de isolados de solos ocorre onde há mais de 65% de umidade, e dificilmente sobreviveria com menos de 20% de umidade, sendo raramente positivos em solos arenosos (ESCÓCIO et al., 2010). A composição granulométrica do solo influencia na capacidade de retenção da água e manutenção da umidade, logo o tipo de solo está diretamente relacionado com a permanência das *Leptospira*. Os solos argilosos possuem maior capacidade de retenção de água devido à presença de poros muito menores do que nos solos arenosos, permitindo que as leptospiros fiquem aderidas a matriz (ESCÓCIO et al., 2010).

As limitações presentes na dificuldade do isolamento de *Leptospira* patogênica do meio ambiente *in vitro* são conhecidas. A perda de clones de *Leptospira* patogênica devido à competição por nutrientes é uma possibilidade. As amostras coletadas apresentaram uma elevada quantidade de contaminação presente em amostras de solo, o que dificultou o crescimento de *Leptospira* patogênica *in vitro*, devido seu crescimento fastidioso (CHAKRABORTY et al., 2011; SAITO et al., 2014). Utilizamos mecanismos de barreira física (filtro de seringa de 0,45µm diâmetro) e química (coquetel de antibiótico STAFF) (CHAKRABORTY et al., 2011) a partir de protocolos já estabelecidos na literatura, na tentativa com sucesso, para o controle de contaminantes.

Contudo, nosso principal problema de isolamento de *Leptospira* patogênica foi com o alto e acelerado crescimento de *Leptospira* saprofítica. O tempo de geração para as espécies saprófitas é de 4,5 horas e para as espécies patogênicas adaptadas varia de 6 a 8 horas, sendo de 14 a 18 para as patogênicas recém isoladas (CAMERON, 2015; FAINE et al., 1999).

Fizemos a identificação filogenética de todos isolados ambientais seguindo a taxonomia microbiana moderna, baseada na utilização dos genes 16S rRNA, o que nos permitiu a identificação a nível de um conjunto de possíveis espécies para os isolados encontrados. A dificuldade de identificação com precisão da espécie se dá por ser um gene muito conservado entre as diferentes espécies, muitas vezes igual, dificultando a sua diferenciação, apesar de ser possível avaliar a diversidade do gênero *Leptospira*. O que torna necessária a utilização de outros genes mais específicos, como *secY* e *ppk*, com o intuito de refinar as análises (VINCENT et al., 2019).

Adicionalmente, ressaltamos a importância de investir em técnicas para identificação e caracterização de espécies de *Leptospira* presentes no meio ambiente. Visto que, o ambiente pode representar uma visão mais ampla das espécies de bactérias do gênero *Leptospira* circulantes na região, as quais os indivíduos estão expostos. Nosso trabalho abrange técnicas microbiológicas e moleculares para a detecção e isolamento de espécies de leptospiros presentes em amostras ambientais, no qual pode ser útil para avaliação do risco de exposição ambiental em outro cenário ambiental de comunidades urbanas.

CONCLUSÃO

As amostras de solo estudadas na comunidade de Pau da Lima apresentaram uma grande diversidade de espécies do gênero *Leptospira*. Um isolado esteve classificado no clado das espécies patogênicas representado pelas *L. Yasudae*, *L. dzianensis* e *L. mayottensis* e dois isolados classificados no clado de espécie intermediária representados pelas *L. neocaledonica*, *L. saintgironisae*, *L. koniamboensis* e *L. Johnsonii* e uma elevada proporção de contaminação por leptospiros saprofíticos. Com esses dados reforça ainda mais o risco de infecção de pessoas que vivem nessa região. Tendo em vista, que são necessários investimentos no saneamento básico e cuidados individuais para prevenir risco de exposição à doença.

Observamos que os mecanismos de barreira física e química se mostraram eficientes na inibição de contaminantes. Podendo ser reproduzível em outros ambientes urbanos com o mesmo cenário socioambiental, para avaliação de possíveis fontes de contaminação ambiental. Mas vale ressaltar, a necessidade de elaboração de metodologias que impeçam o crescimento de *Leptospira* saprofítica, com o intuito de identificar uma maior diversidade de espécie patogênica. Bem como, a utilização de outras regiões gênicas, além da 16S rRNA, para a identificação de espécie.

TABELA SUPLEMENTAR

Tabela S1: Espécies utilizadas para a construção de cada consenso representativa utilizada na árvore filogenética.

Consenso	Espécies	Grupo
Consenso A	<i>L. brenneri</i> ; <i>L. perdikensis</i> ; <i>L. bourretii</i> ; <i>L. congkakensis</i> ; <i>L. mtsangambouensis</i> ; <i>L. noumeaensis</i> ; <i>L. kanakyensis</i> ; <i>L. jelokensis</i> ; <i>L. levettii</i> ; <i>L. macculloughii</i>	S1 – Saprofítica
Consenso B	<i>L. bandrabouensis</i> ; <i>L. bouyouniensis</i> <i>L. kemamanensis</i> ; <i>L. harrisiae</i>	S1 – Saprofítica
Consenso C	<i>L. ellinghauseni</i> ; <i>L. montravelensis</i> <i>L. wolbachii</i> ;	S1 – Saprofítica
Consenso D	<i>L. johnsonii</i> ; <i>L. neocaledonica</i> ; <i>L. saintgironsiae</i> ; <i>L. koniamboensis</i>	P2 – Intermediária
Consenso E	<i>L. langatensis</i> ; <i>L. sarikeiensis</i> ; <i>L. semungkikensis</i>	P2 – Intermediária
Consenso F	<i>L. haakeii</i> ; <i>L. selangorensis</i> ; <i>L. hartskeerlii</i> ; <i>L. andrefontaineae</i> ; <i>L. venezuelensis</i> ; <i>L. dzoumogneensis</i>	P2 – Intermediária
Consenso G	<i>L. putramalaysiae</i> ; <i>L. tipperaryensis</i> ; <i>L. stimsonii</i> ; <i>L. adleri</i> ; <i>L. gomenensis</i> ; <i>L. alstonii</i>	P1 – Patogênica
Consenso H	<i>L. dzianensis</i> ; <i>L. mayottensis</i> ; <i>L. yasudae</i>	P1 – Patogênica

REFERÊNCIAS

- ATHANAZIO, D. a. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, p. 176–180, 2008.
- BARCELLOS, C.; SABROZA, P. C. The place behind the case : leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro O lugar do caso : leptospirose e riscos associados a condições ambientais durante o surto de 1996 na Zona Oeste do Rio de. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 59–67, 2001.
- BARRAGAN, V. et al. Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 19, 2017.
- BIERQUE, E. et al. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2020.
- BOURHY, P. et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt 12, p. 4061–7, 2014.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. **Water Research**, v. 130, p. 176–184, 2018a.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, p. 1–11, 2018b.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira yasudae* sp. Nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1450–1456, 2019.
- CHAKRABORTY, A. et al. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 7, p. 494–501, 2011.
- CHIRIBOGA, J. et al. High Prevalence of Intermediate *Leptospira* spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2141–2147, 2015.
- COSTA, F. 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 and zoonotic diseases**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359425>>.
- COSTA, F. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–19, 2015a.
- COSTA, F. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003819>>.
- DIESCH, S. L. . et al. Environmental studies on the survival of *Leptospira* spp. in a farm creek following a human leptospirosis outbreak in Iowa. **Bull. Wildlife Disease Assoc.**, v. 5, p. 166–173, 1969.
- ESCÓCIO, C. et al. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arq. Inst.**

Biol., v. 77, n. 3, p. 371–379, 2010. Disponível em:

<http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/escocio.pdf>.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2^a ed. Melbourne, Australia: MedSci, 2000.

FELZEMBURGH, R. D. M. et al. 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. 1–9, 2014.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis- associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 1–4, 2008.

HAGAN, J. E. et al. Spatiotemporal determinants of urban leptospirosis transmission: Four-year prospective cohort study of slum residents in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.

KIM, J. S. Leptospirosis: a newly identified disease in Korea. **Asia-Pacific journal of public health / Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health**, v. 1, n. 1, p. 61–68, 1987.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, p. 820–825, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485724>>.

MASUZAWA, T. et al. Characterization of Leptospira species isolated from soil collected in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 62, n. 1, p. 55–59, 2018.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microb Pathog**, v. 39, n. 4, p. 139–147, 2005.

MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 2020.

PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2008.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>>.

REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on Leptospira infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. 11–18, 2008.

SAITO, M. et al. Comparative analysis of Leptospira strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 601–609, 2013.

SAITO, M. et al. PCR and culture identification of pathogenic Leptospira spp. from coastal soil in Leyte, Philippines, after a storm surge during super Typhoon Haiyan (Yolanda). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, 2014.

SATO, Y. et al. Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic Leptospira and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6575, 2019. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/s41598-019-42978-1>>.

SCHNEIDER, A. G. et al. Quantification of pathogenic Leptospira in the soils of a Brazilian urban slum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2018.

SMITH, D. J. W.; SELF, H. R. M. Observations on the survival of leptospira Australis a in soil and water. **Journal of Hygiene**, v. 53, n. 4, p. 436–444, 1955.

THIBEAUX, R. et al. Biodiversity of Environmental Leptospira: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. May, p. 816, 2018. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00816/full>>.

TORGERSON, P. R. et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019. Disponível em:

<<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007270>>.

VINETZ, J. M. et al. Sporadic Urban Leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n. 10, p. 794–798, 1996.

5.4 OBJETIVO IV

Analisar comparativamente os determinantes demográficos e sócio-ambientais associados à transmissão de *Leptospira interrogans* Copenhageni (cepa FIOCRUZ L1-130) e *Leptospira kirschneri* Cynopteri (cepa 3522C) em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Brasil.

MANUSCRITO 4

Artigo a ser submetido em Plos Neglected Tropical Diseases (Plos NTD)

Determinantes associados à co-circulação de *Leptospira interrogans* Copenhageni e *Leptospira kirschneri* Cynopteri em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Brasil.

Daiana de Oliveira; Hussein Khalil, Juan Carlos Quintero, Nivison Nery Jr, Gielson Almeida do Sacramento, Jaqueline Cruz, Roberta Santana, Ticiania Carvalho-Pereira, Ricardo Lustosa, Fabiana Palma, Peter J Diggle, Yeimi Alzate Lopez; Mike Begon, Albert Ko, Mitermayer G. Reis, Federico Costa.

APRESENTAÇÃO: Este artigo contempla a investigação proposta no quarto objetivo específico da presente tese, que consiste em a) verificar se os isolados de *Leptospira* provenientes de amostras ambientais são reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de residentes da comunidade onde eles foram encontrados e de outras áreas urbanas; e b) avaliar a prevalência de leptospirose em comunidades urbanas e analisar os fatores demográficos, socioeconomicos e ambientais relacionados à infecção por *Leptospira interrogans* Copenhageni e *Leptospira kirschneri* Cynopteri.

Título: Determinantes associados à co-circulação de *Leptospira interrogans* Copenhageni e *Leptospira kirschneri* Cynopteri em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Brasil

Título curto (70 caracteres): Transmissão urbana de dois sorovares de *Leptospira*

Daiana de Oliveira¹; Hussein Khalil², Juan Carlos Quintero³, Nivison Nery Jr¹, Gielson Almeida do Sacramento¹, Jaqueline Cruz¹, Roberta Santana⁴, Ticiane Carvalho-Pereira⁴, Ricardo Lustosa⁴, Fabiana Palma⁴, Peter J Diggle⁵, Yeimi Alzate Lopez⁴; Mike Begon⁶, Albert Ko^{1,7}, Mitermayer G. Reis^{1,7,8}, Federico Costa^{1,4,7}.

¹ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP 40296-710, Salvador, Bahia, Brasil

² Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Sweden

³ Grupo de Ciencias Veterinarias - Centauro, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Instituto da Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Rua Basílio da Gama, 316, Canela, CEP 40110-040, Salvador, Bahia, Brasil

⁵ Centre for Health Informatics, Computing, and Statistics, Lancaster University, UK

⁶ Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, UK

⁷ Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, 60 College St, New Haven, Connecticut, 06510, USA

⁸ Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Praça XV de novembro, s/n - Largo do Terreiro de Jesus, CEP 40026-010, Salvador, Bahia, Brasil

Palavras-chaves: determinantes, soroprevalência e co-circulação.

Contagem de palavras: 2.550

& Autor correspondente: Federico Costa (federico.costa@ufba.br)

Resumo

A leptospirose é causada por bactérias patogênicas de diversas espécies e sorovares do gênero *Leptospira* que, ao infectar o homem, provocam um amplo espectro de manifestações clínicas. Enquanto existe um número elevado de estudos epidemiológicos sobre leptospirose em ambientes urbanos, a maioria tem focado em apenas um único sorogrupo/sorovar sem considerar os determinantes de outros sorogrupos/sorovares co-circulantes. O presente estudo tem como objetivo analisar comparativamente os determinantes demográficos e sócio-ambientais associados à transmissão de *Leptospira interrogans* Copenhageni (cepa FIOCRUZ L1-130) e *Leptospira kirschneri* Cynopteri (cepa 3522C) em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Brasil. Realizamos um estudo de corte transversal em cinco bairros urbanos da cidade de Salvador, Bahia, Brasil. Durante o período de março a setembro de 2018, recrutamos 3010 residentes dos quais coletamos sangue para análise sorológica, por meio do teste de microaglutinação (MAT). Utilizamos modelos de regressão logística multinomial para avaliar a associação com os fatores de exposições a risco. As características associadas com o sorovar Cynopteri foram idade (OR 1.03; IC 1.01-1.052), ocupação de risco (OR 3.73; IC 1.063-13.095), andar descalço no peridomicílio (OR 3.18; IC 1.501-6.747). Adicionalmente, identificamos uma associação limiar entre presença de gato e anticorpos contra o sorovar Cynopteri (p 0.06) em um subgrupo de residentes. Para o sorovar Copenhageni as variáveis independentemente associadas foram idade (OR 1.029; IC 1.022-1.037), sexo (OR 1.611; IC 1.229-2.111), esgoto aberto próximo ao domicílio (OR 1.404; IC 1.063-1.854), elevação no piso do domicílio (OR 0.576; IC 0.39-0.849), material da parede do domicílio (concreto) (OR 0.194; IC 0.054-0.338) e material da parede do domicílio (tijolo) (OR 0.151 IC 0.055-0.417). Nossos dados sugerem padrões epidemiológicos específicos associados à transmissão de Copenhageni e Cynopteri. Futuros estudos orientados a identificar o reservatório de Cynopteri em comunidades urbanas são necessários, sendo que gatos devem ser considerados nestes estudos.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa, potencialmente grave, que acomete animais domésticos e silvestres e seres humanos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). A doença é causada por bactérias patogênicas de diversas espécies e sorovares do gênero *Leptospira* que, ao infectar o homem, provoca um amplo espectro de manifestações clínicas (BHARTI et al., 2003). Os sinais e sintomas podem variar desde infecções assintomáticas e febris a formas graves da doença, resultando em casos fatais (MCBRIDE et al., 2005). Estima-se que mais de um milhão de casos ocorrem anualmente no mundo, e aproximadamente, 60.000 óbitos relacionados à doença (COSTA et al., 2015). A maior parte da carga da doença está relacionada a países em desenvolvimento e, que apresentam condições inadequadas de infraestrutura e saúde (GOARANT, 2016). A infecção humana ocorre após contato direto com a urina de reservatório animal infectado ou indireto com água e solo contaminado (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; BIERQUE et al., 2020).

O gênero *Leptospira* apresenta 66 espécies, descrito mais de 300 sorovares agrupados em 20 sorogrupos (PICARDEAU, 2017; CASANOVAS-MASSANA et al., 2019; VINCENT et al., 2019). Os distintos sorovares podem infectar qualquer espécie animal, porém alguns sorovares são mais adaptados a hospedeiros animais específicos (BHARTI et al., 2003). Essa preferência animal pode explicar o porquê determinados sorovares são mais frequentes em algumas regiões ou países. A diversidade de hospedeiros sugere distinções entre as características ambientais associadas aos sorovares, entretanto, esse aspecto ainda não tem sido apropriadamente descrito na literatura. A diversidade de sorovares e reservatórios, somado a determinantes demográficos, sócio-ambientais e comportamentais tem sido uma barreira na caracterização do padrão epidemiológico da leptospirose. Estes fatores podem influenciar no risco de transmissão e conseqüentemente no aumento da incidência e surtos de leptospirose (FELZEMBURGH et al., 2014).

Historicamente, países tropicais e subtropicais em desenvolvimento apresentam picos estacionais de leptospirose associados a eventos de inundações na estação chuvosa (TREVEJO et al., 1998; KO et al., 1999; AMILASAN et al., 2012; HACKER et al., 2020). O crescimento desordenado das grandes cidades aliado à falta de uma política habitacional ativa, gera condições ambientais e sociais que favorecem a transmissão

desta doença (REIS et al., 2008). No mundo e no Brasil, atualmente, mais de 33% (UN-HABITAT, 2013), e 28% (UN-HABITAT, 2010) respectivamente, da população vive em comunidades urbanas (favelas), sujeita à precária infraestrutura de esgotamento sanitário e inadequado gerenciamento de resíduos.

Estudos prévios realizados durante duas décadas, em Salvador-Brasil, têm relatado *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (cepa L1130) como o sorovar responsável por mais de 95% dos casos clínicos da cidade (KO et al., 1999) e infecções assintomáticas em residentes de comunidades vulneráveis em Pau da Lima (FELZEMBURGH et al., 2014; HAGAN et al., 2016). O reservatório animal comumente relacionado com o sorovar Copenhageni é o *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), como demonstra alguns estudos na região (COSTA et al., 2014a, 2014b). Estes mesmos estudos têm identificado, a partir da soroincidência, *Leptospira kirschneri* sorovar Cynopteri (cepa 3522C) como o segundo sorovar mais freqüente em residentes de comunidades urbanas (dados não publicados). Porém, até o momento, não existe evidência confirmatória sobre o reservatório animal, bem como os determinantes associados à transmissão do sorovar Cynopteri.

Desta forma, estudar o perfil sorológico anti-*Leptospira* dos residentes de comunidades urbanas, considerando as peculiaridades do sorovar infectante, pode contribuir para um melhor entendimento das características que contribuem para a infecção urbana e assim, facilitar o desenvolvimento de medidas de controle específicas. O presente estudo tem como objetivo analisar comparativamente os determinantes demográficos e sócio-ambientais associados à transmissão de *Leptospira interrogans* Copenhageni (cepa FIOCRUZ L1-130) e *Leptospira kirschneri* Cynopteri (cepa 3522C) em residentes de comunidades urbanas de Salvador-Brasil.

MÉTODOS

Desenho de estudo

Realizamos um estudo de corte transversal em cinco bairros urbanos (Pau da Lima, Alto do Cabrito, Marechal Rondon, Nova Constituinte e Rio Sena) da cidade de Salvador, Bahia, Brasil. No Bairro de Pau da Lima (PL) as coletas foram feitas no período de março a abril de 2018. Estudos prévios realizados neste bairro demonstraram uma taxa de soroincidência de 37,8 infecções por 1.000 pessoas ao ano (FELZEMBURGH et al., 2014). Nas demais comunidades - Alto do Cabrito (AdC), Marechal Rondon (RM), Nova Constituinte (NC) e Rio Sena (RS) - as amostras foram

coletadas no período compreendido entre abril a setembro de 2018. Os bairros estudados contam com uma população de aproximadamente 500.000 habitantes cada, distribuídos em uma área de 0,07 e 0,09 km². Os bairros são caracterizados como de baixa renda *com precariedade de saneamento e infraestrutura*, onde reside a população de *menor poder econômico* (IBGE, 2010).

Os indivíduos elegíveis e que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, e em seguida realizaram coleta de sangue para análise sorológica. Entrevistas estruturadas foram realizadas incluindo informações sobre as características individuais do participante, características do domicílio e peridomicílio, exposição a fontes de risco ambiental e presença de animais potenciais reservatórios.

As análises sorológicas foram realizadas por meio do teste de soroaglutinação microscópica (MAT), teste padrão ouro no diagnóstico da leptospirose humana, como descrita anteriormente (REIS et al., 2008). O MAT se baseia na identificação por microscopia de campo escuro da aglutinação do soro do indivíduo (anticorpo) com antígenos vivos de *Leptospira*. Títulos de anticorpo a partir 1:50 foram considerados positivos. As amostras foram testadas com uma bateria de oito antígenos, nos quais incluímos cinco cepas de referência (WHO Collaborative Laboratory for Leptospirosis, Royal Tropical Institute, Holland): *L. kirschneri* sorovares Cynopteri cepa 3522C e Grippothyphosa cepa Duyster, *L. interrogans* sorovares Canicola cepa H. Utrecht e Autumnalis cepa Akiyami A e *L. borgspetersenii* sorovar Ballum cepa MUS 127, incluímos também dois isolados clínicos: *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (cepa isolada localmente no ano de 1996) e LV3954 (FELZEMBURGH et al., 2014) e um isolado ambiental pertencente ao clado das espécies patogênicas (dados do 3^a manuscrito da presente tese). Contudo, direcionamos as análises de associação apenas para os sorovares Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 e Cynopteri cepa 3522C.

Estes estudos foram aprovados pelos comitês de ética da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, CAAE 45217415.4.0000.0040, e do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva (UFBA) licença 041 / 17-2.245.914.17-2.245.914.

Análises estatísticas

Frequências relativas e absolutas foram determinadas para variáveis dicotômicas e policotômicas. Uma regressão multinomial mista foi usada para análises bivariadas e multivariadas com soropositividade para *Leptospira* (0 = negativo, 1 = Copenhageni L1-130, 2 = Cynopteri 3522c e 3 = soropositividade mistas). A variável “bairro” foi tratada como efeito aleatório do modelo incluindo uma matriz de correlação de componentes de variância. Variáveis com $p \leq 0,25$ na análise bivariada foram incluídas na análise multivariada. O modelo multivariado final foi construído usando o método passo a passo de acordo com os critérios do pesquisador. Para seleção do modelo utilizamos AIC (Critério de informação de Akaike) e o BIC (Critério de informação bayesiano). Apresentam-se odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC), ajustados por efeitos aleatórios (bairro) e valores de p. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos no PROC GLIMMIX do SAS versão 14.2.

RESULTADOS

A pesquisa foi conduzida com 3010 indivíduos residentes de cinco bairros urbanos localizados na cidade do Salvador-Brasil, dos quais, 1692 moradores de Pau da Lima, 338 de Marechal Rondon, 375 de Alto do Cabrito, 306 de Nova Constituinte e 299 de Rio Sena (tabela S1). As características a nível individual, domiciliar, ambiental e presença de animais se diferiram em sua maioria entre os bairros estudados. No geral, a população do estudo consistia em mais indivíduos do sexo feminino (59% de 1.784/3.010) e da raça negra (47% de 1.406/3.010) (Tabela S1).

A soroprevalência total encontrada foi de 10.0% (302/3010). As soroprevalências estratificadas por sorovar foram 8.2% (248/3010) para *L. interrogans* sorovar Copenhageni, e 1.0% para *L. Kirschneri* sorovar Cynopteri (29/3010). A frequência de soropositividade para os demais sorovares avaliados (Canicola, Akiami A, Ballum, isolado ambiental), juntos chegaram a 0.5% (14/3010). Quando avaliamos a soroprevalência estratificada por bairro observamos que a soroprevalência do sorovar Copenhageni variou entre 6.4% em AC e 9.1% em PL. A soroprevalência de Cynopteri variou entre 0.5% em PL e 2.0% em RS (Tabela S1).

A figura 1 mostra uma relação positiva entre anticorpos contra Copenhageni e idade, para ambos os sexos, porém essa tendência parece mais clara para os homens. Os homens apresentaram uma soroprevalência mais alta quando comparado com as mulheres (Tabela 1). Não observamos esse padrão para o sorovar Cynopteri, representando uma maior soroprevalência para o grupo de 45-101 anos de idade em

ambos os sexos, observado também, uma prevalência a considerar para o grupo de 17 e 29 anos dos homens.

A Tabela 1 apresenta a análise bivariada entre as variáveis de exposição e os sorovares Cynopteri e Copenhageni. As características associadas à Cynopteri foram: ocupação de risco, tipo de revestimento no quintal, andar descalço e observar ratos próximo do domicílio. As variáveis idade e presença de gato não foram estatisticamente significantes, porém, foram incluídas no modelo multivariado, por apresentarem $p < 0.25$. Em relação ao sorovar Copenhageni as características estatisticamente associadas foram: sexo, idade, educação, ocupação de risco, esgoto aberto próximo ao domicílio, elevação do piso do domicílio, pavimentação ao acesso para o domicílio, tipo de material da parede do domicílio, uso de botas, andar descalço no peridomicílio, ter limpado esgoto, dificuldade a acesso a via principal do bairro. As variáveis que também entraram nas análises multivariadas foram: ter muro fechado, batente na porta de entrada da casa, tipo de revestimento no quintal.

O modelo da regressão multinomial multivariada (Tabela 3) identificou as seguintes variáveis independentemente associadas ao sorovar Cynopteri: idade (OR 1.03; IC 1.01-1.052), ocupação de risco (OR 3.73; IC 1.063-13.095) e andar descalço no peridomicílio nos últimos 12 meses (OR 3.18; IC 1.501-6.747). Para o sorovar Copenhageni as variáveis independentemente associadas foram idade (OR 1.029; IC 1.022-1.037), sexo (OR 1.611; IC 1.229-2.111), ocupação de risco (OR 1.364; IC 0.702-2.653), esgoto aberto próximo ao domicílio (OR 1.404; IC 1.063-1.854), elevação no piso do domicílio (OR 0.576; IC 0.39-0.849), material da parede do domicílio (concreto) (OR 0.194; IC 0.054-0.338) e material da parede do domicílio (tijolo) (OR 0.151 IC 0.055-0.417).

DISCUSSÃO

Neste presente estudo identificamos nas amostras analisadas evidências sorológicas de co-circulação de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. Kirschneri* sorovar Cynopteri em todas as comunidades estudadas. *L. Kirschneri* sorovar Cynopteri apresentou menor prevalência quando comparado com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, este último sendo reconhecido como principal espécie e sorovar responsável por causar a leptospirose em humanos em Salvador (KO et al., 1999). Adicionalmente, identificamos que existem diferentes fatores demográficos e sócio-ambientais associados à soropositividade destes dois sorovares.

Os residentes com evidência sorológica de exposição pelo sorovar Cynopteri apresentaram um perfil demográfico diferente daquele tradicionalmente conhecido para sorovar Copenhageni. Observamos uma tendência ao aumento na prevalência para o sorovar Cynopteri no grupo etário de >45 anos de idade em ambos os sexos, essa observação sugere que tanto homens como mulheres podem ser afetados por esse sorovar. Esse comportamento é diferente ao padrão típico do sorovar Copenhageni, para o qual observamos que os casos aumentam com a idade, sendo as pessoas do sexo masculino as mais afetadas pela doença, e a maioria dos casos da faixa etária entre adultos (30-44 anos) e idosos (>45 anos). A relação entre idade e risco de transmissão pelo sorovar Copenhageni é similar a observada em estudos prévios (REIS et al., 2008).

Exposição ocupacional foi associada à maior chance de adquirir anticorpos contra Cynopteri. Estes indivíduos exerciam atividades com resíduos sólidos como gari e serviço de reciclagem ou a atividade a exposição à lama, água da enchente e / ou esgoto. Tradicionalmente, nestas comunidades, a transmissão da leptospirose está associada à atividade ocupacional, em que atividades de trabalho como agricultura de subsistência é um fator risco (MCBRIDE et al., 2005). Sabe-se que os moradores de favelas geralmente praticam trabalho informal, e no mesmo ambiente em que vivem, evidenciando o ambiente como uma fonte importante de transmissão. Não encontramos associações independentes entre ocupação de risco para o sorovar Copenhageni neste trabalho.

Na literatura, pouco se conhece sobre os reservatórios animais e ambientais do sorovar Cynopteri. Nas análises univariadas, com indivíduos de quatro das comunidades que possuíam dados da presença de animais no domicílio, encontramos associação limiar positiva de indivíduos com anticorpos para Cynopteri com presença de gatos. Apesar de a maioria dos relatos sobre a ocorrência para esse sorovar ter sido em animais silvestres como morcegos, alguns trabalhos foram realizados com animais domésticos, como o de Murilo et al. (2020), eles demonstraram que os gatos também podem ser potenciais transmissores de *Leptospira*, por apresentarem uma maior soroprevalência do sorovar Cynopteri entre os sorovares estudados (MURILLO et al., 2020). Curiosamente, “avistar rato” próximo ao domicílio foi relacionado com a menor soropositividade por Cynopteri. Este achado poderia potencialmente estar relacionado ao fato que roedores são os principais reservatórios de Copenhageni (DE FARIA et al., 2008).

Andar descalço fora da casa também esteve associado com maior risco de soropositividade do sorovar Cynopteri. Este achado evidencia a exposição ambiental

como importante via de transmissão indireta. Considerando que além dos ratos, outros animais podem eliminar leptospiros através da urina ao ambiente, e assim a chance de exposição a uma diversidade de espécies de *Leptospira* é alta. Essa associação também foi relatada em outros estudos epidemiológicos (LEAL-CASTELLANOS et al., 2003; ESCANDÓN-VARGAS; OSORIO; ASTUDILLO-HERNÁNDEZ, 2017).

Entre as variáveis a nível domiciliar, ter esgoto aberto em áreas peri-domiciliares foi fator associado a maior soropositividade por Copenhageni. Esse resultado é consistente com o estudo de Felzemburgh et al, 2014, no qual eles encontraram que residir nas proximidades de um esgoto a céu aberto estava significativamente associada a um risco aumentado de infecção. E ressaltaram que as deficiências de infraestrutura das residências também servem como fontes de transmissão para exposições repetidas a *Leptospira* (FELZEMBURGH et al., 2014). Em um estudo anterior, na mesma área de estudo, identificou que além do esgoto, a presença de água empoeçada no chão, provenientes de acúmulos de águas da chuva pode ser fonte de *Leptospira* patogênica (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018).

Encontramos que material de parede da casa feito de concreto e tijolo e domicílios com pisos elevados foram associados como fatores de proteção de soropositividade por Copenhageni. Acreditamos que a plausibilidade biológica para esse fato pode ser devido que o concreto e tijolo diminuem a infiltração do esgoto contaminado na parede e assim a exposição direta dos indivíduos. O ambiente desempenha uma importante fonte de disseminação da *Leptospira*. Uma vez que os animais reservatórios (como o rato) eliminam junto com sua urina cargas da bactéria no ambiente, e ao chover transborda o esgoto juntamente com os sedimentos do solo e leptospiros (VIAU; BOEHM, 2011; GARCÍA-ALJARO et al., 2017). Bem como a elevação do piso das casas serviria como obstáculo contra o transbordamento do esgoto provocado principalmente em períodos de chuva. Alternativamente, modificações estruturais no domicílio poderiam ser um indicador de melhor nível socioeconômico, como sugerido em outro estudo (COSTA et al., 2014b).

Tivemos limitações durante o percurso do estudo. Observamos dados faltantes para características do chefe do domicílio. Variáveis sobre a presença de animais não estiveram disponíveis para o bairro de Pau da Lima limitando as análises sobre reservatórios animais.

Concluindo, nossos dados mostram que cenários ambientais particulares podem representar risco de transmissão para sorovar Cynopteri. Adicionalmente, nossos

achados apontam para o gato como um potencial reservatório deste sorovar. Cada sorovar apresentou padrões de transmissão específicos. Esperamos que estes resultados motivem novos estudos na perspectiva de saúde única (“one health”) que possam explicar o papel dos animais sinantrópicos e silvestres na transmissão e dinâmica do sorovar Cynopteri em áreas urbanas.

REFERÊNCIAS

- AMILASAN, A. S. T. et al. Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 91–94, 2012.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BIERQUE, E. et al. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2020.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. **Water Research**, v. 130, p. 176–184, 2018.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira yasudae* sp. Nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1450–1456, 2019.
- COSTA, F. 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 and zoonotic diseases**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359425>>.
- COSTA, F. et al. Influence of Household Rat Infestation on *Leptospira* Transmission in the Urban Slum Environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 2014b.
- COSTA, F. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–19, 2015.
- DE FARIA, M. T. et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Trop**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008.
- ESCANDÓN-VARGAS, K.; OSORIO, L.; ASTUDILLO-HERNÁNDEZ, M. Seroprevalence and factors associated with *Leptospira* infection in an urban district of Cali,

Colombia. **Cadernos de saude publica**, v. 33, n. 5, p. e00039216, 2017.

FELZEMBURGH, R. D. M. et al. 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. 1–9, 2014.

GARCÍA-ALJARO, C. et al. Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events. **Water Research**, v. 112, p. 248–253, 2017.

GOARANT, C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 7, p. 49–62, 2016.

HACKER, K. P. et al. Influence of rainfall on leptospira infection and disease in a tropical urban setting, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, p. 311–314, 2020.

HAGAN, J. E. et al. Spatiotemporal determinants of urban leptospirosis transmission: Four-year prospective cohort study of slum residents in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820–825, 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2208>>.

LEAL-CASTELLANOS, C. B. et al. Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. **Epidemiology and Infection**, v. 131, n. 3, p. 1149–1156, 2003.

MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Tropical and travel-associated diseases**, v. 18, p. 376–386, 2005.

MURILLO, A. et al. Leptospira detection in cats in Spain by serology and molecular techniques. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, 2020.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita?

Nature Reviews Microbiology, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>>.

REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. 11–18, 2008.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage—Nicaragua, 1995. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 5, p. 1457–1463, 1998.

VIAU, J. E. & BOEHM, B. A. Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawaiian coastal streams. **water and Health**, v. 09, n. 4, p. 637–646, 2011.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007270>>.

1 Tabela 1. Modelos bivariados para soroprevalência de *Leptospira kirschneri* Cynopteri (3522c) e *Leptospira interrogans* Copenhageni (L1 130).
2

Características	Cynopteri (3522c)			Copenhageni (L1-130)		
	No. Participantes No. 2.737	No Positivo (Prevalência %) No. 29 (1%)	Valor de P	No. Participantes No. 2.956	No Positivo (Prevalência %) No. 248 (8.4%)	Valor de P
Nível individual						
Sexo						
Feminino	1.648	18 (1.1%)	0.99	1.756	126 (7.2%)	< 0.01
Masculino	1.089	11 (1.0%)		1.200	122 (10.2%)	
Raça/cor						
Branca	160	1 (0.6%)	0.80	174	15 (8.6%)	0.84
Negra	1.286	13 (1.0%)		1.382	109 (7.9%)	
Parda	1.248	14 (1.1%)		1.354	120 (8.9%)	
Outra	43	1 (2.3%)		46	4 (8.7%)	
Grupo idade (anos)						
05-16	739	5 (0.7%)	0.11	749	15 (2.0%)	< 0.01
17-29	714	7 (1.0%)		755	48 (6.4%)	
30-44	654	5 (0.8%)		743	94 (12.7%)	
45-101	627	12 (1.9%)		706	91 (12.9%)	
Missing	3	0 (0.0%)		3	0 (0.0%)	
Educação						
Intenção para estudar	332	2 (0.6%)	0.29	366	36 (9.8%)	< 0.01
Estuda anualmente	1.000	8 (0.8%)		1.028	36 (3.5%)	
Não tem intenção para estudar	1.405	19 (1.4%)		1.562	176 (11.3%)	
Ocupação de risco						
Não	2.672	26 (1.0%)	0.03	2.882	236 (8.2%)	0.025
Sim	65	3 (4.6%)		74	12 (16.2%)	

Nível domiciliar

Esgoto aberto próximo ao domicílio						
Não	1.543	15 (1.0%)	0.75	1.651	123 (7.5%)	0.04
Sim	1.192	14 (1.2%)		1.303	125 (9.6%)	
<i>Missing</i>	2	0 (0.0%)		2	0 (0.0%)	
A parte do esgoto mais próxima a sua casa possui alguma barreira contra alagamento?						
Não	867	9 (1.0%)	0.68	946	88 (9.3%)	0.63
Sim	325	5 (1.5%)		357	37 (10.4%)	
<i>Missing</i>	1.545	15 (1.0%)		1.653	123 (7.4%)	
Muro fechado						
Não	2.146	25 (1.2%)	0.42	2.327	206 (8.9%)	0.1
Sim	591	4 (0.7%)		629	42 (6.7%)	
Batente na porta de entrada do quintal						
Não	2.491	25 (1.0%)	0.56	2.690	224 (8.3%)	0.78
Sim	246	4 (1.6%)		266	24 (9.0%)	
Batente na porta de entrada da casa						
Não	1.772	17 (1.0%)	0.62	1.906	151 (7.9%)	0.24
Sim	965	12 (1.2%)		1.050	97 (9.2%)	
Elevação no piso do domicílio						
Não	2.190	23 (1.1%)	1	2.382	215 (9.0%)	0.01
Sim	547	6 (1.1%)		574	33 (5.7%)	
Morar em um andar superior						
Não	2.461	26 (1.1%)	1	2.661	226 (8.5%)	0.62
Sim	276	3 (1.1%)		295	22 (7.5%)	
O acesso para sua casa é pavimentado?						
Não	789	9 (1.1%)	0.95	867	87 (10.0%)	0.04
Sim	1.948	20 (1.0%)		2.089	161 (7.7%)	
A casa está localizada em encosta?						
Não	1.948	21 (1.1%)	1	2.106	179 (8.5%)	0.79

Sim	789	8 (1.0%)		850	69 (8.1%)	
Material da parede do domicílio						
Concreto ou tijolo coberto	2.523	25 (1.0%)	0.38	2.716	218 (8.0%)	< 0.01
Tijolo descoberto	201	4 (2.0%)		218	21 (9.6%)	
Madeira ou outro Material semelhante que não seja alvenaria	13	0 (0.0%)		22	9 (40.9%)	
Qual é o revestimento no quintal						
Nenhum	503	2 (0.4%)	0.03	566	65 (11.5%)	0.06
Terra/barro	825	14 (1.7%)		877	66 (7.5%)	
Pavimento/cimento	147	1 (0.7%)		156	10 (6.4%)	
Cerâmica/piso	22	0 (0.0%)		25	3 (12.0%)	
não sabe	835	3 (0.4%)		905	73 (8.1%)	
Missing	405	9 (2.2%)		427	31 (7.3%)	
Exposição a fontes de contaminação						
Uso de botas						
Não	2297	26 (1.1%)	0.56	2462	191 (7.8%)	< 0.01
Sim	438	3 (0.7%)		492	57 (11.6%)	
Missing	2	0 (0.0%)		2	0 (0.0%)	
Nos últimos 12 meses, o(a) senhor(a) andou na lama em seu bairro?						
Não	1.661	15 (0.9%)	0.42	1.792	146 (8.1%)	0.6
Sim	1.075	14 (1.3%)		1.163	102 (8.8%)	
Missing	1	0 (0.0%)		1	0 (0.0%)	
Nos últimos 12 meses, o(a) senhor(a) andou em água de esgoto no seu bairro?						
Não	2.068	15 (0.7%)	< 0.01	2.235	182 (8.1%)	0.44
Sim	669	14 (2.1%)		721	66 (9.2%)	
Nos últimos 12 meses o(a) senhor(a) andou fora de sua casa descalço?						
Não	1.645	19 (1.2%)	0.68	1.791	165 (9.2%)	0.05

Sim	1.092	10 (0.9%)		1.165	83 (7.1%)	
Limpou esgoto nos últimos 12 meses?						
Não	2.137	23 (1.1%)	0.65	2.320	206 (8.9%)	0.02
Sim	245	4 (1.6%)		278	37 (13.3%)	
<i>Missing</i>	355	2 (0.6%)		358	5 (1.4%)	
Nos últimos 30 dias, o senhor(a) observou ratos perto (< 10 metros) da sua casa ?						
Não	862	15 (1.7%)	0.04	926	79 (8.5%)	1
Sim	1.621	12 (0.7%)		1.760	151 (8.6%)	
<i>Missing</i>	254	2 (0.8%)		270	18 (6.7%)	
Tem dificuldade em acessar a via principal do bairro?						
Não	1.032	16 (1.6%)	0.31	1.085	69 (6.4%)	< 0.01
Sim	166	5 (3.0%)		186	25 (13.4%)	
<i>Missing</i>	1.539	8 (0.5%)		1.685	154 (9.1%)	
Presença de animais no domicílio						
Gato						
Não	921	12 (1.3%)	0.06	980	71 (7.2%)	0.84
Sim	280	9 (3.2%)		294	23 (7.8%)	
<i>Missing</i>	1.536	8 (0.5%)		1.682	154 (9.2%)	
Cachorro						
Não	691	12 (1.7%)	1	735	56 (7.6%)	0.78
Sim	510	9 (1.8%)		539	38 (7.1%)	
<i>Missing</i>	1.536	8 (0.5%)		1.682	154 (9.2%)	
Galinha						
Não	1.111	18 (1.6%)	0.44	1.180	87 (7.4%)	1
Sim	90	3 (3.3%)		94	7 (7.4%)	
<i>Missing</i>	1.536	8 (0.5%)		1.682	154 (9.2%)	
Outros						
Não	1.021	17 (1.7%)	0.83	1.086	82 (7.6%)	0.68

Sim	180	4 (2.2%)	188	12 (6.4%)
Missing	1.536	8 (0.5%)	1.682	154 (9.2%)

3
4

Tabela 2. Regressão multinomial multivariada de soropositividade de *Leptospira kirschneri* Cynopteri (3522c) e *Leptospira interrogans* Copenhageni (FIOCRUZ L1-130).

Características	Cynopteri (3522c)		Copenhageni (L1-130)	
	OR	95% IC	OR	95% IC
Sexo (masculino)			1.61	1.229-2.111
Idade (anos)	1.03	1.01-1.052	1.02	1.022-1.037
Ocupação de risco	3.73	1.063-13.095	1.36	0.702-2.653
Esgoto aberto a 10m próximo ao domicílio			1.40	1.063-1.854
Elevação do piso do domicílio			0.57	0.39-0.849
Material da parede do domicílio (concreto)			0.19	0.054-0.338
Material da parede do domicílio (tijolo)			0.15	0.055-0.417
Andou descalço fora da casa nos últimos 12 meses	3.18	1.501-6.747		

Abreviações: OR, odds ratio; 95% IC, intervalo de confiança.

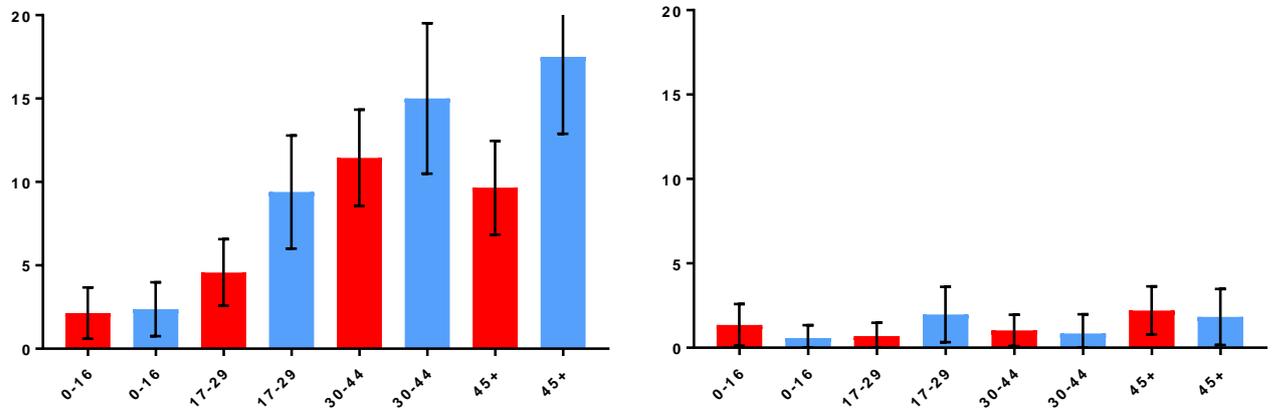


Figura 1. Taxa de infecção de *Leptospira interrogans* Copenhageni (A) e *Leptospira kirschneri* Cynopteri (B) por sexo e idade. Barras vermelhas: feminino. Barras azuis: masculinos. Whiskers: 95% de CI.

Tabela S1. Análise descritiva das características demográficas, sócio-ambientais por bairro.

Característica	Total No. 3.010	Pau da Lima No. 1.692	Marechal Rondon No. 338	Alto do Cabrito No. 375	Nova Constituinte No. 306	Rio Sena No. 299	P- valor
Nível individual							
Sexo							
Feminino	1.784	1,028 (60.8%)	201 (59.5%)	212 (56.5%)	174 (56.9%)	169 (56.5%)	0.36
Masculino	1.226	664 (39.2%)	137 (40.5%)	163 (43.5%)	132 (43.1%)	130 (43.5%)	
Raça/cor							
Branca	1.045	96 (5.7%)	21 (6.2%)	16 (4.3%)	15 (4.9%)	28 (9.4%)	< 0.01
Negra	1.406	756 (44.7%)	156 (46.2%)	194 (51.7%)	170 (55.6%)	130 (43.5%)	
Parda	1.381	833 (49.2%)	149 (44.1%)	151 (40.3%)	116 (37.9%)	132 (44.1%)	
Outra	47	7 (0.4%)	12 (3.6%)	14 (3.7%)	5 (1.6%)	9 (3.0%)	
Grupo idade (anos)							
05-16	756	483 (28.5%)	48 (14.2%)	60 (16.0%)	72 (23.5%)	93 (31.1%)	< 0.01
17-29	765	440 (26.0%)	75 (22.2%)	103 (27.5%)	74 (24.2%)	73 (24.4%)	
30-44	754	416 (24.6%)	85 (25.1%)	100 (26.7%)	87 (28.4%)	66 (22.1%)	
45-101	732	350 (20.7%)	130 (38.5%)	112 (29.9%)	73 (23.9%)	67 (22.4%)	
Missing	3	3 (0.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Educação							
Intenção para estudar	370	189 (11.2%)	44 (13.0%)	52 (13.9%)	40 (13.1%)	45 (15.1%)	< 0.01
Estuda anualmente	1.039	651 (38.5%)	84 (24.9%)	91 (24.3%)	101 (33.0%)	112 (37.5%)	
Não tem intenção para estudar	1.601	852 (50.4%)	210 (62.1%)	232 (61.9%)	165 (53.9%)	142 (47.5%)	
Ocupação de risco							
Nã	2.931	1,646 (97.3%)	320 (94.7%)	370 (98.7%)	301 (98.4%)	294 (98.3%)	< 0.01
Sim	495	46 (2.7%)	18 (5.3%)	5 (1.3%)	5 (1.6%)	5 (1.7%)	
Nível domiciliar							
Tem esgoto aberto próximo a casa?							
Não	1.679	789 (46.6%)	204 (60.4%)	297 (79.2%)	208 (68.0%)	181 (60.5%)	< 0.01
Sim	1.329	903 (53.4%)	134 (39.6%)	76 (20.3%)	98 (32.0%)	118 (39.5%)	
Missing	2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
A parte do esgoto mais próxima a sua casa possui alguma barreira contra alagamento?							
Não	964	653 (38.6%)	96 (28.4%)	40 (10.7%)	84 (27.5%)	91 (30.4%)	< 0.01
Sim	365	250 (14.8%)	38 (11.2%)	36 (9.6%)	14 (4.6%)	27 (9.0%)	
Missing	1.681	789 (46.6%)	204 (60.4%)	299 (79.7%)	208 (68.0%)	181 (60.5%)	
Muro fechado							
Não	2.372	1,355 (80.1%)	238 (70.4%)	263 (70.1%)	241 (78.8%)	275 (92.0%)	< 0.01
Sim	638	337 (19.9%)	100 (29.6%)	112 (29.9%)	65 (21.2%)	24 (8.0%)	
Batente na porta de entrada do quintal							
Não	2.739	1,526 (90.2%)	290 (85.8%)	335 (89.3%)	297 (97.1%)	291 (97.3%)	< 0.01
Sim	271	166 (9.8%)	48 (14.2%)	40 (10.7%)	9 (2.9%)	8 (2.7%)	
Batente na porta de entrada da casa							
Não	1.937	1,098 (64.9%)	157 (46.4%)	244 (65.1%)	217 (70.9%)	221 (73.9%)	< 0.01

Sim	1.073	594 (35.1%)	181 (53.6%)	131 (34.9%)	89 (29.1%)	78 (26.1%)	
Elevação do piso da casa							
Não	2.426	1,332 (78.7%)	305 (90.2%)	279 (74.4%)	267 (87.3%)	243 (81.3%)	< 0.01
Sim	584	360 (21.3%)	33 (9.8%)	96 (25.6%)	39 (12.7%)	56 (18.7%)	
Morar em um andar superior							
Não	2.712	1,456 (86.1%)	311 (92.0%)	356 (94.9%)	305 (99.7%)	284 (95.0%)	< 0.01
Sim	298	236 (13.9%)	27 (8.0%)	19 (5.1%)	1 (0.3%)	15 (5.0%)	
Nenhum							
Não	1.863	1,031 (60.9%)	267 (79.0%)	295 (78.7%)	133 (43.5%)	137 (45.8%)	< 0.01
Sim	1.147	661 (39.1%)	71 (21.0%)	80 (21.3%)	173 (56.5%)	162 (54.2%)	
O acesso para sua casa e pavimentado?							
Não	883	567 (33.5%)	73 (21.6%)	44 (11.7%)	65 (21.2%)	134 (44.8%)	< 0.01
Sim	2.127	1,125 (66.5%)	265 (78.4%)	331 (88.3%)	241 (78.8%)	165 (55.2%)	
A casa esta localizada em encosta?							
Não	2.144	1,183 (69.9%)	245 (72.5%)	297 (79.2%)	296 (96.7%)	123 (41.1%)	< 0.01
Sim	866	509 (30.1%)	93 (27.5%)	78 (20.8%)	10 (3.3%)	176 (58.9%)	
Material da parede da casa							
Concreto ou tijolo coberto	2.764	1,600 (94.6%)	298 (88.2%)	356 (94.9%)	286 (93.5%)	224 (74.9%)	< 0.01
Tijolo descoberto	921	77 (4.6%)	33 (9.8%)	19 (5.1%)	20 (6.5%)	75 (25.1%)	
Madeira ou outro material semelhante que não seja alvenaria	22	15 (0.9%)	7 (2.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Qual e o revestimento no quintal							
Nenhum	568	568 (33.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	< 0.01
Terra/barro	904	215 (12.7%)	118 (34.9%)	186 (49.6%)	197 (64.4%)	188 (62.9%)	
Pavimento/cimento	161	0 (0.0%)	76 (22.5%)	39 (10.4%)	35 (11.4%)	11 (3.7%)	
Cerâmica/piso	26	0 (0.0%)	11 (3.3%)	9 (2.4%)	6 (2.0%)	0 (0.0%)	
Não sabe	909	909 (53.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Missing	442	0 (0.0%)	133 (39.3%)	141 (37.6%)	68 (22.2%)	100 (33.4%)	
Exposição a fontes de contaminação							
Uso de botas							
Não	2.501	1,413 (83.5%)	274 (81.1%)	312 (83.2%)	247 (80.7%)	255 (85.3%)	0.55
Sim	507	279 (16.5%)	62 (18.3%)	63 (16.8%)	59 (19.3%)	44 (14.7%)	
Missing	2	0 (0.0%)	2 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Nos últimos 12 meses, o(a) senhor(a) andou na lama em seu bairro?							
Não	1.820	992 (58.6%)	188 (55.6%)	261 (69.6%)	183 (59.8%)	196 (65.6%)	< 0.01
Sim	1.189	700 (41.4%)	150 (44.4%)	114 (30.4%)	122 (39.9%)	103 (34.4%)	
Missing	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	
Nos últimos 12 meses, o(a) senhor(a) andou em água de esgoto no seu bairro?							
Não	2.265	1,223 (72.3%)	238 (70.4%)	325 (86.7%)	249 (81.4%)	230 (76.9%)	< 0.01
Sim	745	469 (27.7%)	100 (29.6%)	50 (13.3%)	57 (18.6%)	69 (23.1%)	
Nos últimos 12 meses o(a) senhor(a) andou fora de sua casa descalço?							
Não	1.828	1,002 (59.2%)	230 (68.0%)	231 (61.6%)	205 (67.0%)	160 (53.5%)	< 0.01
Sim	1.182	690 (40.8%)	108 (32.0%)	144 (38.4%)	101 (33.0%)	139 (46.5%)	
Limpou esgoto nos últimos 12 meses?							
Não	2.364	1,330 (78.6%)	266 (78.7%)	311 (82.9%)	230 (75.2%)	227 (75.9%)	0.012

Sim	286	143 (8.5%)	43 (12.7%)	28 (7.5%)	41 (13.4%)	31 (10.4%)	
Missing	360	219 (12.9%)	29 (8.6%)	36 (9.6%)	35 (11.4%)	41 (13.7%)	
Nos últimos 30 dias, o senhor(a) observou ratos perto (< 10 metros) da sua casa ?							
Não	953	523 (30.9%)	109 (32.2%)	121 (32.3%)	93 (30.4%)	107 (35.8%)	< 0.01
Sim	1.782	1,110 (65.6%)	185 (54.7%)	202 (53.9%)	143 (46.7%)	142 (47.5%)	
Missing	809	59 (3.5%)	44 (13.0%)	52 (13.9%)	70 (22.9%)	50 (16.7%)	
Tem dificuldade em acessar a via principal do bairro?							
Não	1.121	0 (0.0%)	281 (83.1%)	317 (84.5%)	265 (86.6%)	258 (86.3%)	0.63
Sim	194	0 (0.0%)	55 (16.3%)	58 (15.5%)	41 (13.4%)	40 (13.4%)	
Missing	1.695	1,692 (100.0%)	2 (0.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)	
Presença de animais no domicílio							
Gato							
Não	1.011		258 (76.3%)	293 (78.1%)	230 (75.2%)	230 (76.9%)	0.83
Sim	307		80 (23.7%)	82 (21.9%)	76 (24.8%)	69 (23.1%)	
Missing	1.692		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Cachorro							
Não	759		226 (66.9%)	218 (58.1%)	165 (53.9%)	150 (50.2%)	< 0.01
Sim	559		112 (33.1%)	157 (41.9%)	141 (46.1%)	149 (49.8%)	
Missing	1.692		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Galinha							
Não	1.220		323 (95.6%)	346 (92.3%)	270 (88.2%)	281 (94.0%)	< 0.01
Sim	98		15 (4.4%)	29 (7.7%)	36 (11.8%)	18 (6.0%)	
Missing	1.692		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Outros							
Não	1.122		277 (82.0%)	324 (86.4%)	268 (87.6%)	253 (84.6%)	0.2
Sim	196		61 (18.0%)	51 (13.6%)	38 (12.4%)	46 (15.4%)	
Missing	1.692		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Sorovar infectante							
Cynopteri	29	8 (0.5%)	6 (1.8%)	6 (1.6%)	3 (1.0%)	6 (2.0%)	< 0.01
Copenhageni	248	154 (9.1%)	24 (7.1%)	24 (6.4%)	23 (7.5%)	23 (7.7%)	
Misto	11	2 (0.1%)	3 (0.9%)	3 (0.8%)	1 (0.3%)	2 (0.7%)	
Outros	14	0 (0.0%)	4 (1.2%)	5 (1.3%)	1 (0.3%)	4 (1.3%)	
Negativo	2.708	1,528 (90.3%)	301 (89.1%)	337 (89.9%)	278 (90.8%)	264 (88.3%)	

Tabela S2. Modelos bivariados para soroprevalência de *Leptospira kirschneri* Cynopteri (3522c), *Leptospira interrogans* Copenhageni (L1 130), misto e outros sorovares.

Características	Cynopteri	Copenhageni	Misto	Outros	Negativo	Valor de P
	No. 29	No. 248	No. 11	No. 14	No. 2.708	
Sexo						
Feminino	18 (62.1%)	126 (50.8%)	4 (36.4%)	6 (42.9%)	1,630 (60.2%)	0.02
Masculino	11 (37.9%)	122 (49.2%)	7 (63.6%)	8 (57.1%)	1,078 (39.8%)	
Raça/cor						
Branca	1 (3.4%)	15 (6.0%)	0 (0.0%)	1 (7.1%)	159 (5.9%)	0.98
Negra	13 (44.8%)	109 (44.0%)	4 (36.4%)	7 (50.0%)	1,273 (47.0%)	
Parda	14 (48.3%)	120 (48.4%)	7 (63.6%)	6 (42.9%)	1,234 (45.6%)	
Outra	1 (3.4%)	4 (1.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	42 (1.6%)	
Grupo idade (anos)						
05-16	5 (17.2%)	15 (6.0%)	0 (0.0%)	2 (14.3%)	734 (27.1%)	< 0.01
17-29	7 (24.1%)	48 (19.4%)	1 (9.1%)	2 (14.3%)	707 (26.1%)	
30-44	5 (17.2%)	94 (37.9%)	4 (36.4%)	2 (14.3%)	649 (24.0%)	
45-101	12 (41.4%)	91 (36.7%)	6 (54.5%)	8 (57.1%)	615 (22.7%)	
Missing	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (0.1%)	
Educação						
Intenção para estudar	2 (6.9%)	36 (14.5%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	330 (12.2%)	< 0.01
Estuda anualmente	8 (27.6%)	36 (14.5%)	0 (0.0%)	3 (21.4%)	992 (36.6%)	
Não tem intenção para estudar	19 (65.5%)	176 (71.0%)	9 (81.8%)	11 (78.6%)	1,386 (51.2%)	
Ocupação de risco						
Não	26 (89.7%)	236 (95.2%)	9 (81.8%)	14 (100.0%)	2,646 (97.7%)	< 0.01
Sim	3 (10.3%)	12 (4.8%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	62 (2.3%)	
Tem esgoto aberto próximo a casa?						
Não	15 (51.7%)	123 (49.6%)	6 (54.5%)	7 (50.0%)	1,528 (56.4%)	0.31
Sim	14 (48.3%)	125 (50.4%)	5 (45.5%)	7 (50.0%)	1,178 (43.5%)	
Missing	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.1%)	
A parte do esgoto mais próxima a sua casa possui alguma barreira contra alagamento?						
Não	9 (31.0%)	88 (35.5%)	4 (36.4%)	5 (35.7%)	858 (31.7%)	0.92
Sim	5 (17.2%)	37 (14.9%)	1 (9.1%)	2 (14.3%)	320 (11.8%)	
Missing	15 (51.7%)	123 (49.6%)	6 (54.5%)	7 (50.0%)	1,530 (56.5%)	
Muro fechado						
Não	25 (86.2%)	206 (83.1%)	9 (81.8%)	11 (78.6%)	2,121 (78.3%)	0.4
Sim	4 (13.8%)	42 (16.9%)	2 (18.2%)	3 (21.4%)	587 (21.7%)	
Batente na porta de entrada do quintal						
Não	25 (86.2%)	224 (90.3%)	11 (100.0%)	13 (92.9%)	2,466 (91.1%)	0.72
Sim	4 (13.8%)	24 (9.7%)	0 (0.0%)	1 (7.1%)	242 (8.9%)	
Batente na porta de entrada da casa						
Não	17 (58.6%)	151 (60.9%)	4 (36.4%)	10 (71.4%)	1,755 (64.8%)	0.2

Sim	12 (41.4%)	97 (39.1%)	7 (63.6%)	4 (28.6%)	953 (35.2%)	
Elevação do piso da casa						
Não	23 (79.3%)	215 (86.7%)	10 (90.9%)	11 (78.6%)	2,167 (80.0%)	0.12
Sim	6 (20.7%)	33 (13.3%)	1 (9.1%)	3 (21.4%)	541 (20.0%)	
Morar em um andar superior						
Não	26 (89.7%)	226 (91.1%)	11 (100.0%)	14 (100.0%)	2,435 (89.9%)	0.53
Sim	3 (10.3%)	22 (8.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	273 (10.1%)	
Nenhum						
Não	17 (58.6%)	148 (59.7%)	10 (90.9%)	9 (64.3%)	1,679 (62.0%)	0.33
Sim	12 (41.4%)	100 (40.3%)	1 (9.1%)	5 (35.7%)	1,029 (38.0%)	
O acesso para sua casa e pavimentado?						
Não	9 (31.0%)	87 (35.1%)	4 (36.4%)	3 (21.4%)	780 (28.8%)	0.28
Sim	20 (69.0%)	161 (64.9%)	7 (63.6%)	11 (78.6%)	1,928 (71.2%)	
A casa está localizada em encosta?						
Não	21 (72.4%)	179 (72.2%)	8 (72.7%)	9 (64.3%)	1,927 (71.2%)	0.98
Sim	8 (27.6%)	69 (27.8%)	3 (27.3%)	5 (35.7%)	781 (28.8%)	
Material da parede da casa						
Concreto ou tijolo coberto	25 (86.2%)	218 (87.9%)	10 (90.9%)	13 (92.9%)	2,498 (92.2%)	< 0.01
Tijolo descoberto	4 (13.8%)	21 (8.5%)	1 (9.1%)	1 (7.1%)	197 (7.3%)	
Madeira ou outra material semelhante que não seja alvenaria	0 (0.0%)	9 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	13 (0.5%)	
Qual é o revestimento no quintal						
Nenhum	2 (6.9%)	65 (26.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	501 (18.5%)	< 0.01
Terra/barro	14 (48.3%)	66 (26.6%)	7 (63.6%)	6 (42.9%)	811 (29.9%)	
Pavimento/cimento	1 (3.4%)	10 (4.0%)	0 (0.0%)	4 (28.6%)	146 (5.4%)	
Cerâmica/piso	0 (0.0%)	3 (1.2%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	22 (0.8%)	
não sabe	3 (10.3%)	73 (29.4%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	832 (30.7%)	
Missing	9 (31.0%)	31 (12.5%)	2 (18.2%)	4 (28.6%)	396 (14.6%)	
Uso de botas						
Não	26 (89.7%)	191 (77.0%)	4 (36.4%)	9 (64.3%)	2,271 (83.9%)	< 0.01
Sim	3 (10.3%)	57 (23.0%)	7 (63.6%)	5 (35.7%)	435 (16.1%)	
Missing	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.1%)	
Nos últimos 12 meses, o(a) senhor(a) andou na lama em seu bairro?						
Não	15 (51.7%)	146 (58.9%)	3 (27.3%)	10 (71.4%)	1,646 (60.8%)	0.13
Sim	14 (48.3%)	102 (41.1%)	8 (72.7%)	4 (28.6%)	1,061 (39.2%)	
Missing	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.0%)	
Nos últimos 12 meses, o(a) senhor(a) andou em água de esgoto no seu bairro?						
Não	15 (51.7%)	182 (73.4%)	5 (45.5%)	10 (71.4%)	2,053 (75.8%)	< 0.01
Sim	14 (48.3%)	66 (26.6%)	6 (54.5%)	4 (28.6%)	655 (24.2%)	
Nos últimos 12 meses o(a) senhor(a) andou fora de sua casa descalço?						
Não	19 (65.5%)	165 (66.5%)	10 (90.9%)	8 (57.1%)	1,626 (60.0%)	0.07
Sim	10 (34.5%)	83 (33.5%)	1 (9.1%)	6 (42.9%)	1,082 (40.0%)	

Limpou esgoto nos últimos 12 meses?

Não	23 (79.3%)	206 (83.1%)	7 (63.6%)	14 (100.0%)	2,114 (78.1%)	< 0.01
Sim	4 (13.8%)	37 (14.9%)	4 (36.4%)	0 (0.0%)	241 (8.9%)	
Missing	2 (6.9%)	5 (2.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	353 (13.0%)	

Nos últimos 30 dias, o senhor(a) observou ratos perto (< 10 metros) da sua casa ?

Não	15 (51.7%)	79 (31.9%)	4 (36.4%)	8 (57.1%)	847 (31.3%)	0.05
Sim	12 (41.4%)	151 (60.9%)	5 (45.5%)	5 (35.7%)	1,609 (59.4%)	
Missing	2 (6.9%)	18 (7.3%)	2 (18.2%)	1 (7.1%)	252 (9.3%)	

Tem dificuldade em acessar a via principal do bairro?

Não	16 (55.2%)	69 (27.8%)	7 (63.6%)	13 (92.9%)	1,016 (37.5%)	< 0.01
Sim	5 (17.2%)	25 (10.1%)	2 (18.2%)	1 (7.1%)	161 (5.9%)	
Missing	8 (27.6%)	154 (62.1%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	1,531 (56.5%)	

Gato

Não	12 (41.4%)	71 (28.6%)	6 (54.5%)	13 (92.9%)	909 (33.6%)	0.13
Sim	9 (31.0%)	23 (9.3%)	3 (27.3%)	1 (7.1%)	271 (10.0%)	
Missing	8 (27.6%)	154 (62.1%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	1,528 (56.4%)	

Cachorro

Não	12 (41.4%)	56 (22.6%)	3 (27.3%)	9 (64.3%)	679 (25.1%)	0.63
Sim	9 (31.0%)	38 (15.3%)	6 (54.5%)	5 (35.7%)	501 (18.5%)	
Missing	8 (27.6%)	154 (62.1%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	1,528 (56.4%)	

Galinha

Não	18 (62.1%)	87 (35.1%)	8 (72.7%)	14 (100.0%)	1,093 (40.4%)	0.6
Sim	3 (10.3%)	7 (2.8%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	87 (3.2%)	
Missing	8 (27.6%)	154 (62.1%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	1,528 (56.4%)	

Outros

Não	17 (58.6%)	82 (33.1%)	8 (72.7%)	11 (78.6%)	1,004 (37.1%)	0.88
Sim	4 (13.8%)	12 (4.8%)	1 (9.1%)	3 (21.4%)	176 (6.5%)	
Missing	8 (27.6%)	154 (62.1%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	1,528 (56.4%)	

6 DISCUSSÃO

Comunidades urbanas carentes de saneamento básico e infraestrutura oferecem maiores riscos à transmissão de doenças infecciosas. A leptospirose é decorrente principalmente da ausência desses serviços públicos, figurando o ambiente como peça importante no ciclo de transmissão. O bairro de Pau da Lima – Salvador Bahia é um exemplo de comunidade urbana carente que possui características ambientais e sociais susceptíveis a essa doença. As condições climáticas da região, associadas à falta de saneamento básico, são fatores preponderantes para que as leptospirosas sobrevivam e se disseminem no ambiente.

Na literatura, poucos estudos foram conduzidos até o momento com o intuito de caracterizar as fontes ambientais associadas à leptospirose humana. Alguns deles utilizaram técnicas moleculares na avaliação de *Leptospira* em amostras ambientais (GANOZA et al., 2006; TANSUPHASIRI et al., 2006; LUCHINI et al., 2008; AVIAT et al., 2009; VIAU; BOEHM, 2011; MUÑOZ-ZANZI et al., 2014; MASON et al., 2016). E outros poucos estudos fizeram o uso de técnicas baseadas em isolamento (SLACK et al., 2009; SAITO et al., 2014; THIBEAUX et al., 2017).

Na presente tese foi possível realizar uma avaliação mais aprofundada dos principais reservatórios ambientais: água de esgoto e empoçada e solo. Na qual, incluiu a detecção e quantificação de *Leptospira* patogênica em amostras ambientais de uma área endêmica para leptospirose, a avaliação da influência dos fatores físico-químicos ambientais com a presença e concentração de *Leptospira*, seguida de classificação molecular dos isolados provenientes de amostras ambientais. Por fim, avaliamos o perfil sorológico anti-*Leptospira* de residentes de comunidades carentes de saneamento básico. Essa análise foi evidenciando comparativamente os determinantes sócio-ambientais preditores para diferentes sorovares de *Leptospira* co-circulantes na região.

Primeiramente, nós aplicamos uma técnica desenvolvida por nosso grupo que permitiu, com sucesso, identificar e quantificar DNA de *Leptospira* patogênica baseada no gene *lipL32* em amostras de água de esgoto e empoçada (RIEDIGER et al., 2016). Esse gene está presente apenas em *Leptospira* patogênica, o que possibilita a identificação mais específica de cepas exclusivamente infecciosas. A partir da avaliação de amostras de água de esgoto e empoçada quanto à presença e concentração de DNA de *Leptospira* patogênicas, foi encontrada a proporção de amostras qPCR positivas de >33%, representando um valor baixo quando comparado com o estudo de Ganoza e col. (2006) de 57% (GANOZA et al., 2006).

Adicionalmente, a concentração bacteriana achada neste estudo foi cerca de 150 GEq/mL apresentando-se menor que a referida pelos estudos no Peru e Havaí (VIAU e BOEHM, 2011). Isso poderia ser explicado pelo fato de que, no estudo de Ganoza, foram utilizados *primers* inespecíficos, permitindo assim a detecção adicional de espécies de *Leptospira* saprofíticas.

Existem evidências na literatura de que algumas características microbiológicas e físico-químicas estão relacionadas diretamente com a sobrevivência da *Leptospira* no ambiente (DIESCH et al., 1969; CASANOVAS-MASSANA et al., 2018b). Ao analisar os fatores físico-químicos tais como: temperatura, pH, TDS, condutividade elétrica, salinidade e turbidez, e sua influência na presença e concentração de *Leptospira* em águas superficiais de uma favela urbana brasileira, encontramos uma correlação positiva da concentração de *Leptospira* patogênica e pH, esse achado suporta as observações laboratoriais anteriores de que a sobrevivência de *Leptospira* prevalece em ambientes levemente básicos (SMITH; SELF, 1955; SMITH et al., 1961; PARKER; WALKER, 2011). Nossos resultados demonstram que a relação do TDS com a presença de *Leptospira* patogênica em águas superficiais (esgoto e empoçada) de favelas urbanas. Nossa hipótese é de que a presença de *Leptospira* está associada a eventos de precipitação (aumento da turbidez em consequência ao aumento do TDS), uma vez que as *Leptospira* podem ser mobilizadas do solo após eventos de chuva, como sugerido em outro estudo (VIAU e BOEHM, 2011). Esses resultados sustentam os achados do primeiro artigo da presente tese onde *Leptospira* estava mais presente no período chuvoso, especialmente nos esgotos. Dessa forma, a chuva teria um papel na distribuição do patógeno no meio ambiente e, portanto, no risco para os seres humanos. Encontramos também que o aumento de uma unidade de salinidade esteve associado a um aumento de 10x na chance de encontrar *Leptospira*, quando ajustado com TDS. Estes dados indicam que essas matrizes ambientais têm propriedades físicoquímicas apropriadas para a permanência da *Leptospira* nesses ambientes.

Nossos resultados evidenciaram uma elevada diversidade de espécies de *Leptospira*, em amostras de solo de comunidades vulneráveis, o que está em linha com estudos prévios que indicam esta matriz como importante reservatório ambiental (SCHNEIDER et al., 2018). Fizemos o sequenciamento dos isolados - encontrados em amostras ambientais - para classificação a nível de espécie. As amostras de solo estudadas na comunidade de Pau da Lima apresentaram a presença de espécies de *Leptospira* pertencentes ao clado patogênico e intermediário. A ocorrência das diferentes espécies de *Leptospira* pode estar relacionada com a fonte de infecção e diretamente associada a um hospedeiro específico, considerando que

alguns sorovares de *Leptospira* são adaptados a uma determinada espécie animal. Além disso, visto em estudo prévio (CASANOVAS-MASSANA et al., 2019) que a detecção de espécies potencialmente novas na água e no solo indica que a biodiversidade de *Leptospira* precisa ser explorada para entender de forma compreensível a ecoepidemiologia da doença em comunidades carentes urbanas. No entanto, não conseguimos isolar a *Leptospira interrogans*, a principal espécie causadora das infecções locais, contrastando com estudos de soroprevalência com ratos e humanos na mesma área estudada (HAGAN et al., 2016, COSTA et al., 2014). Há evidências relatadas em outros estudos que a *L. interrogans* demonstrou sobreviver e manter a virulência na água por até 344 dias (FONTAINE; FLORENCE; CHANTAL, 2015). Nossa hipótese é que *L. interrogans* estava presente, porém em baixa concentração e sobrevida curta, não sendo possível a detecção pela técnica de isolamento.

Incluimos as cepas isoladas do ambiente na bateria utilizada para testar a soropositividade de 3.010 indivíduos de cinco comunidades com características sócio-ambientais semelhantes a Pau da Lima. Contrário à nossa hipótese não identificamos indivíduos positivos para estas cepas isoladas nos mesmos/semelhantes ambientes onde os indivíduos residiam. Os residentes destas comunidades estiveram frequentemente expostos a *L. interrogans* sorovar Copenhageni (8.2%) e *L. Kirschneri* sorovar Cynopteri (1.0%). Observamos padrões epidemiológicos específicos associados à transmissão destes dois sorovares. Encontramos que os indivíduos >45 anos de ambos sexos, que tem exposição ocupacional, anda descalço e apresenta gatos no peridomicílio estão mais propensos a adquirir anticorpos contra Cynopteri. O padrão encontrado para o sorovar Copenhageni foi diferente, para o qual observamos que os casos aumentam com a idade, sendo as pessoas do sexo masculino e residir em domicílio próximo ao esgoto aberto tem mais chances de adquirir anticorpos contra Copenhageni, sendo que modificações na estrutura do domicílio como elevação no piso e material da parede (concreto e tijolo) são fatores de proteção para a transmissão.

O presente estudo permitiu prover uma visão integrada do ciclo de transmissão de leptospirose, com foco nas matrizes ambientais, que são rotas de transmissão indireta da doença. A reunião de expertises oriundas de várias áreas do conhecimento como os reservatórios ambientais, animal e hospedeiro humano a cerca da leptospirose é indispensável para avançar no conhecimento sobre a doença e suas relações com a transmissão e exposição de risco para assim contribuir para a criação de medidas eficazes e efetivas no controle da doença. De modo, que a integração desses tópicos representa um avanço importante, viabiliza o desenvolvimento e a utilização dessas técnicas e conhecimentos em prol da Saúde Coletiva.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos, as conclusões dessa Tese são:

- As matrizes ambientais esgoto, águas empoçadas e solo, são importantes reservatórios ambientais de *Leptospira*;
- *Leptospira* patogênicas estavam presentes nas amostras esgoto e águas empoçadas do Bairro de Pau da Lima;
- A presença de *Leptospira* patogênica apresenta um padrão sazonal e espacial nas águas superficiais da favela urbana, particularmente no esgoto;
- A concentração de DNA de *Leptospira* patogênica em águas superficiais foi geralmente baixa (concentração média de 152 GEq / mL);
- Existe uma relação entre o pH, TDS e salinidade e a presença de *Leptospira* patogênica em esgotos e poças em favelas urbanas. Esses marcadores podem contribuir para a caracterização ambiental favorável à manutenção dos níveis de *Leptospira* e à identificação de prováveis fontes de risco em ambientes de favelas urbanas.
- O solo do Bairro de Pau da Lima apresenta diversidade de espécies de *Leptospira*, inclusive de espécies intermediárias e patogênicas.
- As leptospirosas identificadas no solo são diferentes daquelas responsáveis pela infecção em residentes destas comunidades.
- Nossos dados sugerem padrões epidemiológicos específicos associados à transmissão de Copenhageni e Cynopteri.
 - A maior soroprevalência de *Leptospira* sorovar Cynopteri foi para os indivíduos >45 anos de ambos os sexos, que tem exposição ocupacional, anda descalço e apresenta gatos no peridomicílio;
 - A transmissão de Copenhageni foi mais presentes em residentes do sexo masculino e nos indivíduos que vivem em domicílio próximo ao esgoto aberto, sendo que

modificações na estrutura do domicílio como elevação no piso e material da parede (concreto e tijolo) são fatores de proteção para a transmissão.

- Nossos dados apontam a necessidade de estudos relacionados a outros reservatórios animais que podem estar associado ao sorovar Cynopteri.
- O presente estudo permitiu prover uma visão integrada do ciclo de transmissão de leptospirose, na perspectiva de saúde única (“one health”).

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; ANTHONY, R. M.; HARTSKEERL, R. A. A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 955–962, 2010.
- ALMEIDA, D. S. et al. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. In asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1–13, 2019.
- ARAGÃO, H. B. Sobre a presença da *Spirochaeta icterohemorrhagiae* os ratos no Rio de Janeiro. **Brazil-Medico**, v. 31, n. 39, p. 329–330, 1917.
- ARAÚJO, W. N. **Aspectos epidemiológicos da leptospirose no Brasil, 2000 a 2009 e a avaliação do conhecimento e das atitudes sobre a doença em uma favela na cidade de Salvador, Bahia**. 2011.
- AVIAT, F. et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France : A survey in feral rodents and in fresh water. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, p. 463–476, 2009.
- BARCELLOS, C.; SABROZA, P. C. The place behind the case : leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro O lugar do caso : leptospirose e riscos associados a condições ambientais durante o surto de 1996 na Zona Oeste do Rio de. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 59–67, 2001.
- BARRAGAN, V. et al. Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 19, 2017.
- BENACER, D. et al. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 1, p. 135–140, 2013.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BIERQUE, E. et al. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2020.
- BOLIN, C. A. et al. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 10, p. 1639–1643, 1991.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia Leptospirose : Diagnóstico e Manejo Clínico**, 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8^a ed. Brasília DF: Cadernos de Saúde Pública, 2010.
- CALDERÓN, A. et al. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 427–432, 2014.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, p. 1–11, 2018a.

- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. **Water Research**, v. 130, p. 176–184, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.068>.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira yasudae* sp. Nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1450–1456, 2019.
- CHAKRABORTY, A. et al. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 7, p. 494–501, 2011.
- CHANG, S. L.; BUCKINGHAM, M.; TAYLOR, M. P. Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*. IV. Survival in water and sewage: destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. **Infection Diseases**, v. 82, p. 256–266, 1948.
- CHIRIBOGA, J. et al. High Prevalence of Intermediate *Leptospira* spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2141–2147, 2015.
- COSTA, E. et al. Formas graves de leptospirose : aspectos clínicos , demográficos e ambientais Severe forms of leptospirosis : clinical , demographic and environmental aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 261–267, 2001.
- COSTA, F. et al. Influence of Household Rat Infestation on *Leptospira* Transmission in the Urban Slum Environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 2014.
- COSTA, F. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–19, 2015a.
- COSTA, F. et al. 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. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003819>.
- CRODA, J. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1528–1534, 2007.
- CUMBERLAND, P. et al. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989. **European Journal of Epidemiology**, v. 17, n. 7, p. 601–608, 2001.
- DE FARIA, M. T. et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Trop**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008.
- DIESCH, S. L. . et al. Environmental studies on the survival of *Leptospira* in a farm creek following a human leptospirosis outbreak in Iowa. **Bulletin Wildlife Disease Association**, v. 5, p. 166–173, 1969.
- ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal Veterinary Research**, v. 26, p. 45–51, 1965.
- ESCÓCIO, C. et al. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 77, n. 3, p. 371–379, 2010. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/escocio.pdf.

- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2^a ed. ed. [s.l.: s.n.]
- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2^a ed. Melbourne, Australia: MedSci, 2000.
- FELZEMBURGH, R. D. M. et al. 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. 1–9, 2014.
- FONTAINE, G. A.-; FLORENCE, A.; CHANTAL, T. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in Fresh Water. **Current Microbiology**, v. 71, p. 136–142, 2015.
- GANOZA, C. A. et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic Leptospira. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. 1329–1340, 2006.
- GANOZA, C. A. et al. Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by Leptospira. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, 2010.
- GARCÍA-ALJARO, C. et al. Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events. **Water Research**, v. 112, p. 248–253, 2017.
- GOMARD, Y. et al. Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic Leptospira suggesting notable host-specificity patterns. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, 2016.
- GONÇALVES, D. D. et al. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 135–140, 2006.
- HAAKE, D. a. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–2285, 2000.
- HAGAN, J. E. et al. Spatiotemporal determinants of urban leptospirosis transmission: Four-year prospective cohort study of slum residents in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W. & STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Review Microbiology**, n. 2, p. 95–108, 2004.
- HENRY, R. A.; JOHNSON, R. C. Leptospira in soil and water . Distribution of the Genus Leptospira in Soil and Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 492–499, 1978.
- INADA, R.; IDO, Y. A report on the discovery of the causal organism, a new species of Spirochaeta, of Weil's disease. **Tokyo Ijishinshi**, n. 1908, 1915.
- JOHNSON, R. C. et al. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27–31, 1967. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.028>.
- KIRSCHNER, L.; MAGUIRE, T. Survival of Leptospira outside their hosts. **New Zealand Medical Journal**, v. 56, p. 385–391, 1957.
- KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, p. 820–825, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485724>.

- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2208>.
- KOURY, M. C.; SILVA, V. Epidemiologia e Controle da Leptospirose Humana nas Regionais do município de Belo Horizonte , Minas Gerais . 2006.
- KUMAR, K. V. et al. Coaggregation and biofilm formation of *Leptospira* with *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, n. January, p. 1–4, 2019.
- KURILUNG, A. et al. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. **Research in Veterinary Science**, v. 115, 2017.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.
- LEVETT, P. N. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 447–452, 2003.
- LILENBAUM, W. et al. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 837–842, 2008.
- LUCHINI, D. et al. Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of leptospirosis. **International Journal Legal Medicine**, V. 122, P. 229–233, 2008.
- MASON, M. R. et al. distribution and diversity of pathogenic leptospira species in peri-domestic surface waters from South Central Chile. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004895>.
- MATTHIAS, M. A. et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, 2008.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Tropical and Travel-Associated Diseases**, v. 18, p. 376–386, 2005.
- MUÑOZ-ZANZI, C. et al. *Leptospira* contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 7, p. 6666–6680, 2014.
- NOGUCHI, H. *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* in American wild rats and its relationship to the Japanese and European strain. **Journal of Experimental Medicine & Hygiene**, v. 25, p. 755–763, 1917.
- OKAZAKI, W.; RINGEN, L. M. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira Pomona*. **American Journal Veterinay Research**, v. 18, p. 219–223, 1957.
- OLIVEIRA D.S.; GUIMARAES M.J.; PORTUGAL J.L. & MEDEIROS Z. The sociodemographic, environmental and reservoir Factors Associated With Leptospirosis In An Urban Area Of North-Eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, p. 149–57, 2009.
- PARKER, J.; WALKER, M. Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 1–2, p. 146–150, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.028>.

- PELLISSARI, D. M. et al. Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 565–574, 2012.
- PEREIRA, N. J. **Tecnologia de bioprocessos**. [s.l: s.n.]
- PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2008.
- PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>.
- PUI, C. F. et al. Diversity of *Leptospira* spp. in Rats and Environment from Urban Areas of Sarawak, Malaysia. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, p. 1–8, 2017.
- REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. 11–18, 2008a.
- REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. 11–18, 2008b.
- RIDZLAN, F. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia. **Trop. Biomed.**, v. 27, p. 632–638, 2010.
- RIEDIGER, I. N. et al. An optimized method for quantification of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160523>.
- RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, p. 1309–17, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451039>.
- SAITO, M. et al. Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 601–609, 2013.
- SAITO, M. et al. PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* spp. from coastal soil in Leyte, Philippines, after a storm surge during super Typhoon Haiyan (Yolanda). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, 2014.
- SAMPAIO, G. P. et al. Descrição epidemiológica dos casos de leptospirose em hospital terciário de Rio Branco. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica de Medicina de São Paulo**, v. 9, n. 5, p. 338–342, 2011. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2011/v9n5/a2246>.
- SCHNEIDER, A. G. et al. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2018.
- SCHREIER, S. et al. Development of a magnetic bead fluorescence microscopy immunoassay to detect and quantify *Leptospira* in environmental water samples. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, 2012.
- SILVA, É. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277–6286, 2007.
- SLACK, A. T. et al. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in

- Malaysia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 705–708, 2009.
- SMITH, C. E. G. et al. The Effect of pH on the Survival of Leptospire in Water *. **Bulletin of the World Health Organisation**, v. 24, n. R 39090, p. 35–43, 1961.
- SMITH, D. J. W.; SELF, H. R. M. Observations on the survival of leptospira Australis a in soil and water. **Journal of Hygiene**, v. 53, n. 4, p. 436–444, 1955.
- SMYTHE, L. D. et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 1–7, 2002.
- SOARES, T. S. M. et al. Análise espacial e sazonal da leptospirose no município de São Paulo , SP , 1998 a 2006. Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo , Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 2, p. 283–291, 2010.
- SONADA, R. B. et al. Efficacy of leptospiral commercial vaccines on the protection against an autochthonous strain recovered in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 347–350, 2018.
- TANSUPHASIRI, U. et al. Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic Leptospira in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 37, n. 4, 2006.
- TASSINARI, W. de S. et al. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro , Brasil , ao longo dos anos de 1996-1999. Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro , Brazil , 1996-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 1721–1729, 2004.
- THIBEAUX, R. et al. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2017.
- THIBEAUX, R. et al. Biodiversity of Environmental Leptospira: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. May, p. 816, 2018. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00816/full>.
- TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2004.
- TUCUNDUVA DE FARIA, M. et al. Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental Leptospira Infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 231–238, 2007.
- VIAU, J. E.; BOEHM, B. A. Quantitative PCR-based detection of pathogenic Leptospira in Hawai ' ian coastal streams. **Water and Health**, v. 09, n. 4, p. 637–646, 2011.
- VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007270>.
- VINETZ, J. M. et al. Sporadic Urban Leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n. 10, p. 794–798, 1996.
- VINOD KUMAR, K. et al. Coexistence and survival of pathogenic leptospire by formation of biofilm with Azospirillum. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 6, 2015.
- WILSON, P. R. et al. Observations of leptospirosis in farmed deer. **New Zealand Veterinary**

Journal, v. 46, n. 4, p. 131–139, 1998.

WOO, T. H. S. et al. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 7–18, 1997.

YASUDA, P. H. et al. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species.

International Journal of Systematic Bacteriology, v. 37, n. 4, p. 407–415, 1987.

APÊNDICE

Durante o período de meu doutorado colaborei em outros seis trabalhos, nos quais sou co-autora, seguem abaixo:

A survey of zoonotic pathogens carried by house mouse and black rat populations in Yucatan, Mexico

J. A. PANTI-MAY^{1*}, R. R. C. DE ANDRADE², Y. GURUBEL-GONZÁLEZ³,
E. PALOMO-ARJONA³, L. SODÁ-TAMAYO³, J. MEZA-SULÚ³, M. RAMÍREZ-SIERRA⁴,
E. DUMONTEIL^{4,5}, V. M. VIDAL-MARTÍNEZ⁶, C. MACHAÍN-WILLIAMS⁷,
D. DE OLIVEIRA², M. G. REIS², M. A. TORRES-CASTRO⁸, M. R. ROBLES⁹,
S. F. HERNÁNDEZ-BETANCOURT³ AND F. COSTA^{2,10}

¹ Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Mexico

² Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brasil

³ Departamento de Zoología, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Mexico

⁴ Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi', Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Mexico

⁵ Department of Tropical Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Tulane University, New Orleans, LA, USA

⁶ Laboratorio de Patología Acuática, Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Merida, Merida, Mexico

⁷ Laboratorio de Arbovirología, Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi', Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Mexico

⁸ Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Re-emergentes, Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi', Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Mexico

⁹ Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CONICET-Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

¹⁰ Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

Received 22 November 2016; Final revision 15 May 2017; Accepted 7 June 2017

SUMMARY

The house mouse (*Mus musculus*) and the black rat (*Rattus rattus*) are reservoir hosts for zoonotic pathogens, several of which cause neglected tropical diseases (NTDs). Studies of the prevalence of these NTD-causing zoonotic pathogens, in house mice and black rats from tropical residential areas are scarce. Three hundred and two house mice and 161 black rats were trapped in 2013 from two urban neighbourhoods and a rural village in Yucatan, Mexico, and subsequently tested for *Trypanosoma cruzi*, *Hymenolepis diminuta* and *Leptospira interrogans*. Using the polymerase chain reaction we detected *T. cruzi* DNA in the hearts of 4.9% (8/165) and 6.2% (7/113) of house mice and black rats, respectively. We applied the sedimentation technique to detect eggs of *H. diminuta* in 0.5% (1/182) and 14.2% (15/106) of house mice and black rats, respectively. Through the immunofluorescent imprint method, *L. interrogans* was identified in 0.9% (1/106) of rat kidney impressions. Our results suggest that the black rat could be an important reservoir for *T. cruzi* and *H. diminuta* in the studied sites. Further studies examining seasonal and geographical patterns could increase our knowledge on the epidemiology of these pathogens in Mexico and the risk to public health posed by rodents.

* Author for correspondence: J. A. Panti-May, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Mexico.
(Email: panti.alonso@gmail.com)

Research Article

Cite this article: Carvalho-Pereira T *et al.* The helminth community of a population of *Rattus norvegicus* from an urban Brazilian slum and the threat of zoonotic diseases. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0031182017001755>

Received: 11 May 2017

Revised: 11 August 2017

Accepted: 4 September 2017

Key words:

Rattus norvegicus; helminth community; slum settlements; human pathogens; *Angiostrongylus cantonensis*; risk factors; spillover risk; urban

Author for correspondence:

Ticiana Carvalho-Pereira, E-mail: carvalhopereira.tsa@hotmail.com

The helminth community of a population of *Rattus norvegicus* from an urban Brazilian slum and the threat of zoonotic diseases

Ticiana Carvalho-Pereira^{1,2}, Fábio N. Souza², Luana R. N. Santos², Ruth Walker², Arsinoê C. Pertile², **Daiana S. de Oliveira²**, Gabriel G. Pedra³, Amanda Minter³, Maria Gorete Rodrigues⁴, Thiago C. Bahiense¹, Mitermayer G. Reis^{1,2,5}, Peter J. Diggle⁶, Albert I. Ko⁵, James E. Childs⁵, Eduardo M. da Silva¹, Mike Begon³ and Federico Costa^{1,2,3,5}

¹Federal University of Bahia, UFBA, Salvador, Brazil; ²Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil; ³Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK; ⁴Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil; ⁵Department of Epidemiology of Microbial Disease, Yale School of Public Health, New Haven, USA and ⁶Lancaster Medical School, Lancaster University, Lancaster, UK

Abstract

Urban slums provide suitable conditions for infestation by rats, which harbour and shed a wide diversity of zoonotic pathogens including helminths. We aimed to identify risk factors associated with the probability and intensity of infection of helminths of the digestive tract in an urban slum population of *Rattus norvegicus*. Among 299 rats, eleven species/groups of helminths were identified, of which *Strongyloides* sp., *Nippostrongylus brasiliensis* and the human pathogen, *Angiostrongylus cantonensis* were the most frequent (97, 41 and 39%, respectively). Sex interactions highlighted behavioural differences between males and females, as eg males were more likely to be infected with *N. brasiliensis* where rat signs were present, and males presented more intense infections of *Strongyloides* sp. Moreover, rats in poor body condition had higher intensities of *N. brasiliensis*. We describe a high global richness of parasites in *R. norvegicus*, including five species known to cause disease in humans. Among these, *A. cantonensis* was found in high prevalence and it was ubiquitous in the study area – knowledge which is of public health importance. A variety of environmental, demographic and body condition variables were associated with helminth species infection of rats, suggesting a comparable variety of risk factors for humans.

Introduction

Economic development has led to an increase in urbanization, as people migrate from rural areas in search of job and education opportunities (UN-Habitat, 2016). In many developing countries, this has, in turn, led to an increase in urban poverty, reflected in poor housing, infrastructural support, and social and health services – characteristics that define slum settlements (UN, 2003; Ooi and Phua, 2007). Although there have been initiatives to reduce poverty, such as the strategies undertaken in pursuit of the Millennium Development Goals, the number of slum residents increased by 28% from 1990 to 2014 (from 689 to 881 million) (UN, 2005; UN-Habitat, 2016).

The conditions imposed on urban slum residents, such as lack of adequate sanitation and garbage collection, provide resource-rich environments supporting large populations of rats (Riley *et al.* 2007; Costa *et al.* 2014a). The Norway rat, *Rattus norvegicus* Berkenhout (1769), has been the most successful invasive mammalian species, exhibiting tolerance to a wide range of temperatures, a high reproductive rate and adaptability to rural and urban environmental modification (Long, 2003; Vadell *et al.* 2014; Panti-May *et al.* 2016; Puckett *et al.* 2016). This species has been associated with economic losses due to its eclectic diet, contamination of food stores with feces and urine, and infrastructure damage inflicted through gnawing and burrowing (Childs *et al.* 1998; Singleton *et al.* 2003; Almeida *et al.* 2013). Additionally, *R. norvegicus* is a host for several agents that can infect humans (Webster and Macdonald, 1995; Ko *et al.* 1999; de Faria *et al.* 2008; Costa *et al.* 2014b) including the bacteria *Leptospira* (primarily of the Icterohaemorrhagiae serogroup). These pathogens impart a large burden of disease in human populations, with leptospirosis being by far the most important with an estimated 1 000 000 annual human cases and 60 000 deaths (Costa *et al.* 2015a). Norway rats are also reservoir hosts of several helminths that cause disease in humans (Rafique *et al.* 2009; Hancke *et al.* 2011; Walker *et al.* 2017). For example, the cestode *Hymenolepis nana* is associated with diarrhoea cases, whereas the nematode *Angiostrongylus cantonensis* can cause eosinophilic meningitis (EoM) (Alicata, 1965; Schantz, 1996; Alruzug *et al.* 2016).

Notwithstanding the importance of the descriptive work in characterizing helminth communities of *R. norvegicus* (Gómez Villafañe *et al.* 2008; Kataranovski *et al.* 2010; Hancke *et al.*

RESEARCH

EPIDEMIOLOGY

Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region

Isabel Rodriguez-Barraquer^{1*}, Federico Costa^{2,3,4*}, Eduardo J. M. Nascimento^{5*}, Nivison Nery Júnior^{2,3}, Priscila M. S. Castanha^{6,7}, Gielson Almeida Sacramento³, Jaqueline Cruz³, Mayara Carvalho³, **Diana De Olivera³**, José E. Hagan^{3,4}, Haritha Adhikarla⁴, Elcio A. Wunder Jr.^{3,4}, Danilo F. Coêlho^{6,8}, Sasha R. Azar⁹, Shannan L. Rossi¹⁰, Nikos Vasilakis¹¹, Scott C. Weaver¹⁰, Guilherme S. Ribeiro^{2,3,12}, Angel Balmaseda^{13,14}, Eva Harris¹⁵, Maurício L. Nogueira¹⁶, Mitermayer G. Reis^{3,4,12}, Ernesto T. A. Marques^{5,6,17*}, Derek A. T. Cummings^{18,19*†}, Albert I. Ko^{3,4*†}

The clinical outcomes associated with Zika virus (ZIKV) in the Americas have been well documented, but other aspects of the pandemic, such as attack rates and risk factors, are poorly understood. We prospectively followed a cohort of 1453 urban residents in Salvador, Brazil, and, using an assay that measured immunoglobulin G3 (IgG3) responses against ZIKV NS1 antigen, we estimated that 73% of individuals were infected during the 2015 outbreak. Attack rates were spatially heterogeneous, varying by a factor of 3 within a community spanning 0.17 square kilometers. Preexisting high antibody titers to dengue virus were associated with reduced risk of ZIKV infection and symptoms. The landscape of ZIKV immunity that now exists may affect the risk for future transmission.

There are many uncertainties about the dynamics of Zika virus (ZIKV) outbreaks in large, immunologically naive populations. There is also continued uncertainty surrounding the circumstances that allowed ZIKV to emerge in American populations and the future of ZIKV transmission in the Americas and elsewhere (1). The association between ZIKV infection and microcephaly cases makes it important to determine whether future cases can be expected or whether immunity levels in a population are likely to prevent major future transmission. These uncertainties underscore the need to characterize infection rates of the 2015–2016 epidemic (1, 2).

One key unanswered question is the role of preexisting immunity to dengue virus (DENV), an endemic pathogen that is genetically and antigenically similar to ZIKV and has been hypothesized to both promote (3) and suppress ZIKV emergence (4). Numerous in vitro studies have shown enhanced ZIKV infection in the presence of DENV antibodies, but results from in vivo studies have been less clear (3, 5–8). Immunity

to DENV has been shown experimentally to neutralize and protect against ZIKV infection (9–11) and may therefore reduce the probability of successful establishment of ZIKV in a DENV-immune population (12). Yet to date, the influence of preexisting DENV immunity on susceptibility or resistance to ZIKV infection has not been rigorously evaluated in human populations.

Ideally, to characterize the interactions between ZIKV and DENV requires prospectively monitoring individuals of different DENV serostatus and measuring any ZIKV infection. However, a large proportion of ZIKV and DENV infections are asymptomatic, and symptomatic infections have a nonspecific clinical presentation, making diagnosis challenging. Therefore, infection rates in populations can only be accurately quantified using serological measures. At present, there is a lack of commercially available serological tests that can measure antibody responses to DENV and ZIKV with sufficient sensitivity and specificity because of cross-reactivity between the two related viruses (13–16). These limitations have hampered efforts to quantify

the extent of the American epidemic and evaluate interactions between DENV and ZIKV.

High ZIKV attack rates in an urban population

We had the opportunity to prospectively characterize the dynamics of ZIKV transmission in Pau da Lima, a community in the city of Salvador, where we have been conducting long-term cohort investigations of urban slum health problems (17–19). Northeast Brazil has been known to be hyperendemic for DENV for more than 30 years. It was also the epicenter of the 2015 Zika epidemic (20–22). Multiple rounds of sample collection occurred in our cohort since 2013, before and after the majority of clinical Zika cases were detected in this community and the city (23). Here, we quantified the attack rate of ZIKV during the 2015 outbreak using data from 1453 individuals in this cohort (Fig. 1 and tables S1 and S2). In a subset of 642 individuals for whom dengue immunity data were available (table S1), we investigated the impact of prior DENV immunity on the risk of ZIKV. Figure 2 shows the timing of sample collection before and after the period of the Zika outbreak.

We identified ZIKV infections with an assay that measures immunoglobulin G3 (IgG3) responses to the ZIKV NS1 protein (anti-ZIKV NS1 IgG3). The sensitivity and specificity of the assay were estimated to be 85% and 97%, respectively, by testing a random subset of samples using plaque-reduction neutralization tests (PRNTs) (Fig. 2). We performed additional validation of this assay to ensure that cross-reactivity did not bias our inferences, using samples from before and after ZIKV emergence in the study population (Fig. 2) as well as external validation using patient samples from polymerase chain reaction-confirmed infections from multiple locations (figs. S2 and S3 and table S3).

Samples collected in October 2014 and March 2015, prior to the epidemic in Salvador (fig. S1), were mostly seronegative by the anti-ZIKV NS1 IgG3 assay [October 2014: 7% seropositive; 95% confidence interval (CI), 4 to 10%; $n = 249$; March 2015: 8%; 95% CI, 6 to 10%; $n = 675$], as well as by PRNT [1% seropositive (95% CI, 0 to 4%), $n = 101$], suggesting little or no transmission before this date. In contrast, 63% (95% CI, 60 to 65%; $n = 1453$) of samples collected in October 2015, 5 months after recognized clinical cases peaked, were positive, indicating infection of the majority of individuals in the cohort (Fig. 3A). Adjusting for the sensitivity and specificity of the IgG3 assay

¹Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA, USA. ²Instituto da Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. ³Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/MS, Salvador, Bahia, Brazil. ⁴Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, CT, USA. ⁵Department of Infectious Disease and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. ⁶Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz/MS, Recife, Pernambuco, Brazil. ⁷Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. ⁸Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50740-540, Brazil. ⁹Institute for Translational Science, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA. ¹⁰Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA. ¹¹Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA. ¹²Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. ¹³Sustainable Sciences Institute, Managua, Nicaragua. ¹⁴Laboratório Nacional de Virologia, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Ministry of Health, Managua, Nicaragua. ¹⁵Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, CA, USA. ¹⁶Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ¹⁷Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. ¹⁸Department of Biology, University of Florida, Gainesville, FL, USA. ¹⁹Emerging Pathogens Institute, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: albert.ko@yale.edu (A.I.K.); datt@ufl.edu (D.A.T.C.)

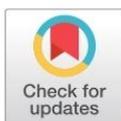
RESEARCH ARTICLE

Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse

Daniela Santos Almeida¹, Lucas Nogueira Paz¹, **Daiana Santos de Oliveira²**, Danielle Nascimento Silva¹, Paula Ristow³, Camila Hamond⁴, Federico Costa⁵, Ricardo Wagner Portela⁶, Alessandra Estrela-Lima¹, Melissa Hanzen Pinna^{1*}

1 Post Graduate Program in Animal Science in the Tropics—Federal University of Bahia., Salvador, Bahia, Brazil, **2** Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, Brazil, **3** Laboratory of Bacteriology and Health, Institute of Biology, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **4** Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, **5** Instituto de Saude Coletiva, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, **6** Instituto de Ciências da Saúde, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

* melissahp@ufba.br



OPEN ACCESS

Citation: Almeida DS, Paz LN, de Oliveira DS, Silva DN, Ristow P, Hamond C, et al. (2019) Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. PLoS ONE 14(5): e0217391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217391>

Editor: Kalimuthusamy Natarajaseenivasan, Bharathidasan University, INDIA

Received: August 14, 2018

Accepted: May 11, 2019

Published: May 23, 2019

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by the Foundation for Research Support of the State of Bahia, Brazil (<http://www.fapesb.ba.gov.br/>), Public Notice no. 025/2010 under Term of Grant PPP 0034/2011, coordinated by Melissa Hanzen Pinna. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The study aimed to evaluate the histopathological characteristics of renal lesions in chronically infected sheep and with low titers of anti-*Leptospira* antibodies from a slaughterhouse. In the serological analysis, 24.74% (48/194) presented seroreactivity with a titer equal to or greater than 100. Among these seroreactive sheep, titers of 100 were predominant (58.33%, 28/48), with the highest titer being 1,600 (2.08%, 1/48). Serogroup Sejroe (sv. Hardjo) was the most frequent at 35.42% (17/48). Leptospiral DNA was verified in 4.12% (8/194) of the kidney samples tested, and no urine sample was positive. All the samples corresponded to the pathogenic species *L. interrogans*. The eight amplicons with 202-nucleotides were identical with two mismatches (presented 100% of identity) using the PCR targeting to *secY* gene. Histological sections of PCR-positive kidneys were submitted to direct detection by the anti-LipL32 immunohistochemistry (IHC) technique. The *Leptospira* spp. antigen was evident in 62.5% (5/8) of the kidneys. Positive staining was observed in the cytoplasm of tubular cells and in the form of brownish aggregates that adhered to tubular epithelial cells and projected into the lumen. Inflammatory lymphoplasmacytic infiltrate, ranging from mild to moderate, with multifocal distribution, was the predominant finding in seroreactive animals (33.33%, 16/48). The demonstration of the leptospiral antigen lining the renal tubules through IHC of naturally infected sheep confirmed by PCR characterizes renal colonization in a species with the presence of histological changes compatible with leptospirosis.

Introduction

Leptospire live in the wild in mammalian reservoirs, which are chronically infected in the kidneys and eliminate the bacteria in the urine, polluting the environment [1]. Rodents are

Leptospira yasudae sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources

Arnau Casanovas-Massana,^{1,*} Camila Hamond,^{1†} Luciane A. Santos,² Daiana de Oliveira,² Kathryn P. Hacker,^{1,2}
Ilana Balassiano,³ Federico Costa,^{1,2,4} Marco A. Medeiros,⁵ Mitermayer G. Reis,² Albert I. Ko^{1,2} and Elsie A. Wunder^{1,2}

Abstract

Four spirochetes (F1^T, B21, Yale^T and AMB6-RJ) were isolated from environmental sources: F1^T and B21 from soils of an urban slum community in Salvador (Brazil), Yale^T from river water in New Haven, Connecticut (USA) and AMB6-RJ from a pond in a horse farm in Rio de Janeiro (Brazil). Isolates were helix-shaped, aerobic, highly motile and non-virulent in a hamster model of infection. Draft genomes of the strains were obtained and analysed to determine the relatedness to other species of the genus *Leptospira*. The analysis of 498 core genes showed that strains F1^T/B21 and Yale^T/AMB6-RJ formed two distinct phylogenetic clades within the 'Pathogens' group (group I). The average nucleotide identity (ANI) values of strains F1^T/B21 and Yale^T/AMB6-RJ to other previously described *Leptospira* species were below <84% and <82%, respectively, which confirmed that these isolates should be classified as representatives of two novel species. Therefore, we propose *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov. as new species in the genus *Leptospira*. The type strains are F1^T (=ATCC-TSD-163=KIT0259=CLEP00287) and Yale^T (=ATCC-TDS-162=KIT0258=CLEP00288), respectively.

Leptospirosis is a globally distributed zoonotic disease that has its highest burden among vulnerable populations in both rural and urban slum environments in tropical developing countries [1, 2]. Leptospirosis is caused by spirochetes belonging to the genus *Leptospira*. This genus is divided into three distinct phylogenetic groups [3, 4]: group I or 'Pathogens' that contain virulent strains able to cause severe disease in humans and animals; group II or 'Intermediates' with species that can cause disease in certain circumstances; and group III or 'Saprophytes' which are free-living environmental micro-organisms not known to cause disease.

Recent studies by Thibeaux *et al.* have reported the isolation of 12 novel *Leptospira* species in soils from New Caledonia (French Polynesia) [5, 6]. Currently, the genus *Leptospira* comprises 35 different species: 13 belonging to group I 'Pathogens' (*Leptospira adleri*, *Leptospira alexanderi*, *Leptospira alstonii*, *Leptospira barantonii*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira ellisii*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira*

kirschneri, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira mayottensis*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai* and *Leptospira weilii*), 11 to group II 'Intermediate' (*Leptospira broomii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira haakeii*, *Leptospira hartskeerlii*, *Leptospira inadai*, *Leptospira licerasiae*, *Leptospira perolatii*, *Leptospira neocaledonica*, *Leptospira saintgironisae*, *Leptospira venezuelensis* and *Leptospira wolffii*), and 11 to group III 'Saprophytes' (*Leptospira biflexa*, *Leptospira brenneri*, *Leptospira harrisae*, *Leptospira idonei*, *Leptospira levettii*, *Leptospira maccolloughii*, *Leptospira meyeri*, *Leptospira terpstrae*, *Leptospira vanthiellii*, *Leptospira wolbachii* and *Leptospira yanagawae*). A recent study identified 30 new species from environmental sources in France, Algeria, Japan, Malaysia, Mayotte and New Caledonia, including pathogenic species similar to the isolates described here, revealing a massive diversity within genus *Leptospira* [7]. Here, we report the description of two novel pathogenic species of the genus

Author affiliations: ¹Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public Health, Yale University, New Haven, CT, USA; ²Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Bahia, Brazil; ³Centro de Referência Nacional para Leptospirose/Coleção de *Leptospira*, Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Instituto da Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; ⁵Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence: Arnau Casanovas-Massana, arnau.casanovas@yale.edu

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis; pathogenic; whole-genome sequencing; soil; water.

Abbreviations: ANI, averagenucleotide identity; EMJH, Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris; STAFF, sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomicin and 5-fluorouracil.

†Present address: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay and Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI), Institut Pasteur de Montevideo/Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Montevideo, Uruguay.

The GenBank/EMBL/DDJB accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of strains F1^T and Yale^T are MK070913 and MK070914 respectively, and the genome sequence accession numbers are QHCU00000000 and QHCT00000000, respectively.

Influence of Rainfall on *Leptospira* Infection and Disease in a Tropical Urban Setting, Brazil

Kathryn P. Hacker,¹ Gielson A. Sacramento,¹ Jaqueline S. Cruz, Daiana de Oliveira, Nivison Nery, Jr., Janet C. Lindow, Mayara Carvalho, Jose Hagan, Peter J. Diggle, Mike Begon, Mitermayer G. Reis, Elsie A. Wunder, Jr., Albert I. Ko,¹ Federico Costa¹

The incidence of hospitalized leptospirosis patients was positively associated with increased precipitation in Salvador, Brazil. However, *Leptospira* infection risk among a cohort of city residents was inversely associated with rainfall. These findings indicate that, although heavy rainfall may increase severe illness, *Leptospira* exposures can occur year-round.

Leptospirosis, a leading zoonotic cause of illness and death (1), has emerged as a major health problem due to the global expansion of urban slum communities (2–4). The disease is associated with severe manifestations such as Weil’s disease and pulmonary hemorrhage syndrome (5), for which case-fatality rates are 10%–50% or even higher (6). Transmission to slum residents occurs in the peridomestic environment, in which exposures to sewers, floodwater, and contaminated soil are risk factors (3,7,8). Extreme weather events may precipitate outbreaks (3–6), as recently experienced during the aftermath of Hurricane Maria in Puerto Rico (9). Similarly, seasonal periods of heavy rainfall and flooding are a contributing factor to the risk for urban leptospirosis (4,10).

In urban slum settings, contact with rats and *Leptospira*-contaminated water and soil occur year-round (3). Prior studies have shown, consistently, positive

associations between heavy rainfall and hospitalized leptospirosis case-patients (4,10). However, this relationship may be affected by differences in case definitions used by diverse surveillance systems. In the few prospective cohort studies available, estimates of severe disease accounted for only a small proportion of the total disease burden (6). Thus, little is known about the role of rainfall in overall infection rates. To characterize the seasonal pattern of leptospirosis and *Leptospira* infection in a tropical urban setting and evaluate the influence of meteorological factors on seasonal risk, we conducted a prospective investigation of *Leptospira* infection rates among slum residents while actively surveying for hospitalized leptospirosis case-patients within Salvador, Brazil, during seasonal periods of high and low rainfall.

The Study

During February 2013–April 2015, we identified patients >5 years old with suspected leptospirosis at the state infectious disease hospital in Salvador, Brazil (4,5), and those reported in the public health surveillance database by other hospitals in Salvador. We estimated the probable date of infection as 15 days before the hospital admission date. We evaluated suspected leptospirosis cases according to the WHO case definition standard (4,6,11) using the microscopic agglutination test (MAT), lipL32 real-time PCR assay (11), IgM-ELISA (6), or a combination. We defined laboratory-confirmed cases of leptospirosis as those with >4-fold rise in MAT titers in paired serum samples, MAT titers >1:800 in a single sample, or positive PCR (Appendix Tables 1, 2, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/26/2/19-0102-App1.pdf>).

A linear regression model identified that cumulative monthly rainfall (Figure 1, panel A) was significantly associated with the monthly number

Author affiliations: University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA (K.P. Hacker); Yale University, New Haven, Connecticut, USA (K.P. Hacker, J.C. Lindow, J. Hagan, E.A. Wunder, Jr., A.I. Ko, F. Costa); Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil (G.A. Sacramento, J.S. Cruz, D. de Oliveira, N. Nery, Jr., J.C. Lindow, M. Carvalho, J. Hagan, M.G. Reis, A.I. Ko, F. Costa); Montana State University Bozeman, Bozeman, Montana, USA (J.C. Lindow); Lancaster University, Lancaster, UK (P.J. Diggle); Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA (P.J. Diggle); University of Liverpool, Liverpool, UK (M. Begon); Universidade Federal da Bahia, Salvador (M.G. Reis, F. Costa)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2602.190102>

¹These authors contributed equally to this article.