



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NIARA VANAT

**PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *LEPTOSPIRA* SPP
EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E
DOADORES DE SANGUE**

Londrina
2012

NIARA VANAT

**PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *LEPTOSPIRA* SPP
EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E
DOADORES DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina – UEL para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.
Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

V217p Vanat, Niara.
Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp em pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue / Niara Vanat. – Londrina, 2012.
55 f.: il.

Orientador: Julio Cesar de Freitas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012.

Inclui bibliografia.

1. *Leptospira* – Teses. 2. Leptospirose – Fatores de risco – Teses. 3. Doenças transmissíveis – Epidemiologia – Teses. 4. Zoonoses – Teses. I. Freitas, Julio Cesar de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 616.986.7

NIARA VANAT

**PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *LEPTOSPIRA* SPP EM
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E DOADORES
DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina – UEL para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. orientador Dr. Julio Cesar de Freitas
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia
UEL – Londrina – PR

Londrina, 17 de fevereiro de 2012.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, no Setor de nefrologia do Hospital Universitário e Hospital de Clínicas – UEL e no Hemocentro Regional de Londrina-UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto à agência e órgão de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

1.PROPPG: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação.

2.CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/MEC.

3.SETI/UGF: Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior/ Unidade Gestora do Fundo Paraná.

Dedico este trabalho aos meus pais
Rosecler e Paulo, ao meu marido
Arthur e ao meu irmão Niran. E a
todos aqueles que fizeram, fazem e
farão parte da minha vida. Pelo
eterno aprendizado.....

AGRADECIMENTOS

A Deus por me presentear com a vida.

Aos meus pais por me proporcionarem uma vida digna com grandes valores, humildade, dedicação, honestidade, amor incondicional ao próximo, união, dentre muitos outros. E por me ensinarem que a FAMÍLIA é uma das maiores riquezas que podemos ter.

Ao meu marido pela força em muitos momentos difíceis, carinho, companheirismo e paciência. Sempre unidos pelo coração aprendemos a enfrentar a distância pois acreditamos no nosso AMOR.

Ao meu irmão pela alegria e pelo carinho.

À minha família e amigos pelas experiências de vida. Apesar das diferenças sempre encontro em vocês exemplos a seguir.

Àqueles amigos que passaram a fazer parte da família e são muitos queridos e especiais.

À minha colega de república, Francine Maria França que me fez voltar a acreditar que é possível conviver em PAZ. Queria ter te conhecido antes!

Às minhas colegas de UEL, Thais Neris Medeiros, Priscilla Fajardo, Cristiane com quem dividi experiências e muitas risadas. Obrigada pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas por me dar a oportunidade de lutar por um grande sonho. Obrigada pela paciência, dedicação, sinceridade e por entender as minhas dificuldades e limitações.

À professora Dra. Roberta Lemos Freire pela paciência de ensinar o que para mim, é difícil de entender.

Às professoras Dra. Alice Alfieri e Dra. Mara Regina Stipp Balarin pelas valiosas sugestões na banca de qualificação.

Ao professor Dr. João Luis Garcia que me ajudou em um momento imprescindível.

Ao Dr. Waldir Garcia que acreditou no meu trabalho e ajudou a torná-lo possível. Obrigada pela atenção e colaboração dedicada a realização desse trabalho.

Aos médicos do setor de nefrologia Dr. Abel, Dr. Luiz Fernando e Dr. Vinícius, aos internos do último ano de Medicina em 2010 e 2011 e aos alunos Thaisa e Flavio, pela colaboração durante realização deste projeto.

À Dra. Mariza Saito por autorizar a realização deste projeto no Hemocentro Regional de Londrina. E a sua equipe de enfermeiros com quem dividi muitos momentos. Obrigada pela atenção e pelo carinho.

Ao Prof. Jair, do laboratório de bioquímica, que disponibilizou o resgate de amostras. E aos funcionários do laboratório, em especial ao funcionário Ademir.

À Profa. Helena, do laboratório de imunologia e radioimuno, também por ter disponibilizado o resgate de amostras. E aos funcionários do laboratório.

A todo o pessoal (professores, enfermeiros, funcionários, médicos, internos, residentes e alunos) do hemocentro, Hospital Universitário e Hospital de Clínicas – UEL, de quem precisei em algum momento, mesmo que suscito.

Aos pacientes com insuficiência renal crônica e aos doadores de sangue, sem vocês esse trabalho não seria possível. Em especial ao doador de sangue Francisco Severiano de Menezes, pela colaboração.

Ao pessoal do laboratório de leptospirose Vanessa, Cristiane, Lucimara, Roberta e Jean que dividiram sua experiência no laboratório e proporcionaram a condição de aprender, o que foi fundamental para a realização do projeto.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária- UEL, Profa. Mara e Profa Karina, funcionários (João, Zé Roberto, Inês, Elza), residentes (Gislaine, Evandro e Maria Carla) e estagiários, vocês fizeram parte da minha história na Universidade Estadual de Londrina – UEL, jamais esquecerei.

Aos meus colegas do Hospital Veterinário e do Departamento de Medicina Veterinária preventiva pelas conversas de corredor, pelo carinho, pela ajuda e pela convivência.

Obrigada a todos que fizeram, fazem e farão parte da minha caminhada! Pois cada ser humano é um enigma que faz a experiência de vida ser mais fascinante.

O dom de ser feliz está na capacidade individual de se apaixonar a cada amanhecer por mais um dia.

VANAT, Niara. **Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp em pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue.** 2012. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração Sanidade Animal). – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A leptospirose é causada por uma espiroqueta da família *Spirochaetaceae* do gênero *Leptospira*, classificada de duas maneiras: sorológica e genotípica. A doença ocorre em todo o mundo, sendo considerada emergente em alguns países e com risco potencial à saúde pública e veterinária. A transmissão para o homem ocorre direta ou indiretamente por diferentes espécies de mamíferos como: roedores, bovinos, suínos, caninos e animais silvestres. A sintomatologia da doença pode variar de quadros menos graves, como um resfriado, até os mais graves com falência renal e hepática. Em muitos casos a leptospirose humana leva a uma insuficiência renal aguda (IRA) e em casos raros a IRA progride para uma insuficiência renal crônica (IRC). Como a incidência da leptospirose em humanos é subestimada, este estudo teve como objetivos determinar a prevalência de 179 pacientes com IRC e de 483 doadores de sangue com anticorpos contra *Leptospira* spp, determinar o sorovar mais provável e identificar variáveis associadas ao risco. Para detectar os anticorpos foi realizada a prova de soroglutinação microscópica com 22 sorovares de *Leptospira* de referência. Os resultados encontrados foram submetidos ao teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Dos 179 pacientes com IRC 12 (6.7%) foram reagentes na SAM e 483 doadores de sangue, sete (1.45%) foram reagentes. Dentre as amostras reagentes, 18 (94.75%) apresentaram anticorpos apenas contra um sorovar de *Leptospira* e em uma amostra (5.25%) não foi possível identificar o sorovar mais provável. Os sorovares Canicola, Hardjo, Pyrogenes, com títulos entre 100 e 400, foram encontrados com maior frequência. A presença de insuficiência renal crônica ($p= 0.001$), ter trabalhado em propriedade rural ($p= 0.004$), o baixo grau de escolaridade ($p= 0.001$), ou ter morado em propriedade rural ($p= 0.022$), ter acima de 50 anos de idade ($p= 0.014$), ser do sexo masculino ($p= 0.044$) e profissões com risco de exposição ($p= 0.01$), foram consideradas variáveis associadas à presença de anticorpos contra *Leptospira* spp.

Palavras-chave: Leptospirose. Homem. Sorovares. Variáveis. Rim.

VANAT, Niara. **Antibodies against *Leptospira* spp in patients with chronic renal failure and blood donors**. 2012. 55f. Dissertation (Master in Animal Science – Concentration area in Animal Sanitary) – Center for Agricultural Sciences. State University of Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Leptospirosis is caused by spirochete *Leptospira* gender and *Spirochaetaceae* family, classified of two ways: serological and genotypic. The disease occurs worldwide and it is considered emerging in some countries offers potential risk to public health and veterinary medicine. Transmission to humans occurs directly or indirectly by different mammals species such as: rodents, cattle, pigs, dogs and wild animals. The disease symptoms varies from forms less severe, as a cold, to most severe renal failure and liver. In many cases human leptospirosis leads to acute renal failure (ARF) and in rare cases the ARF progress to chronic renal failure (CRF). The incidence of leptospirosis in humans is underestimated, so the objectives of this study were determined the prevalence of 179 patients with chronic renal failure and in 483 blood donors with antibodies against *Leptospira* spp, determine the most frequent serovar and identify variables of risk. To detect antibodies microscopic agglutination test (MAT) was performed with 22 reference *Leptospira* serovars. The epidemiological variables were obtained through questionnaire and the results submitted to univariate analysis. From the 179 patients with CRF, 12 (6.7%) were reactive in the MAT and from 483 blood donors, seven (1.45%) were reactive. Among the reagents samples, 18 (94.75%) had antibodies against one serotype of *Leptospira* and one sample (5.25%) was not possible to identify the most frequent serovar. The serovars Canicola, Hardjo, Pyrogenes with titers between 100 and 400, were found with more frequently. The presence of chronic renal failure ($p= 0.001$), low educational level ($p= 0.001$), have worked on farm ($p= 0.004$) or have lived in farm ($p= 0.022$), have over 50 years of age ($p= 0.014$), males ($p= 0.044$) and work in occupations with exposure risk ($p= 0.01$), were considered variables associated with the presence of antibodies against *Leptospira* spp.

Keywords: Leptospirosis. Man. Serovars. Variables. Kidney.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Sorovares mais prováveis e títulos de anticorpos detectados na prova de soroaglutinação microscópica, realizada com 22 sorovares de *Leptospira interrogans* em 179 amostras de sangue de pacientes com insuficiência renal crônica atendidos no Hospital Universitário e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e 483 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina-UEL, entre 2010 a outubro de 2011..... 33
- Tabela 2** – Resultado das variáveis associadas à leptospirose em pacientes com insuficiência renal crônica atendidos no Hospital Universitário e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina-UEL..... 34

SUMÁRIO

1 ARTIGO DE REVISÃO	13
A Leptospirose no Homem	13
Resumo	13
Abstract	14
Etiologia	15
Epidemiologia	15
Diagnóstico	19
Sinais Clínicos	20
Controle	21
Referências	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 – OBJETIVO GERAL	26
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	27
Pesquisa de anticorpos contra <i>Leptospira</i> spp em pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue	27
Resumo	27
Abstract	28
Introdução	29
Material e Métodos	30
Amostragem, local de coleta das amostras e da realização dos exames	30
Instrumento de Pesquisa	30
Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM)	31
Análise estatística	31
Ética	32
Resultados	32
Discussão	36
Referências	39

4 CONCLUSÃO	43
APÊNDICE	44
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	45
APÊNDICE B – Questionário Epidemiológico	47
ANEXO	50
ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	51
ANEXO B – Normas para Publicação – Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	52

1 ARTIGO DE REVISÃO

A Leptospirose no Homem

VANAT, Niara. **A leptospirose no homem**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal–Área de concentração Sanidade Animal. Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina, 2012.

Resumo: A leptospirose é causada por uma espiroqueta da família *Spirochaetaceae* do gênero *Leptospira*, classificada de duas maneiras: sorológica e genotípica. A doença ocorre mundialmente, sendo transmitida para o homem direta ou indiretamente por espécies de mamíferos. A soroprevalência na população humana depende do reservatório animal presente, dos sorovares que ele alberga, das condições ambientais, da ocupação e das práticas agropecuárias. A leptospirose pode ser diagnosticada por técnicas diretas ou indiretas, sendo de difícil isolamento em meios de cultura. O emprego da PCR no diagnóstico da leptospirose em amostras clínicas vem se desenvolvendo desde a década de 1990. Apesar da bibliografia que descreve a incidência da leptospirose em diversos países, a doença é considerada sub-diagnosticada, pois apresenta diferentes quadros clínicos que muitas vezes não são característicos. Dependendo do sorovar infectante os pacientes podem desenvolver desde formas menos graves a formas fatais. Em muitos casos a leptospirose humana leva a uma insuficiência renal aguda (IRA) que pode progredir para insuficiência renal crônica (IRC). Futuros estudos que englobem a geografia, clima e fenômenos ambientais associados à leptospirose humana e animal são importantes para que se possa verificar a ocorrência e as mudanças epidemiológicas dessa doença infecciosa emergente.

Palavras-chave: Leptospira. Human. Serovar. Epidemiology.

VANAT, Niara. **Leptospirosis in humans**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal–Área de concentração Sanidade Animal. Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina, 2012.

Abstract: Leptospirosis is caused by spirochete of *Leptospira* gender and *Spirochaetaceae* family, classified of two ways: serological and genotypic. The disease occurs all around the world and it is transmitted to humans directly or indirectly by mammals species. The seroprevalence in human populations depends of the animal reservoir present, the serovar carried with it, environmental conditions, occupation, and farming practices. Leptospirosis can be diagnosed by direct or indirect techniques and the isolation in culture media is difficult. The PCR for diagnosis of leptospirosis in clinical samples has been used since 1990s. Although the literature describing the incidence of leptospirosis in many countries, the diseases is considered underdiagnosed, because it has different clinical features that often are not characteristic. Depending on the serovar infecting patients may develop from less severe forms to fatal forms. In many cases human leptospirosis leads to acute renal failure (ARF) that can evolve to chronic renal failure (CRF). Future studies covering the geography, climate and environmental phenomena associated with human and animal leptospirosis, are important to verify the occurrence and epidemiological changes of this emerging infectious disease.

Keywords: Leptospirosis. Man. Risk factors. Epidemiology.

Etiologia

A leptospirose é causada por uma espiroqueta da família *Spirochaetaceae* gênero *Leptospira* (FAINE, 1998; CARTER; WISE, 2004) e é considerada uma zoonose de ocorrência mundial, com exceção da Antártica (ADLER; MOCTEZUMA 2010). Apresenta alta prevalência em países de clima tropical chuvoso, com pH do solo neutro ou alcalino (ACHA; SZYFRES, 2001; LEVETT, 2001) e ocorre em qualquer época do ano, mas em regiões de clima temperado os casos são mais frequentes nos meses quentes e em regiões de clima subtropical e tropical os casos ocorrem durante os períodos de chuva (FAINE, 1982).

Existem duas formas de classificação do gênero *Leptospira*; a classificação sorológica e a classificação genotípica (LEVETT, 2001), ambas reconhecem espécies patogênicas e saprófitas, mas não existe concordância entre a classificação das espécies nas duas formas, ou seja, um mesmo isolado pode pertencer a espécies totalmente distintas de acordo com o tipo de classificação (FERESU et al. 1999; BRENNER et al., 1999). Pela classificação sorológica existem duas espécies, a *Leptospira interrogans* (patogênica) com 250 sorovares e a *Leptospira biflexa* (não patogênica) com 45 sorovares (VIJAYACHARI et al., 2008) e pela classificação genotípica 6 espécies saprófitas e 13 patogênicas com 260 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Epidemiologia

Em alguns países a leptospirose é considerada uma doença emergente com risco a saúde pública e veterinária, principalmente pelo aumento dos casos em países desenvolvidos e subdesenvolvidos que estão associados a grandes catástrofes como enchentes e ciclones (BRANDLING-BENNETT; PINHEIRO, 1996; BHARTI et al., 2003; VIJAYACHARI et al., 2008; HARTSKEERI et al., 2011). Entretanto, poucos países têm um sistema de notificação eficiente, portanto a incidência precisa permanece incerta (HARTSKEERI et al., 2011). Estima-se que a anualmente a cada 0.02 a 1 em 100.000 habitantes é infectado em áreas de clima temperado e 10-100 a cada 100.000 em áreas de clima tropical úmido (PAVLI; MALTEZOU, 2008). Regiões altamente endêmicas podem apresentar uma incidência de 500 casos em 100.000 anualmente (PEREZ et al., 2011).

A transmissão para o homem ocorre direta ou indiretamente por diferentes espécies de mamíferos como roedores, bovinos, suínos, caninos e animais silvestres. A forma direta ocorre através do contato do homem com tecidos, secreções ou pela urina de animais

portadores para o novo hospedeiro (VIJAYACHARI et al., 2008) e a indireta através da contaminação do ambiente por urina (FAINE, 1994). A transmissão entre humanos é extremamente rara, mas pode acontecer por via congênita (FAINE et al., 1999; FAINE, 1998).

Como a fauna difere de acordo com a região existe uma variabilidade distinta de leptospiros albergadas em diferentes reservatórios que podem infectar o homem (VINETZ, 2001), portanto a soroprevalência na população depende do reservatório animal presente, dos sorovares que ele alberga, das condições ambientais, ocupação e práticas agropecuárias (BHARTI et al., 2003).

Os sorovares são mantidos na natureza por hospedeiros definitivos (de manutenção) ou acidentais e tanto animais domésticos como silvestres podem ser hospedeiros de manutenção (THIERMANN, 1984). Dentre esses animais os bovinos são considerados reservatórios do sorovar Hardjo; os ovinos dos sorovares Hardjo e Pomona; os suínos do sorovar Pomona, e os cães do sorovar Canicola (BARCELLOS et al., 2003; BHARTI et al., 2003; OLIVEIRA; NETO, 2004). Os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana de esgoto), *Rattus rattus* e *Mus musculus* também são reservatórios de alguns sorovares de leptospiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Segundo Athanzio et al. (2008) as espécies do gênero *Rattus* são importantes reservatórios dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni e espécies do gênero *Mus* dos sorovares Ballum, Arborea e Bim.

Hartskeeri et al. (2011) relataram que os sorovares estão em constante adaptação a novos hospedeiros que podem albergar vários sorovares distintos. Castro et al. (2011) demonstraram a ocorrência do sorovar Autumnalis em cães e humanos e consideraram que as espécies tiveram a mesma fonte de infecção ou o cão foi à fonte de infecção ao homem (CASTRO et al., 2011). Thornley et al. (2002) verificaram alta incidência da leptospirose em pessoas que trabalham no processamento de carne, fazendeiros e trabalhadores rurais e entre os profissionais que desenvolviam suas atividades ocupacionais em florestas. Repetti (2010) ao pesquisar os moradores da área rural do município de Jataizinho (PR), verificou uma prevalência de 12.07% de reagentes contra os sorovares de *Leptospira* spp, que foi associada ao contato com animais em diferentes práticas de manejo.

Problemas sócio-econômicos como a distribuição geográfica e social, fatores ocupacionais e culturais aumentam os riscos de infecção (FAINE et al., 1999). Nos centros urbanos os roedores (ratos e ratas) são importantes fontes de infecção ao homem, pois estão amplamente distribuídos (PAVLI; MALTEZOU, 2008; SPOHR, 2009). Faine et al. (1999) concluíram que morar em áreas rurais ou em regiões sujeitas a inundações são fatores

de risco importantes para a doença.

O ambiente rural está associado ao risco para a leptospirose, pois a implementação de práticas agropecuárias tem modificado a relação de equilíbrio entre a fauna e a flora ao longo dos anos, levando ao aumento da concentração de animais domésticos e silvestres (hospedeiros suscetíveis a leptospira) convivendo em um *habitat* comum, o que favorece a transmissão ao homem (KATZ et al., 2011). Segundo Faine et al. (1999) a leptospirose está associada a atividades ocupacionais, como: agricultura, pecuária, silvicultura, construção de estrada, magarefes, manipuladores de comida e animais, veterinária, inspetores pecuaristas, trabalhadores de esgoto e açougueiros; e atividades de recreação, como; nadar em rios, canoagem, piqueniques, camping, caça, caminhada em mata, entre outras.

No estado do Rio Grande do Sul (RS) a maioria (69%) dos casos de leptospirose são de pessoas provenientes de área rural, esta prevalência está associada às atividades em plantações de arroz (SILVA et al., 2009).

O aquecimento global e o aumento das chuvas contribuem para o aumento dos casos de leptospirose, pois as mudanças ambientais levam a migração de animais que são hospedeiros naturais, porém fatores políticos e econômicos que resultam em uma maior exposição do homem a doença também podem contribuir (HARTSKEERI, et al. 2011).

No Hawaii (USA), Katz et al. (2011) ao estudarem casos que ocorreram entre 1999-2008, verificaram uma mudança sazonal (verão para inverno) na incidência da doença e do sorogrupo infectante (*icterohemorrhagiae* para *australis*). Da mesma forma na Nova Zelândia também ocorreu uma inversão dos sorovar prevalente, houve uma diminuição da incidência por *L. borgpetersenii* sv. hardjo e *L. interrogans* sv. pomona e aumento pelo sorovar *L. borgpetersenii* sv. ballum (THORNLEY et al., 2002).

Na Alemanha entre os anos 1998 e 2003, Jansen et al. (2005) verificaram um aumento de 0,06 por 100.000 casos de leptospirose relacionados a exposição residencial, a ocupação e a atividades de lazer. Esses pesquisadores alertaram que as recentes mudanças nos padrões de transmissão da leptospirose, parcialmente causada por uma população de ratos em expansão e ao ressurgimento da leptospirose canina, pode facilitar a propagação da doença em países de clima temperado.

Segundo Bharti et al. (2003) a atividade ocupacional era considerada a principal variável relacionada ao risco de leptospirose ao homem, mas recentemente outras atividades estão sendo descritas. Atualmente a popularização das viagens internacionais principalmente para países tropicais como o Sudeste da Ásia e América Latina levou ao

aumento da ocorrência de leptospirose em países industrializados (PAPPAS et al., 2008; PAVLI; MALTEZOU, 2008). Geralmente estas viagens estão ligadas a atividades de lazer que oferecem risco de infecção (PAPPAS et al., 2008; PAVLI; MALTEZOU, 2008; HARTSKEERI et al., 2011).

Em 1998 ocorreu um dos maiores surtos de leptospirose nos EUA que demonstrou o risco ocupacional e recreacional em pessoas que praticavam atividades em coleções de água doce nos Estados Unidos principalmente após a estação de chuvas fortes. De 876 atletas que participaram de uma competição de triátlon no Lago de Springfield (Illinois), foram contactados 834 e desses: 98 (12%) relataram que não estavam se sentindo bem. Das 474 amostras obtidas 52 (11%) deram positivas para leptospirose. Residentes das proximidades também foram testados e 14 (6%) dos 248 testados foram positivos. Nesse surto a ingestão de água do lago foi considerado o principal fator de risco para a infecção (MORGAN et al., 2002). Segundo Haake et al. (2002), o tempo e o grau de imersão em água contaminada pode predispor a infecção, especialmente quando o homem apresenta machucados na pele ou expõe a conjuntiva.

Na Malásia Oriental em setembro de 2000 foi relatada a infecção por leptospirose em dois homens que participaram de atividades como: expedição em caverna, canoagem, mergulho, mountain bike e caminhada na mata na região (HAAKE et al., 2002).

Na Nicarágua, em pacientes com leptospirose com quadro de hemorragia pulmonar Trevejo et al. (1998) não encontrou correlação entre a doença e a presença de ratos em casa, andar pela lama ou morar em casa de chão batido, mas encontrou correlação com água contaminada.

Um estudo realizado em São Paulo (Brasil), com casos que foram reportados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre 1998 e 2006 demonstrou que a ocorrência de leptospirose na região não está ligada a atividades ocupacionais e sim ao contato com água contaminada durante os períodos de chuva e com fatores socioeconômicos, mostrando que a incidência da doença pode ser um importante indicador social (SOARES et al., 2010).

No Rio de Janeiro (Brasil) casos que foram reportados à Secretaria de Saúde entre 1997 e 2002, mostraram que a maioria dos doentes eram de regiões mais pobres. Houve uma correlação do número de casos com as estações de forte chuva, porém na análise estatística não houve associação ao fator socioeconômico ou a fatores ambientais (TASSINARI et al., 2008).

Diagnóstico

Métodos de diagnóstico direto e indireto são utilizados para o diagnóstico da leptospirose, nos métodos diretos o agente etiológico é visualizado em microscopia de campo escuro, em microscopia de luz após coloração específica ou pela imunohistoquímica (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). A presença da leptospira no organismo é detectada indiretamente por testes de sorodiagnósticos como o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e a prova de soroglutinação microscópica (SAM) (LEVETT, 2001).

A SAM é realizada com microrganismos vivos e a reação baseia-se na detecção de anticorpos que reagem contra antígenos de superfície encontrados na *Leptospira* (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). É recomendada pela OMS como o teste padrão ouro da leptospirose devido a sua sensibilidade e especificidade (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O isolamento da leptospira em meios de cultura (EMJH) é difícil e pode levar semanas para se observar crescimento, porém é considerada definitiva no diagnóstico da leptospirose (SANTA ROSA et al., 1980; VASCONCELLOS et al., 1997; FAINE et al., 1999).

A utilização da PCR para o diagnóstico da leptospirose em amostras clínicas vem se desenvolvendo desde a década de 1990 (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Este método de diagnóstico pode ser realizado em diferentes amostras biológicas (humor aquoso, urina, soro sanguíneo, líquido e tecidos) (MÉRIEN et al., 1993; BAL et al., 1994; BROWN et al., 1995; ROMERO et al., 1998; BROWN et al., 2003). A sensibilidade da PCR varia com o tempo de estocagem da amostra, o material biológico selecionado, o protocolo de amplificação utilizado, a padronização dos reagentes e com a escolha do primer (VELOSO et al., 2000).

As proteínas de superfície Lig e LipL32 são conhecidas como fatores de virulência nas leptospirosas patogênicas (KO et al., 2009). Baseado nessa característica Palaniappan et al. (2005) desenvolveram o par de primers Lig1 e Lig2 que amplifica uma fração dos genes *ligA* e *ligB* da *Leptospira spp.* Segundo Jouglard et al. (2006) os protocolos de PCR que utilizam esses primers têm baixa sensibilidade no estágio inicial da doença. Os protocolos que utilizam os primers baseados na LipL32, descritos por muitos autores, possuem maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico precoce da leptospirose. (JOUGLARD et al., 2006; BONFIM; KOURY, 2006; BOURTHY et al., 2011; THAIPADUNPANIT et al., 2011).

Sinais Clínicos

Apesar da ampla bibliografia que descreve a incidência da leptospirose em diversos países, Bharti et al. (2003) acreditam que a leptospirose é subdiagnosticada, pois o conhecimento sobre os diferentes quadros clínicos da doença é escasso e a incidência baseia-se apenas nos casos hospitalizados (HARTSKEERI et al., 2011).

A gravidade das manifestações clínicas pode variar de acordo com a dose infectante, virulência do sorovar, suscetibilidade do hospedeiro e os órgãos afetados na doença (FAINE, 1982). Dependendo do sorovar infectante os pacientes podem desenvolver formas fatais ou intratáveis com icterícia, hemorragia, falência renal ou hepática, meningite ou formas menos graves que variam desde uma infecção sub-clínica à febre alta, dor muscular (FAINE et al., 1999). Em regiões endêmicas sinais subclínicos são comuns e os casos de infecção manifestam apenas sinais leves que se recuperam sem complicações (BHARTI et al., 2003; VIJAYACHARI et al., 2008).

A doença sistêmica no homem é caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e falha reprodutiva (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). A forma mais severa é bifásica que se caracteriza inicialmente por infecção aguda com a presença da leptospira no sangue e fluido cérebro-espinhal, levando a febre, meningites e leptospirúria (FAINE, 1982). Laboratorialmente alterações como: trombocitopenia, aumento das enzimas hepáticas, proteinúria, hematúria e aumento da concentração de creatinina são encontradas (JAURÉGUIBERRY et al., 2005).

Em muitos casos a leptospirose humana leva a insuficiência renal aguda (IRA) pela hipotensão e hipovolêmia ou principalmente pela ação direta das leptospiras no epitélio renal (ABDULKADER; SILVA, 2008). Na IRA causada por *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae os principais fatores relacionados à patogênese das lesões estão ligados a presença dos microorganismos e / ou a sua virulência, incluindo produtos liberados por lise (ALVES et al., 1987).

Yang et al. (2001) relataram IRA em pacientes com alteração no túbulo proximal e acidose tubular renal causada pelo sorovar *Bratislava*, espessamento do ramo ascendente da alça de henle do néfron e também função tubular normal em pacientes com o sorovar *Shermani*. É possível que endotoxinas da bactéria afetem vários segmentos do néfron dependendo do sorotipo e da concentração de bactérias, causando disfunção generalizada do rim (YANG et al., 2001).

A ocorrência de insuficiência renal crônica (IRC) após um quadro de IRA

foi descrita por Atasoyu et al. (2005). Eles relataram o caso de um homem que mesmo após o tratamento com antibiótico e hemodiálise continuou apresentando alterações renais que aumentaram progressivamente. Foram realizadas duas biópsias renais, a primeira 3 semanas após o tratamento revelou uma infiltração de linfócitos no interstício, atrofia tubular e fibrose intersticial. Após 7 semanas a segunda biópsia mostrou um aumento gradativo da atrofia tubular e fibrose intersticial. Abdulkader e Silva (2008), também encontraram as mesmas alterações renais em um paciente acompanhado após a ocorrência de IRA por leptospirose que apresentou IRC alguns meses depois.

Controle

Para implantar medidas eficazes de controle da leptospirose é necessário conhecer as características eco-epidemiológicas e culturais de uma comunidade (VIJAYACHARI et al., 2008).

O controle da população de roedores, da exposição à contaminação ambiental (urina, secreções, excreções ou água e áreas inundadas), a utilização equipamentos de proteção, a higiene na atividade ocupacional e a vacinação dos animais domésticos, são medidas de controle da infecção em humanos (FAINE, 1982). Entretanto torna-se mais difícil nos casos onde o homem tem um contato próximo com animais domésticos e silvestres (FAINE, 1998).

Ao longo dos anos autores tem demonstrado mudanças significativas relacionadas à epidemiologia da leptospirose, ressaltando a importância de estudos que esclareçam a dinâmica da doença distinta a cada região.

Referências

Abdulkader RCRM, Silva MV 2008. The kidney in leptospirosis. *Pediatr Nephrol* 23:2111–2120.

Acha PN, Szyfres B 2001. *Zoonoses and communicable diseases commun to man and animals - Bacterioses and Mycoses* Vol 3, Pan American Health Organization, Washington DC, 398 pp.

Adler B, Moctezuma AP 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-296.

- Alves VA, Vianna MR, Yasuda PH, De Brito T 1987. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J Pathol* 151: 125-131.
- Atasoyu EM, Turhan V, Unver S, Evrenkaya TR, Yildirim S 2005. A case of leptospirosis presenting with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2290-2292.
- Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, KO AI, REIS MG 2008. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop* 105: 176-180.
- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeert RA, De Meza Brewster J, Korver H, Terpstra WJ 1994. Detection of leptospirosis in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. *J Clin Microbiol* 32: 1894-1898.
- Barcellos C, Lammerhirt, CB, Almeida MA, Santos E 2003. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. *Cad Saúde Pública* 19: 1283-1292.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-771.
- Bonfim MRQ, Koury MC 2006. Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira spp* in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Vet Microbiol* 118: 278-288.
- Bourthy P, Bremont S, Zinini F.; Giry C, Picardeau M 2011. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira spp* in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *Am J Trop Med and Hyg* 85: 275-281.
- Brandling-Bennet AD, Pinheiro F 1996. Infectious diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing. *Emerg Infect Dis* 2: 59-61.
- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS 1999. Further determination of DNA relatedness between sorovars in the family *leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexandri* sp. nov and for new *Leptospira genomospecies*. *Int J of Syst Bacteriol* 49: 839-858.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van De Kemp H, Hartskeeri RA, Edwards CN, Everard, C.O.R, Terpstra WJ, Levett PN 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbi* 43: 110-114.
- Brown PD, Carrington DG, Gravekamp C, Van De Kemp H.; Edwards CN, Jones SR, Prussia PR, Garrigues S, Terpstra WJ, Levett PN 2003. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res Microbiol* 154: 581-586.
- Castro JR, Salaberry SR, Souza MS, Lima-Ribeiro AMC 2011. Sorovares de *Leptospira spp* predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 217-222.

Carter GR, Wise DJ 2004. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*, 6 ed. Backwell publishing company, Iowa State Press, 290 pp.

Faine S 1982. *Guidelines For The Control Of Leptospirosis*. Geneva: World Health Organization (WHO Offset publication 67).

Faine S 1994. *Leptospira and leptospirosis*, Melbourne: CRC Press, Londres, 353 pp.

Faine S 1998. *Leptospirosis*, In Collier L, Balows A, Sussman M, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Londres: Arnold, p.1287-1303.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P 1999. *Leptospira and Leptospirosis*, 2 ed, Melbourne: MediSci, Australia, XXIV + 272pp.

Feresu, S B; Steigerwalt A G; Brenner, D J 1999. DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1111-1117.

Haake DEA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartakeeri RA, Sejvar JJ, Ashford DA 2002. Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis* 34: 40-43.

Hartskeeri RA, Collares-Pereira M, Ellis WA 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501.

Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneifder T, Stark K 2005. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis* 11: 1048-1054.

Jauréguiberry S, Roussel M, Brinchault-Rabin G, Gacouin A, Le Meur A, Arvieux C, Michelet C, Tattevin P 2005. Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 34 patients admitted to a single institution in metropolitan France. *Clin Microbiol Infect* 11: 391-394.

Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin OA 2006. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Can. J. Microbiol.* 52: 747-752.

Katz AR, Buchholz AE, Hinson K, Park SY, Effer PV 2011. Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999-2008. *Emerg Infect Dis* 17: 221-226.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736-747.

Levett PN 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.

Mérien F, Perolat P, Mancel E, Persan D, Baranton G 1993. Detection of leptospiral DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis. *J Infect Dis* 249: 1335-1336.

Ministério da Saúde 2005. *Guia de Vigilância Epidemiológica*, 6 ed, Ministério da Saúde, Brasília-DF, 815 pp.

Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin C, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW 2002. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 34: 1593-1599.

Oliveira DS, Neto JASP 2004. Aspectos etiológicos e de diagnóstico nas leptospiroses. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária* 33: 36-46.

Palaniappan RU, Chang YG, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, Mcdonough SP, Dubovi E, Divers TJ, Qu J, Roed B 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes* 19: 111-117.

Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 12: 351-357.

Pavli A, Maltezou HC 2008. Travel-Acquired Leptospirosis. *J Travel Med* 15: 447-453.

Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C 2011. Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia. *Plos Negl Trop Dis* 5: 1-9.

Repetti DDG 2010. *Zoonoses da Área Rural do Município de Jataizinho -Paraná- Brasil*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 102 pp.

Romero EC, Billerbeck AE, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, Yasuda PH 1998. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *J Clin Microbiol* 35: 1453-1455.

Santa Rosa CA, Sulzer CR, Yanaguita RM, Da Silva AS 1980. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. *Int J Zoonoses* 7: 40-43.

Silva ÉF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas F.K, Hartwing DD, Athanzio DA, Pinto L S, Queiroz A, Ko AI, Brod CS, Dellagostin OA 2009. *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brasil. *Emerg Infect Dis* 15: 621-623.

Soares TSM, Latorre MRD, Laporta GZ, Buzzar MR 2010. Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo, Southeastern Brazil, 1998 to 2006. *Rev Saúde Pública* 44: 1-9.

Spohr, KAH. *Leptospirose em ratos urbanos em Londrina, Paraná*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 64 pp.

Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, Carvalho MS 2008. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int Health* 13: 503-512.

Thaipadunpanit J, Cheirakul, W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchain P, Boonslip S, Smythe L, Limpaboon R, Hoffmaster AR, Day NP, Peacock S 2011. Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and *lipL32* Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *Plos One* 6: 1-6.

Thiermann AB 1984. Leptospirosis: current developments and trends. *J Am Vet Med Assoc* 184: 722-725.

Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW 2002. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect* 128: 29-36.

Trejejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jaquín-González C, Amador J J, Los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki S, Shieh WJ, Mclean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA 1998. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178: 1457-1463.

Vasconcellos SA, Barbarini Junior O, Umehara O, Morais ZM, Cortez A, Pinheiro SR, Ferreira F, Fávero ACM, Ferreira Neto JS 1997. Leptospirose Bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. *Arq Inst Biol* 64: 7-15.

Veloso IF, Lopes MTP, Salas CE, Moreira EC 2000. A comparison of three DNA extractive procedure with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 339-343.

Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 33: 557-569.

Vinetz JM 2001. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 14: 527-538.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ 2001. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 16: 73-77.

2 OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

- Determinar a prevalência de pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue com anticorpos contra *Leptospira spp.*

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os sorovares mais prováveis.
- Identificar variáveis associadas à presença de anticorpos na população estudada.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp em pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue

VANAT, Niara. **Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp em pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal–Área de concentração Sanidade Animal - UEL, 2012.

Resumo: Os objetivos deste trabalho foram determinar a prevalência de pacientes com insuficiência renal crônica e doadores de sangue com anticorpos contra *Leptospira* spp, determinar o sorovar mais provável e identificar variáveis associadas ao risco de doença. Para detectar anticorpos foi realizada a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) com 22 sorovares de *Leptospira* de referência. As variáveis epidemiológicas foram obtidas através de um questionário e os resultados submetidos à análise univariada. Dos 179 pacientes com IRC 12 (6.7%) foram reagentes na SAM e dos 483 doadores de sangue, sete (1.45%) foram reagentes. Dentre as amostras reagentes 18 (94.75%) apresentaram anticorpos apenas contra um sorovar de *Leptospira* e em uma amostra (5.25%) não foi possível identificar o sorovar mais provável. Os sorovares Canicola, Hardjo, Pyrogenes, com títulos entre 100 e 400, foram encontrados com maior frequência. A presença de insuficiência renal crônica ($p= 0.001$), o baixo grau de escolaridade ($p= 0.001$), ter trabalhado em propriedade rural ($p= 0.004$) ou morado em propriedade rural ($p= 0.022$), ter acima de 50 anos ($p= 0.014$), sexo masculino ($p= 0.044$) e profissões com risco de exposição ($p= 0.01$), foram consideradas variáveis associadas presença de anticorpos contra *Leptospira* spp.

Palavras-chave: Leptospirose. Homem. Variáveis de risco. Rim.

VANAT, Niara. **Antibodies against *Leptospira* spp in patients with chronic renal failure and blood donors.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal–Área de concentração Sanidade Animal - UEL, 2012.

Abstract: The objectives of the present work were to determine the prevalence in 179 patients with chronic renal failure and in 483 blood donors with antibodies against *Leptospira* spp, determine the most frequent serovar and identify variables of risk. To detect antibodies, microscopic agglutination test (MAT) was performed with 22 serovars of *Leptospira* reference. The epidemiological variables were obtained through questionnaire and the results submitted to univariate analysis. From the 179 patients with CRF, 12 (6.7%) were reactive in the MAT and from the 483 blood donors, seven (1.45%) were reactive. Among the reagent samples, 18 (94.75%) had antibodies against one serotype of *Leptospira* and one sample (5.25%) was not possible to identify the most frequent serovar. The serovars Canicola, Hardjo and Pyrogenes with titers between 100 and 400, were found with more frequently. The presence of chronic renal failure ($p= 0.001$), low educational level ($p=0.001$), have worked on farm ($p= 0.004$) or have lived in the farm ($p= 0.022$), have over 50 years of age ($p= 0.014$), males ($p= 0.044$) and work in occupations with exposure risk ($p= 0.01$), were considered variables associated with the presence of antibodies against *Leptospira* spp.

Keywords: Leptospirosis. Man. Risk factors. Chronic renal failure.

Introdução

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira* (FAINE et al., 1999), que ocorrem no ambiente urbano de cidades industrializadas e desenvolvidas, assim como na região rural (BHARTI et al., 2003). A prevalência da leptospirose é alta em países de clima tropical chuvoso, com pH do solo neutro ou alcalino (ACHA; SZYFRES, 2001; LEVETT, 2001).

A transmissão para humanos (hospedeiros acidentais) ocorre direta ou indiretamente por diferentes espécies de mamíferos como: roedores, bovinos, suínos, caninos e animais silvestres (FAINE et al., 1999). A forma direta ocorre pelo contato do novo hospedeiro com tecidos, secreções ou urina de animais portadores para o novo hospedeiro (VIJAYACHARI et al., 2008) e a indireta através do ambiente previamente contaminado por urina (FAINE et al., 1999). A soroprevalência em uma população depende da presença do reservatório animal, dos sorovares que ele alberga, das condições ambientais, da ocupação e das práticas agropecuárias (BHARTI et al., 2003).

Monahan et al. (2009) consideram que muitos fatores ainda desconhecidos relacionados à espécie hospedeira, ao sorovar e à dose infectante determinam se um hospedeiro sofrerá infecção aguda ou crônica, enquanto Fraga et al. (2011) suspeitam que o polimorfismo genético também esteja relacionado. Animais e humanos que sobrevivem à infecção aguda também podem se tornar portadores crônicos mantendo a bactéria no rim ou trato genital. (FAINE, 1998). Em animais a colonização renal crônica e a leptospiúria persistente levam a nefrite túbulo intersticial que pode progredir para fibrose e posterior falência renal (MONAHAN et al., 2009).

Em muitos casos a leptospirose humana leva a insuficiência renal aguda (IRA) pela hipotensão e hipovolêmia ou principalmente pela ação direta das leptospiras no epitélio renal (ABDULKADER; SILVA, 2008). Segundo Monahan et al. (2009) proteínas de membrana externa da *Leptospira* têm um importante papel na alteração renal, sendo provável que a excreção de diferentes proteínas antigênicas da bactéria durante a infecção crônica facilite a colonização do túbulo renal e a leptospiúria persistente. O estado de portador renal caracterizado pela colonização de leptospiras na superfície das células do túbulo proximal é a chave da persistência e da epidemiologia da leptospirose (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Como a incidência da leptospirose em humanos é subestimada devido à falta de conhecimento sobre a sua epidemiologia (BHARTI et al., 2003), a investigação aleatória de soros humanos (IRC e doadores de sangue) é uma importante ferramenta para ações de

vigilância (LANGONI et al., 2010). Portanto este estudo teve como objetivos determinar a prevalência de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e doadores de sangue com anticorpos contra *Leptospira* spp, determinar os sorovares mais prováveis e identificar as variáveis associadas ao risco.

Material e Métodos

Amostragem, Local de Coleta das Amostras e Realização dos Exames

As amostras de soro foram obtidas no Laboratório de Análises Clínicas e no Laboratório de Imunologia ambos do Hospital Universitário – UEL e acondicionadas em frasco estéril mantidos à -20°C, para posterior realização da sorologia. A amostragem foi obtida de 179 IRC dependentes e não dependentes de hemodiálise que apresentavam uma ou mais patologias concomitantes associadas ou não ao problema renal, no Hospital de Clínicas (HC) e Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina e de 483 doadores de sangue do Hemocentro – HU, entre outubro de 2010 e outubro de 2011. Os exames sorológicos foram realizados no laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) – Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Instrumento de Pesquisa

Foram estudadas variáveis epidemiológicas da leptospirose relacionadas aos pacientes e doadores de sangue obtidas através de entrevista (Apêndice B).

1. Variáveis comuns relacionadas aos participantes: sexo, idade, grau de escolaridade, profissão, hábitos comportamentais (costume de pescar/nadar em rios/córregos e passear em propriedade rural), contato com animal, sintomas de gripe/resfriado no período de seis meses anterior a entrevista.
2. Variáveis relacionadas ao ambiente e moradia: presença de animal doméstico, abastecimento de água, destino de águas residuais, destino do lixo, presença de lotes próximos à moradia, presença de rio ou córrego próximo à moradia e presença de roedores no ambiente domiciliar.
3. Variáveis relacionadas aos pacientes com IRC: tempo da doença, doenças concomitantes, hemodiálise.

A profissão dos pacientes e doadores entrevistados foram separadas em dois grupos: com risco de exposição; atividades ocupacionais que tem contato com animais ou com o ambiente contaminado (ex: profissões ligadas a agropecuária, bombeiros, pedreiros) e sem exposição; atividades ocupacionais que desenvolvem suas atividades em um ambiente restrito e não tem contato com o ambiente externo (ex: costureira, comerciante, telefonista, serviços administrativos, professor).

Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A detecção de anticorpos contra *Leptospira* spp foi obtida pela SAM. Para cada soro foram testados 22 sorovares de referência: Australis, Bratislava, Autumnalis, Fort bragg, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot, mantidas em meio EMJH (DIFCO®-USA) a 28° C por 5 a 10 dias.

As amostras de soro foram previamente diluídas em solução tampão fosfato estéril (PBS) pH 7,4 na proporção de 1:50, em seguida foi adicionado à mesma quantidade de antígeno também diluído em PBS, obtendo uma diluição final de 1:100. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro (OLIMPUS - modelo Bx40) (MYERS, 1985). Foram considerados reagentes os soros que apresentaram aglutinação 50% ou mais de aglutinação na diluição 1:100 (FAINE et al., 1999) Em seguida as amostras positivas foram diluídas em série na base dois e avaliadas para determinar a diluição máxima positiva. Ao analisar os resultados foi considerado como sorovar mais provável aquele que apresentou maior título (VASCONCELLOS et al., 1997).

Análise Estatística

As informações geradas pelo instrumento de coleta de dados foram armazenadas e analisadas no programa Epi6 versão 6.04 (CDC-Atlanta) (DEAN et al., 1994). A significância estatística das variáveis foi verificada utilizando-se o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Como medida de associação adotou-se o Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%. O nível de significância determinado foi de 5%.

Ética

A realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CONEP) da Universidade Estadual de Londrina sob o registro de no 268.

Resultados

Doze (6.7%) pacientes com IRC e sete (1.45%) doadores de sangue foram reagentes à SAM.

Dentre as amostras reagentes 18 (94.75%) apresentaram anticorpos apenas contra um sorovar de *Leptospira* e em uma amostra (5.25%) não foi possível identificar o sorovar mais provável. Os sorovares Canicola, Hardjo, Pyrogenes, com títulos entre 100 e 400, foram encontrados com maior frequência (Tabela 1).

A presença de insuficiência renal crônica ($p= 0.001$), o baixo grau de escolaridade ($p= 0.001$), ter trabalhado em propriedade rural ($p= 0.004$) ou ter morado em propriedade rural ($p= 0.022$), ter acima de 50 anos de idade ($p= 0.014$), ser do sexo masculino ($p= 0.044$) e atuar em profissões com risco de exposição ($p= 0.01$), foram consideradas variáveis associadas à presença de anticorpos contra *Leptospira spp.*

Tabela 1 – Sorovares mais prováveis e títulos de anticorpos detectados na prova de soroaglutinação microscópica, realizada com 22 sorovares de *Leptospira interrogans* em 179 amostras de sangue de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) atendidos no Hospital Universitário e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e 483 Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Londrina-UEL, entre outubro de 2010 a outubro de 2011.

Sorovares	Condição			Títulos Sorológicos		
	IRC	Doador	Total(%)	100	200	400
Canicola	1	3	21.06	2	1	1
Hardjo	2	1	15.79	2	1	
Pyrogenes	3		15.79		1	2
Autumnalis	2		10.53	2		
Castellonis	1	1	10.53	1	1	
Butembo	1		5.26	1		
Copenhageni		1	5.26	1		
Grippotyphosa	1		5.26	1		
Panama		1	5.26	1		
Não caracterizado o sorovar mais provável	1		5.26		1	

Tabela 2 – Resultado das variáveis de risco associadas a leptospirose em pacientes com Insuficiência renal crônica atendidos no Hospital Universitário e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Londrina-UEL, entre outubro de 2010 a outubro de 2011.

Variável	Positivos/Total (%)	<i>P</i>	Odds ratio (IC 95%)
Condição			
<u>Renal crônico</u>	12/179 (6.7%)	0.001	4.89 (1.74-14.10)
Doador	7/483 (1.45%)		
Sexo			
<u>Masculino</u>	16/393 (4.07%)	0.045	3.76 (1.01-16.59)
Feminino	3/269 (1.12%)		
Idade			
18– 50 anos	9/489 (1.84%)		
<u>>de 50 anos</u>	10/173 (5.78%)	0.014*	3.27 (1.2-8.93)
Grau de escolaridade			
<u>sem estudo e fundamental</u>	13/202 (6.44%)	0.001	17.13 (2.32-353.81)
Médio	5/210 (2.38%)	0.099*	6.07 (0.69-138.47)
Universitário•	1/250 (0.4%)		
Cidade			
Londrina e região	17/617 (2.76%)	0.37*	0.61 (0.13-4.00)
Outras	2/45 (4.5%)		
Residência			
Rural	3/57 (5.26%)	0.21*	2.05 (0.45-7.87)
Urbana	16/605 (2.65%)		
Foi Morador de Área Rural			
<u>Sim</u>	9/162 (5.56%)	0.021*	3.29 (1.13-9.63)
Não	8/ 455 (1.76%)		

Abastecimento de Água				
Tratada	18/599 (3%)	1.0*	1.89 (0.26-39.29)	
Não tratada	1/62 (1.61%)			
Esgoto				
Rede Pública	19/632 (3%)	0.06		
Fossa	0/7 (0%)			
Rios/Córregos	0/23 (0%)			
Destino do Lixo				
Coleta Pública	19/632 (3%)	0.93		
Lotes vagos	0/7 (0%)			
Queimado	0/23 (0%)			
Lote Vago Próximo a Casa				
Sim	12/293 (4.1%)	0.084	2.78 (0.89-9.23)	
Não	5/330 (1.52%)			
Rio/Córrego Próximo a Casa				
Sim	10/301 (3.32%)	0.98	1.34 (0.49-3.68)	
Não	9/361 (2.49%)			
Roedores no Peri domicilio				
Sim	13/407 (3.19%)	0.13	1.35 (0.47-4.08)	
Não	6/252 (2.38%)	0.71	1.35 (0.47-4.08)	
Possui Animais Domésticos				
Sim	11/412 (2.67%)	0.86	0.83 (0.3-2.3)	
Não	8/249 (3.21%)			
Possui Cão				
Sim	10/385 (2.6%)	0.54*	0.72 (0.09-15.84)	
Não	1/28 (3.57%)			
Profissão				
<u>Com risco de exposição</u>	13/261 (4.98%)	0.01	3.45 (1.20-10.32)	

Sem exposição	6/401 (1.5%)		
Local de Trabalho			
Rural	2/41 (4.88%)	0.33*	1.82 (0.00-8.73)
Urbano	17/619 (2.75%)		
Contato com Animal Durante a Atividade Ocupacional			
Sim	2/36 (5.56%)	0.28*	2.08 (0.00-10.08)
Não	17/618 (2.75%)		
Trabalhou em Área Rural			
<u>Sim</u>	9/141 (6.38%)	0.005*	4.06 (1.39-11.91)
Não	8/484 (1.65%)		
Pesca ou Toma Banho (Rios, Lagos, Barragens)			
Sim	8/213 (3.76%)	0.5	1.55 (0.55-4.25)
Não	11/447 (2.46%)		
Passeia em Propriedade Rural			
Sim	13/385 (3.38%)	0.36	1.83 (0.59-6.01)
Não	5/267 (1.87%)		
Contato com Animal Durante a Atividade de Lazer			
Sim	11/298 (3.69%)	0.74*	1.63 (0.33-11.01)
Não	2/87 (2.3%)		

*Teste exato de Fisher •Categoria de referência para cálculo de “Odds Ratio”.

Discussão

O rim é o órgão comumente acometido por diferentes espécies de leptospiros, pois a bactéria é encontrada principalmente nos túbulos proximais onde consegue sobreviver e se multiplicar (FAINE, 1982). As alterações renais estão relacionadas à invasão bacteriana, ao processo inflamatório, as alterações vasculares, a toxicidade da bactéria e a fatores ligados ao hospedeiro (VISITH; KEARKIAT, 2005; FAINE, 1982). No homem a necrose tubular leva a uma insuficiência renal aguda (IRA) (VISITH; KEARKIAT, 2005), mas a possibilidade de ocorrer uma insuficiência renal crônica não deve ser excluída (BARBUDO FILHO, 2002).

Neste estudo foi detectada a maior soroprevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp em pacientes com IRC (6.7%) comparada com o grupo de doadores de sangue (1.45%), indicando que os pacientes com IRC têm 4,88 vezes mais chance de reagir contra os sorovares de *Leptospira* spp.

Barbudo Filho (2002) estudando 247 indivíduos com IRC em hemodiálise, detectou uma prevalência de 8 (3.24%) sororreagentes na SAM. Como a insuficiência renal crônica tem diferentes estágios de comprometimento renal (ROMÃO JUNIOR, 2004; MORTARI, 2010) e pacientes em hemodiálise possuem uma menor resposta imune celular e humoral causada pela uremia (SOUZA et al., 2005), a menor prevalência encontrada por Barbudo Filho (2002) pode estar relacionada à população estudada, pois o autor estudou apenas pacientes no estágio final da doença excluindo os estágios menos graves, enquanto que neste estudo apenas 12.88% dos pacientes com IRC encontravam-se em hemodiálise.

A prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp nos doadores de sangue (1.45%) é semelhante às detectadas por Barbudo Filho (2002) e Langoni et al. (2010) que detectaram uma prevalência de 1% e 1.33% respectivamente, em doadores de sangue. Esta semelhança entre os resultados pode estar relacionada aos mesmos fatores epidemiológicos e culturais os quais a população em geral está exposta.

Segundo Oliveira et al. (2009) o saneamento ambiental, a educação, a informação e a comunicação são fatores sociais importantes que influenciam na incidência da leptospirose nos centros urbanos. Portanto este estudo demonstrou que o baixo grau de escolaridade (sem estudo ou ensino fundamental) foi associado à presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. Moreira (2006) ao estudar casos de leptospirose que ocorreram em hospitais de Fortaleza – CE verificou que 53.8% dos casos haviam cursado ou cursavam o ensino fundamental. Em Salvador – BA, de 1.016 pacientes internados com leptospirose no Hospital Couto Maia, 1993 e 1997, com idade igual ou superior a 18 anos 93% não cursaram o segundo grau (COSTA et al., 2001).

Houve diferença significativa quanto à idade acima de 50 anos, enquanto na literatura a maioria dos autores descreveram que a principal faixa etária associada ao risco de leptospirose está entre 20 e 50 anos (PEREIRA, 2005; MEITES et al., 2004; KEENAN et al., 2010). Essa diferença encontrada na idade pode estar relacionada a população estudada, pois neste trabalho a maioria dos reagentes contra *Leptospira* spp foi detectada em pacientes com IRC com idade média de 63 anos e segundo Lei et al. (1998) a IRC ocorre principalmente em pessoas com idade avançada.

O sexo masculino associado a presença de anticorpos contra *Leptospira spp.* também foi descrito por Bovet et al. (1999), Leal-Castellanos et al. (2003), Katz et al. (2011). Os autores afirmaram que o homem está mais exposto ao ambiente contaminado em suas atividades ocupacionais do que as mulheres.

Faine et al. (1999) afirmaram que há uma associação de risco para leptospirose em atividades ocupacionais, principalmente entre pessoas que trabalham em contato com animais ou ambiente contaminado. Este trabalho também demonstrou que atividades ocupacionais com exposição ao ambiente contaminado e/ou contato direto com animais estiveram associadas a presença de anticorpos contra *Leptospira spp.* Faine (1998) descreve que no contato direto e indireto com animais prováveis portadores da *Leptospira spp* há fatores que determinam o risco da leptospirose mediante o grau de exposição, como: o número de animais, a quantidade de leptospiros eliminadas pela urina, o volume de urina e o contato com água contaminada.

Ter morado ou trabalhado em zona rural também foi associado à presença de anticorpos contra *Leptospira spp.* Covic et al. (2003), em estudo retrospectivo, demonstraram que 31% dos casos de leptospirose com insuficiência renal aguda (IRA) foram residentes de zona rural. Repetti (2010) ao estudar moradores rurais do município de Jataizinho (PR) verificou que 12.07% foram reagentes contra *Leptospira spp.* Faine (1982) e Katz et al. (2011) consideraram que a implementação de práticas agropecuárias no ambiente rural tem modificado ao longo dos anos a relação de equilíbrio entre a fauna e a flora, levando ao aumento da concentração de animais domésticos e silvestres (hospedeiros suscetíveis a leptospira) convivendo em um *habitat* comum, o que favorece a transmissão da leptospira ao homem.

Segundo Levett (2001) é necessário conhecer os sorovares prevalentes e os hospedeiros de manutenção em diferentes ecossistemas para que se possa entender a epidemiologia da doença que é distinta a cada região. Neste trabalho mais de 50% dos reagentes na SAM apresentaram anticorpos contra os sorovares Canicola, Hardjo e Pyrogenes. Autores também relataram no homem a ocorrência de anticorpos contra o sorovar Canicola descrito por Morgan et al. (2002), o sorovar Hardjo por Gonçalves et al. (2006) e contra os sorovares Canicola e Pyrogenes por Trevejo et al. (1998), Bharti et al. (2003), Hartskeeri et al. (2011). Tais autores relataram que os sorovares estão em constante adaptação a novos hospedeiros e, como a fauna difere de acordo com a região, existe uma variabilidade distinta de leptospiros albergadas em diferentes reservatórios que podem levar à infecção humana. Na região norte do Paraná o sorovar Canicola já foi isolado de bovinos e suínos, sendo o sorovar

mais freqüente isolado de cães na região (FREITAS et al., 2004; ZACARIAS et al., 2008). Segundo Trevejo et al. (1998) e Leal-Castellanos et al. (2003) a presença de cães não vacinados no ambiente peri-doméstico é um importante fator de risco para a leptospirose ao homem. Os bovinos são hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo (BHARTI et al., 2003) e a presença desses animais próximos a moradia do homem foi associada a leptospirose ocupacional (LEAL-CASTELLANOS, 2003; SUGUNAN et al., 2009). No Brasil o sorovar Pyrogenes já foi isolado do rato de água (*Nectomys squamipes*) (SANTA ROSA et al., 1980) e segundo Levett (2001) diferentes espécies de roedores são hospedeiros de manutenção de sorovares distintos e contribuem para a contaminação ambiental.

Neste trabalho os títulos de anticorpos encontrados variaram entre 100 e 400, resultados também encontrados por Gonçalves et al. (2006) em magarefes de um frigorífero na região Norte do Paraná. Os autores sugerem que estes títulos indicam contato da população estudada com alguns sorovares de leptospira ou uma infecção ocorrida há algum tempo. Segundo Faine et al. (1999) após o contato ou a infecção por leptospiras as imunoglobulinas no homem podem persistir por meses ou anos, demonstrando que houve contato prévio ou infecção assintomática (TREVEJO et al., 1998; BOVET et al., 1999, VIJAYACHARI et al., 2008).

Os pacientes com IRC reagentes na SAM apresentavam-se com uma ou mais patologias concomitantes associadas ou não ao problema renal, por isso não foi possível afirmar que a leptospirose pode ser uma causa de insuficiência renal crônica neste estudo, mas a maior prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp nesse grupo comparada com o grupo de doadores de sangue demonstrou a necessidade de estudos que esclareçam esse resultado.

Referências

Abdulkader RCRM, Silva MV 2008. The kidney in leptospirosis. *Pediatr Nephrol* 23:2111–2120.

Acha PN, Szyfres B 2001. *Zoonoses and communicable diseases commun to man and animals - Bacterioses and Mycoses* Vol 3, Pan American Health Organization, Washington DC, 398 pp.

Adler B, Moctezuma AP 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140: 287-296.

Barbudo Filho J 2002. *Insuficiência Renal Crônica e Fatores Associados à Leptospirose em Pacientes Humanos nos Municípios de Fernandópolis e Votuporanga, Estado de São Paulo, Brasil*, tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal – SP, 49 pp.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757-771.

Bovet P, Yersin C, Mérien F, Davis CE, Perolat P 1999. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *Int J Epidemiol* 28: 583-590.

Costa E, Costa YA, Lopes AA, Sacramento E, Bina JC 2001. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. *Rev Soc Bras Trop* 34: 261-267.

Covic A, Goldsmith DJA, Gubeth-Tatomir P, Seica A, Covic M 2003. A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1128-1134.

Dean AG, Coulombier D, Grendel KA, Arner TG, Dean AG 1994. *Epi Info, Version 6: a word processing, data bases, and statistic program for epidemiology on microcomputers*, Center of Diseases Control and Prevention, Atlanta-USA, 589pp.

Faine S 1982. *Guidelines For The Control Of Leptospirosis*. Geneva: World Health Organization (WHO Offset publication 67).

Faine S 1998. *Leptospirosis*, In Collier L, Balows A, Sussman M, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Londres: Arnold, p.1287-1303.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P 1999. *Leptospira and Leptospirosis*, 2 ed, Melbourne: MediSci, Australia, XXIV + 272pp.

Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. *Scand J Immunol* 73: 408-419.

Freitas JC, Silva FG, Oliveira RC, Delbem ACB, Muller EE, Alves LA, Teles PS 2004. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. *Cienc Rural* 34: 853-856.

Gonçalves DD, Teles PS, Reis CR, Lopes FMR, Freire RL, Navarro IT, Alves LA, Müller EE, Freitas JC 2006. Seroepidemiology and Occupational and Environmental Variables for Leptospirosis, Brucellosis and Toxoplasmosis in Slaughterhouse Workers in the Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48: 135-140.

Hartskeeri RA, Collares-Pereira M, Ellis WA 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501.

Katz AR, Buchholz AE, Hinson K, Park SY, Effer PV 2011. Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999–2008. *Emerg Infect Dis* 17: 221-226.

Keenan J, Ervin G, Aung M, Mcgwin GJ, Jolly P 2010. Risk Factors for Clinical Leptospirosis from Western Jamaica. *Am J Trop Med Hyg* 83: 633-636.

- Langoni H, Hage SSE, Peruca SSB, Lucheis SB, Deffune E 2010. Aglutininas anti-leptospiras em doadores de sangue. *Vet e Zootec* 17: 79-84.
- Leal-Castellanos CB, García-Suárez R, González-Figueroa E, Fuentes-Allen JL, 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, 2003.
- Lei HH, Perneger TV, Klag MJ, Whelton PK, Coresh J 1998. Familial Aggregation of Renal Disease in a Population-Based Case-Control Study. *J Am Soc Nephrol* 9: 1270-1276.
- Levett PN 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.
- Meites E, Jay MT, Deresinski S, Shieh WJ, Zaki SR, Tompkins L, Smith DS 2004. Reemerging Leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis* 10: 406-412.
- Myers DM 1985. *Manual de métodos, para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis*, OPAS Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, nota técnica n.30.
- Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE 2009. Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Vet Pathol* 46: 792-799.
- Moreira JO 2006. *Leptospirose Humana no Município de Fortaleza: Abordagem Sócio-Ambiental*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 100 pp.
- Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin C, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW 2002. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 34: 1593-1599.
- Mortari DM, Menta M, Scapini KB, Rockembach CWF, Duarte A, Leguisamo CP 2010. Qualidade de vida de indivíduos com doença renal crônica terminal submetidos à hemodiálise. *Sci Med* 20: 156-160.
- Oliveira DSC, Guimarães MJB, Medeiros, Z 2009. Modelo Produtivo Para a Leptospirose. *Rev Patol Trop* 38: 17-26.
- Pereira MM 2005. Leptospirose. In Guanabara Koogan, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, José Rodrigues Coura, Rio de Janeiro, p.1497-1508.
- Repetti DDG 2010. *Zoonoses da Área Rural do Município de Jataizinho – Paraná – Brasil*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 102 pp.
- Romão Junior JE 2004. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol* 26: 1-3.
- Santa Rosa CA, Sulzer CR, Yanaguita RM, Da Silva AS 1980. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. *Int J Zoonoses* 7: 40-3.
- Souza CRD, Libério SA, Guerra RNM, Monteiro S, Silveira EJD, Pereira ALA 2005. Avaliação da Condição Periodontal de Pacientes em Hemodiálise. *Ver Assoc Med Bras* 5: 285-289.

Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Subarna R, Manickam P, Natarajaseenivasan K, Gupte MD, Sehgal SC 2009. Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. *Indian J Med Res* 130: 67-73.

Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jaquín-González C, Amador J J, Los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki S, Shieh WJ, Mclean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA 1998. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178: 1457-1463.

Vasconcellos SA, Barbarini Junior O, Umehara O, Morais ZM, Cortez A, Pinheiro SR, Ferreira F, Fávero ACM, Ferreira Neto JS 1997. Leptospirose Bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. *Arq Inst Biol* 64: 7-15.

Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 33: 557-569.

Visith S, Kearkiat P 2005. Nephropathy in leptospirosis. *J Postgrad Med* 51: 184-188.

Zacarias FGS, Vasconcellos SA, Anzai EK, Giraldo N, Freitas JC, Hatskeeri R 2008. Isolation of *Leptospira* Serovars Canicola and Copenhageni From Cattle Urine in the State of Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol* 39: 744-748.

4 CONCLUSÃO

1. Houve diferença estatística significativa ($p=0.001$) na prevalência de reagentes à SAM entre pacientes com insuficiência renal crônica (6,7%) e os doadores de sangue (1,45%).
2. Canicola, Hardjo, Pyrogenes, foram os sorovares mais prováveis encontrados em mais de 50% das amostras reagentes.
3. A presença de insuficiência renal crônica, ter trabalhado em propriedade rural ou ter morado em propriedade rural, ter acima de 50 anos de idade, ser do sexo masculino e profissões com risco de exposição, foram consideradas variáveis associadas a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *LEPTOSPIRA* SPP EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E DOADORES DE SANGUE.”

Prezado Senhor (a):

Estamos convidando-o(a) a participar da pesquisa “Prevalência de Anticorpos Contra *Leptospira spp* em Humanos Com Insuficiência Renal Crônica Atendidos no Hospital Universitário e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, PR”, com o objetivo de detectar anticorpos contra sorovares de *Leptospira* em humanos com diagnóstico de insuficiência renal crônica (IRC) e em doadores de sangue do hemocentro e identificar as variáveis de risco para leptospirose na população estudada.

Sua participação consiste em permitir a aquisição de uma alíquota de 500 µl de soro a partir da coleta de sangue realizada para os exames de rotina solicitados pelos médicos do setor de nefrologia ou pelo hemocentro e responder um questionário com perguntas relacionadas a epidemiologia da leptospirose.

Declaro que as informações fornecidas são confidenciais e que, quando divulgados os resultados, o serão de forma geral, garantindo seu anonimato.

Caso seu exame seja positivo, o resultado será encaminhado para o médico ou setor do Hospital Universitário e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina responsável pelo seu atendimento.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação.

Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, bem como serão garantidas as indenizações, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Garantimos que o senhor tem total liberdade de se recusar a participar da pesquisa, ou de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízos para seu atendimento ou de seus familiares.

Eventuais dúvidas poderão ser esclarecidas com a pesquisadora Niara Vanat, residente na rua Pedro Marcos Prado, 345, ap.21, em Londrina-PR, ou pelo telefone (43) 30280853 ou (43)96250853, ou em consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Eu _____, tendo sido devidamente informado(a) sobre os procedimentos da pesquisa, e tendo garantida a liberdade de aceitar ou não fornecer qualquer tipo de material biológico, de fornecer informações e de recusar em participar da pesquisa ou retirar o consentimento no momento em que desejar, sem prejuízos pessoais ou para familiares, concordo em participar da pesquisa acima descrita.

Londrina, _____ de _____ de _____.

Assinatura
 ou impressão datiloscópica

Nome completo

Documento

Coordenador Responsável
 Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas
 (Médico Veterinário)
 Universidade Estadual de Londrina
 (UEL)
 (43)3371 4765
 e-mail: freitasj@uel.br

Pós graduanda / entrevistadora
 Niara Vanat
 (Médica Veterinária)
 Universidade Estadual de Londrina (UEL)
 (43) 30280853, (43) 33714259 ou
 (43) 96250853
 e-mail: ni_vanat@yahoo.com.br

APÊNDICE B

Questionário Epidemiológico

Questionário de investigação epidemiológicas da leptospirose em pacientes humanos insuficientes renais crônicos atendidos no hospital universitário e no hospital de clínicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

DADOS PESSOAIS

- sexo: masculino () feminino ()
- idade: 20-30 anos () 30-40 anos () 40-50 anos () acima de 50 anos ()

RESIDÊNCIA:

- área rural () área urbana ()
- morou em propriedade rural sim () não ()

ESCOLARIDADE:

- Ensino fundamental completo () incompleto ()
- Ensino médio completo () incompleto ()
- Universitário completo () incompleto ()

ANIMALS:

- Você tem animais em casa? sim () não () canino() outros() _____
- Seu animal tem contato com outros animais? sim () não ()
- Seu animal esteve doente recentemente? sim () não ()
- Se sim, quais eram os sintomas?.....
- Seu animal tem acesso dentro de casa? sim () não ()
- O seu animal tem contato com: horta() jardim () garagem () terreno abandonado() áreas inundadas()

ABASTECIMENTO DE ÁGUA:

- Sua casa tem água tratada? sim () não ()
- O reservatório de água é coberto? sim () não ()

ÁGUAS RESIDUAIS:

- Destino? rede pública de esgoto () fossa() rios/córregos() esgoto aberto()

LIXO:

- Destino? sistema público de coleta () lotes vagos()

-Armazenamento de lixo? sacos plásticos () caixas abertas ()

-Seu animal tem acesso ao lixo da casa e ou da rua? sim () não ()

LOTES:

-Existem terrenos baldios próximos a casa? sim () não ()

-Qual a distância aproximada? _____ metros.

-Há lixo no terreno? sim () não ()

ÁREAS ALAGADIÇAS

-Existe córrego/rio próximo a casa? sim () não ()

-Qual a distância aproximada? _____ metros.

ROEDORES:

- Você já encontrou roedores em sua casa? sim () não ()

- Existem ratoeiras em sua casa? sim () não ()

PROFISSÃO:

- Qual é sua profissão? _____

- Onde você trabalha? área rural () área urbana ()

- Tem contato com animaissim().....não ()

- Tem contato com lixo.....sim ().....não ()

- Tem contato com esgotosim ().....não()

- Se sim, há quanto tempo? _____

- Alguma vez você já trabalhou em propriedade rural? sim () não ()

HÁBITOS COMPORTAMENTAIS:

- Você pesca ou toma banho? rios() lagos () barragens () diques ()

- Você realiza atividades com manipulação de solo? sim () não ()

- Você guarda a comida dos seus animais em casa? sim () não ()

- O alimento dos animais é mantido a céu aberto a noite? sim () não ()

-Você tem alguma tipo de contato com propriedade rural? sim () não ()

- Se sim, você tem contato com animais? sim () não ()

- Se sim, quais? bovino() caprino() suíno() equino () outros _____

SAÚDE

- Você já foi diagnosticado com leptospirose alguma vez? sim ().. não ()

- Você teve sintomas de resfriado/gripe próximo (anterior) ao aparecimento do problema renal ?

- Se sim, quais desses sintomas você teve? febre () dor muscular () diarreia () vômito()

dor na batata da perna () Quando? _____

RENAL CRÔNICO (COM OU SEM HEMODIÁLISE)

- Você faz ou já fez hemodiálise? sim () não ()

- Há quanto tempo você faz/fez hemodiálise? um mês () 3 meses () 6 meses ()
mais de 6 meses ()

- Quando foi o seu diagnóstico de insuficiência renal crônica? _____

- Você apresenta outra doença relacionada à insuficiência renal crônica? _____


ANEXO

ANEXO A

Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer de Aprovação Nº 196/10 CAAE Nº 0165.0.268.268-10 FOLHA DE ROSTO Nº 361302	Londrina, 21 de setembro de 2010.
PESQUISADOR: JULIO CESAR DE FREITAS CCA/ PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL	
Prezado Senhor: O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: <p align="center">"PREVALENCIA DE ANTICORPOS CONTRA LEPTOSPIRA SPP EM HUMANOS COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO E HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, PR."</p>	
Situação do Projeto: APROVADO Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	

ANEXO B

Normas para Publicação – Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidos juntos em arquivo único. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O manuscrito deve ser apresentado na seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas.

Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished

observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor. Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus.

Consultar: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

No texto, usar o sobrenome do autor e a data

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

Nas referências, usar os seguintes estilos:

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomíase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61

Livro ou Tese

Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni Sambom, 1907 pela ação do látex de Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Artigo de revista na Internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002

[updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens].

Available from:

<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

BASE DE DADOS NA INTERNET

Acesso aberto:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

Ilustrações: figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- **Tabelas:** devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

Comunicações breves: devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as

diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

uma declaração de *affidavit* fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores.

Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.

uma declaração de *copyright* fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.

Taxas: a revista não cobra taxas para publicação.

Provas: serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta