



MAASA

Mestrado em Meio Ambiente, Águas e Saneamento



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

VLADIMIR AIRAM QUERINO DA SILVA

**RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E A
CONCENTRAÇÃO DE *LEPTOSPIRA* PATOGÊNICA EM ÁGUAS
URBANAS: ESTUDO NA COMUNIDADE DE PAU DA LIMA,
SALVADOR-BA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador
2014

VLADIMIR AIRAM QUERINO DA SILVA

**RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E A
CONCENTRAÇÃO DE *LEPTOSPIRA* PATOGÊNICA EM ÁGUAS
URBANAS: ESTUDO NA COMUNIDADE DE PAU DA LIMA,
SALVADOR-BA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Meio Ambiente, Águas e Saneamento da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Meio Ambiente, Águas e Saneamento.

Orientador: Prof. Dra. Louisa Wessels Perelo
Co-Orientador: Dr. Federico Costa

Salvador
2014

S586 Silva, Vladimir Airam Querino da.
Relação entre variáveis físico-químicas e a concentração de *Leptospira* patogênica em águas urbanas: estudo na comunidade de Pau da Lima, Salvador, BA/ Vladimir Airam Querino da Silva. – Salvador, 2014.

113 f. : il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Louisa Wessels Perelo.

Co-orientador: Prof. Federico Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Escola Politécnica, 2014.

1. *Leptospira*. 2. Leptospirose. 3. Análise – físico-química 4. Água – qualidade. I. Perelo, Louisa Wessels. II. Costa, Federico. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDD: 616.92



Mestrado em Meio Ambiente, Água e Saneamento



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITECNICA



Vladimir Airam Querino da Silva

**Relação entre variáveis físico-químicas e a concentração de Leptospira
patogênica em águas urbanas: estudo na comunidade de Pau da Lima,
Salvador, Bahia.**

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Louisa Wessels Perelo
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Iara Brandão de Oliveira
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Federico Costa
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Jose Hagan
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Salvador, 22 de abril de 2014

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Nome do Autor: Vladimir Airam Querino da Silva

Assinatura do autor: _____

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Local: Salvador, BA

Endereço: Rua Aristides Novis, 02 - 4º andar, Federação - Salvador-BA - CEP. 40210-630

E-mail: vlaairam@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Louisa Perelo pela disponibilidade com que sempre acompanhou esse trabalho, pelas sugestões e simpatia que por muitas vezes me confortou nessa trajetória.

Ao amigo e co-orientador Dr. Federico Costa, pela dedicação, qualificação na orientação deste estudo e principalmente pela sua amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), por ter financiado minha bolsa de pesquisa.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA), por todos os meios disponibilizados ao longo de toda a minha formação acadêmica.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo apoio logístico, estrutural e financeiro.

À Dra. Paula Ristow meu agradecimento pelos ensinamentos, sugestões e críticas construtivas.

À Dra. Irina Riediger, pelos materiais disponibilizados.

Aos célebres Dr. Mitermayer Reis, Dr. Albert Ko e Dr. Guilherme Ribeiro por mostrarem que tudo é possível, quando trabalhamos com total dedicação.

À equipe do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA), por cederam o espaço para as análises físico-químicas.

À toda equipe do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB) da Fiocruz, pelo suporte.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), Daiana Oliveira, Iohama Paim, Diógenes Mota, Letícia Castro, Laís Cardoso, Igor Paploski e Erica Sousa, pela valiosa colaboração na execução desta pesquisa.

Aos meus colegas do programa de mestrado pelos ensinamentos e aprofundamento do conhecimento científico.

Aos professores do mestrado que, com presteza, forneceram informações as quais me permitiram a realização deste estudo.

Ao meu amigo Marcos Sousa, pelo suporte acadêmico.

A minha amiga Denize, pela disponibilidade e conhecimento transmitido quanto ao tratamento estatístico dos dados.

Ao meu amigo César Jr. por todo o auxílio e ajuda prestada ao longo da realização do trabalho.

À comunidade de Pau da Lima, pela receptividade e motivação.

Às famílias Querino e Mangabeira, e especialmente minha mãe Josilda Maria Querino, pelo amor e apoio emocional por todos esses anos de formação acadêmica.

À todos que, direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

O meu sincero obrigado

RESUMO

A leptospirose é uma doença endêmica que apresenta grande importância à saúde urbana. No Brasil aproximadamente 3.000 casos são notificados a cada ano, principalmente em áreas pobres e com falta de políticas públicas. Por conta da grande dificuldade de isolar o patógeno no meio ambiente, pesquisas são direcionadas no diagnóstico humano e na transmissão através de animais. A compreensão da dinâmica da *Leptospira* na água e no solo, juntamente com o conhecimento de como os fatores ambientais podem afetar a sua sobrevivência e abundância, podem ser uma resposta para determinar o risco de transmissão da doença. Com o advento de técnicas da biologia molecular, é possível identificar a concentração de *Leptospira* patogênica em amostras de água. Tendo o objetivo de caracterizar a associação entre as variáveis físico-químicas com a concentração de *Leptospira* patogênica em águas urbanas, o presente estudo foi guiado por coletas de amostras de água em uma comunidade urbana, para aplicar qPCR e análises físico-químicas. O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar a relação entre os fatores sazonais dos parâmetros de qualidade da água, com a concentração de *Leptospira* patogênica em águas urbanas. Para isso, os dados foram submetidos aos testes estatísticos (kruskal Wallis, Mann Whitney e Ró de Spearman). Das 288 amostras coletadas, 4,5% foram positivas para *Leptospira*. O valor máximo da concentração de *Leptospira* patogênica foi de 432 GEq/mL. A temperatura variou entre 21°C e 36°C, apresentando uma mediana de 25°C. O valor da mediana do pH foi 7,2 para os dois períodos. A turbidez variou entre 0,000NTU e 1,038NTU, a condutividade elétrica alcançou valores superiores a 1,000 $\mu\text{S/cm}$. A mediana da condutividade elétrica foi de 0,895 μS e 0,921 μS para os respectivos períodos, julho/2011 e janeiro/2012. O TDS e a salinidade tiveram respectivamente, uma mediana nos valores 0,489 mg/L e 0,20/oo. A taxa de positividade foi de 11(7,4%) amostras no turno da manhã do total de 148 e 2(1,4%) amostras no turno da tarde do total de 140. O nível mais alto apresentou 3(7,5%) amostras positivas, do total de 40, enquanto no nível médio 1(1,5%) amostra positiva, do total de 65 e por fim, no nível mais baixo do vale 9(5%) amostras foram positivas, do total de 183. O córrego com esgoto apresentou 10(6%) amostras positivas, do total de 167. Enquanto na matriz de água empoçada foi observado a positividade de 3(2,5%) amostras, do total de 121. Das possíveis associações entre a concentração de *Leptospira* com as variáveis físico-químicas, apenas a relação com o pH e turbidez foram positivas. E nenhum dos pares de correlação foi significativo, estatisticamente. Os pares condutividade elétrica/salinidade, condutividade elétrica/TDS e salinidade/TDS apresentaram correlação significativa. Comparando os dois períodos, apenas a temperatura e TDS apresentaram diferenças significativas. Comparando os dois turnos, a temperatura e pH mostram-se mais influenciadas pela variação diária. Todas as variáveis apresentaram diferença significativa entre os níveis do vale e entre as matrizes de água. A amplificação do gene *lipL32*, através da técnica qPCR apresentou um bom desempenho na detecção de *Leptospira* patogênica em amostras ambientais. A maior positividade de *Leptospira* durante o mês de julho está em concordância com a incidência da doença durante o mesmo período. É provável que a maior taxa de positividade de *Leptospira* no turno da manhã tenha ocorrido por conta do hábito noturno dos roedores. Os resultados obtidos não mostraram evidências que o

nível mais baixo do vale atua como um fator de risco para leptospirose, indicando que outros fatores podem estar contribuindo no risco da doença de acordo a moradia. Os dados apresentados não têm evidência estatística, que exista correlação significativa entre a concentração de *Leptospira* e as variáveis físico-químicas. Ainda assim é observado que as variáveis mensuradas pode influenciar na concentração do patógeno, *in vivo*. Dentre todas as variáveis físico-químicas, a condutividade elétrica, a salinidade e o TDS foram as que apresentaram correlação significativa entre si. Com base nos resultados obtidos, foi evidenciado que existe diferença na concentração de *Leptospira* patogênica e variáveis físico-químicas em relação à variação espaço-temporal.

Palavras-chave: Leptospirose, *Leptospira*, Amostra de Água, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Leptospirosis is an endemic disease which is a relevant problem of urban health. In Brazil, about 3,000 cases are reported each year, mostly in poor areas lacking of public policy. For the high difficulty of isolating the pathogen in the environment, research was directed in the diagnosis human and transmitting by animals. Understanding the dynamics of *Leptospira* in water and soil, and have knowledge how environmental factors can affect their survival and abundance may be a key to determine the risk of disease transmission. With the advent of molecular biology techniques, it is possible to identify the concentration of pathogenic *Leptospira* in water samples. With the aim of characterizing the association between physicochemical variables with the concentration of pathogenic *Leptospira* in urban waters, this study was guided by the sampling of water in an urban community, to apply qPCR and physicochemical analyzes. The aim of this work was to characterize the relationship between the seasonal factors of water parameters, with the concentration of pathogenic *Leptospira* in urban waters. For this, the data were submitted to statistical tests (Kruskal Wallis, Mann Whitney and Spearman's Rho). From the 288 samples collected, 4,5% were positive for *Leptospira*. The maximum concentration of pathogenic *Leptospira* was 432 GEq/mL. The temperature ranged between 21°C and 36°C, with a median of 25°C. The median of pH was 7.2 for both periods. Turbidity ranged between 0.000NTU and 1.038NTU, the electrical conductivity reached values greater than 1.000 μ S/cm. The median of electric conductivity was 0.895 μ S and 0.921 μ S for the respective periods, July/2011 and January/2012. The TDS and salinity had respectively a median of 0.489 mg/L and 0.2 o / oo .The positivity rate was 11(7.4%) samples in the morning, from 148 and 2(1.4%) samples in the afternoon from 140. The highest level showed 3(7.5 %) positive samples from 40 , while the average level 1(1.5 %) positive sample from 65 and the lower level of the valley 9(5 %) samples were positive from 183. The stream water with sewage services show 10(6 %) positive samples from 167. While in standing water show 3(2.5 %) positive samples from 121.Possible associations between the concentration of *Leptospira* with physicochemical variables, only the relationship with pH and turbidity were positive. And none of the pairs of correlation was statistically significant.The pairs: electrical conductivity/salinity, electrical conductivity/TDS and salinity/TDS were significantly correlated.Comparing the two periods, only temperature and TDS had significant differences. Comparing the two day shift, the temperature and pH are shown more influenced by the daily variation. All variables showed significant differences between the levels of the valley and type of water.The *lipL32* gene amplification by qPCR technique showed a good performance in detecting pathogenic *Leptospira* in environmental samples.The greater number of positive *Leptospira* during the month of July is in agreement with the incidence of the disease during the same period.It is likely that the higher rate of positivity of *Leptospira* in the morning has occurred due to the nocturnal rodents The results showed no evidence that the lower level of the valley acts as a risk factor for leptospirosis, indicating that other factors may be assisting in the higher incidence of disease according to housing.The data presented don't have statistical evidence there is significant correlation between the concentration of *Leptospira* and the physicochemical variables. Anyway, could be observed that the

measured variables influence the concentration of the pathogen, *in vivo* .Among all the physicochemical variables, electrical conductivity, salinity and TDS showed the significant correlation. Based on the results obtained, it was evident that there are differences in the concentration of pathogenic *Leptospira* and physico-chemical variables in relation to spatio-temporal variation.

Keywords: Leptospirosis, *Leptospira*, Water Sample, real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmissão da leptospirose.	22
Figura 2. Epidemias anuais de leptospirose grave em Salvador. Vigilância populacional em Salvador-BA entre os anos de 1996 a 2009 (N=2.711)	24
Figura 3. Casos confirmados e coeficiente de letalidade (%) por leptospirose, registrados durante os anos de 2000 a 2011, no Brasil.....	26
Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura de <i>L. interrogans</i> sorovar <i>icterohaemorrhagiae</i>	29
Figura 5. Variáveis ambientais relacionadas com fonte de comida, água, abrigo e acesso para roedores. Fotografias de vestígios dos roedores, tocas (A, B e C), fezes de <i>Rattus norvegicus</i> (D e E) e trilha (C e F).....	40
Figura 6. Área de estudo. O bairro de Pau da Lima (delimitado por uma linha vermelha). Dentro do bairro de Pau da Lima está definido (linhas amarelas) o local de estudo.	42
Figura 7. Altitude ao longo do vale dois (em metros) com os 14 pontos de coleta.	44
Figura 8. Diagrama de dispersão, visualizando relação entre a concentração de <i>Leptospira</i> patogênica e a) Temperatura, b) pH, c) Turbidez, d) Condutividade elétrica, e) TDS e f) Salinidade.	61
Figura 9 Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando as duas estações: 1 (julho/2011) e 2 (janeiro/2012).....	66
Figura 10 Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando os dois turnos: 1 (manhã) e 2 (tarde).	70
Figura 11. Box-plot das variáveis físico-químicas (julho/2011), comparando os dois turnos: 1 (manhã) e 2 (tarde).	72
Figura 12. Box-plot das variáveis físico-químicas (janeiro/2012), comparando os dois turnos: 1 (manhã) e 2 (tarde).	75
Figura 13. Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando os três níveis do vale: 1 (alto); 2 (médio) e 3 (baixo).....	78
Figura 14. Box-plot das variáveis físico-químicas para o período (julho/2011), comparando os três níveis do vale: 1 (alto); 2 (médio) e 3 (baixo).	80
Figura 15. Box-plot das variáveis físico-químicas para o período (janeiro/2012), comparando os três níveis do vale: 1 (alto); 2 (médio) e 3 (baixo).	82
Figura 16. Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando as duas matrizes de água: 1 (córrego com esgoto) e 2 (empoçada).	85
Figura 17. Box-plot das variáveis físico-químicas (julho/2011), comparando as duas matrizes de água: 1 (córrego com esgoto) e 2 (empoçada).	87
Figura 18. Box-plot das variáveis físico-químicas (janeiro/2012), comparando as duas matrizes de água: 1 (córrego com esgoto) e 2 (empoçada).	89

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas	53
Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas e microbiológica	54
Tabela 3. Taxa de positividade de <i>Leptospira</i> patogênica de acordo a variação espaço-temporal	58
Tabela 4. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas... 64	
Tabela 5. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho/2011.	64
Tabela 6. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro/2012.	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EMJ	Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris
et al.	Abreviação da expressão latina <i>et alii</i> , para demais colaboradores
xg	Força centrífuga
GEq	Equivalentes de Genoma
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
LACEN-PR	Laboratório Central do Estado do Paraná
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
LPS	Lipopolissacarídeos
mL	Mililitro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
rpm	Rotações por minuto

μL	Microlitro
μm	Micrometro
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TDS	Sólidos Totais Dissolvidos
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Leptospirose	21
3.1.1. Aspectos gerais	21
3.1.2. Epidemiologia	23
3.2. Agente etiológico: <i>Leptospira</i>	27
3.2.1. Classificação Taxonômica	27
3.2.2. Microbiologia	29
3.3. Reservatórios	31
3.3.1. Reservatórios animais	31
3.3.2. Reservatórios ambientais	32
3.4. Barreiras na prevenção da leptospirose	37
4. METODOLOGIA	41
4.1. Estudo multidisciplinar da leptospirose urbana	41
4.2. Local do estudo	42
4.3. Desenho de estudo	43
4.4. Coleta de amostras	45
4.5. Análises laboratoriais	46
4.6. Análises estatísticas	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.2 Teste de correlação	61
5.2.1 Teste de correlação (<i>Leptospira</i> x Variáveis físico-químicas)	61
5.2.2 Teste de correlação entre Variáveis físico-químicas	64
5.3 Variação espaço-temporal	66
5.3.1 Variação entre horários de coleta	70

5.3.2 Variação entre níveis do vale	78
5.3.3 Variação entre tipos de água	85
6. CONCLUSÃO	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXO A	107
ANEXO B	111

1. INTRODUÇÃO

Condicionantes sócio-econômicos e ambientais têm se mostrado como fatores determinantes do risco de leptospirose. Uma doença infecciosa aguda, de importância global, que acomete homens e animais, causada por uma bactéria pertencente ao gênero *Leptospira*. A doença possui veiculação hídrica, com caráter sazonal, apresentando elevada incidência em regiões de clima tropical, com elevadas temperaturas e altos índices pluviométricos, o que favorece à sobrevivência das leptospirosas no ambiente.

O ciclo da leptospirose é formado por uma interação complexa entre os reservatórios animais, os reservatórios ambientais e os hospedeiros acidentais. Através desse cenário, estudos sistemáticos procuram avaliar a dinâmica do patógeno no ambiente. Com o objetivo de identificar características das possíveis vias de transmissão, são analisados quais fatores ligados às amostras ambientais influenciam na manutenção do organismo no ambiente.

No entanto, trabalhos que utilizaram técnicas menos sensíveis, como meio de cultura e microscopia eletrônica são passíveis de interferências, necessitando do apoio de outras técnicas para validarem seus resultados. O meio de cultura é facilmente contaminado, permitindo o crescimento de leptospirosas saprófitas, que apresentam vantagens metabólicas em relação às leptospirosas patogênicas, e a microscopia não permite a identificação fenotípica desse organismo, pois esses dois grupos não possuem diferença morfológica.

Logo, a utilização de técnicas moleculares para identificar a presença de *Leptospira* patogênica em amostras ambientais vem se tornando uma ferramenta de grande importância para estudos que visam compreender sua dinâmica no ambiente. Devido à alta sensibilidade presente nas técnicas que utilizam conceitos da biologia molecular, a PCR em tempo real além de permitir alta especificidade à presença do patógeno, é capaz de quantificá-lo, podendo identificar fatores de riscos, associados ao ambiente. Porém existem poucos trabalhos científicos aplicados em amostras ambientais, e dentre esses, os que utilizam técnicas moleculares, não têm usado *primers* específicos

para quantificar leptospirosas patogênicas. Dentro desse contexto, a descoberta do gene *lipL32*, exclusivo de *Leptospira* patogênica, oportuniza a avaliação específica desse grupo em amostras ambientais, possibilitando uma maior compreensão da leptospirose, e permitindo a investigação das características da transmissão da mesma.

Paralelo ao avanço da biologia molecular, estudos ambientais que exploram a relação das variáveis físico-químicas na sobrevivência e concentração de *Leptospira* patogênica podem determinar fatores de risco presentes em amostras ambientais, contudo, essas amostras são extremamente heterogêneas, principalmente na variação das características físicas, químicas e biológicas, onde a heterogeneidade pode extrapolar no aspecto espacial e temporal sobre as escalas de minutos e horas. Isso as caracteriza como ambientes complexos e dinâmicos, que formam uma rede de interações entre os organismos e o ambiente físico-químico, além, desta interação depender de fatores climatológicos.

Estudos sobre leptospirose, realizados pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) na região de Pau da Lima, auxiliam na prevenção e tratamento da mesma, informando também o aspecto do comportamento social e ambiental da leptospirose, que por sua vez possuem fatores de risco associados à transmissão da doença. Em Pau da Lima é possível encontrar esgotos a céu aberto, além de lixos que atraem os roedores, principais disseminadores de leptospirosas no ambiente, favorecendo a permanência do patógeno no local.

Por conta da carência de estudos que trazem informações sobre a complexa relação de *Leptospira* com fatores ambientais, o presente trabalho visou investigar um dos elos do ciclo de transmissão da leptospirose, o campo ambiental, que não é bem compreendido. Visou também compreender a estratificação do risco ambiental, como subsídio as ações aplicadas pelas medidas de controle da doença, que é negligenciada pelas atuais políticas públicas, trazendo informações que poderão contribuir nas ações de novas estratégias preventivas para controlar os surtos de leptospirose, que atingem milhares de pessoas no mundo, todos os anos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar a relação entre os fatores sazonais dos parâmetros físico-químicos de qualidade da água com a concentração de *Leptospira* patogênica em águas urbanas.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever dados sobre os parâmetros físico-químicos e comparar entre diferentes tipos de água urbana.
- Caracterizar a variação espacial e sazonal dos fatores físico-químicos das águas urbanas.
- Caracterizar e quantificar a distribuição espacial de *Leptospira* patogênica.
- Comparar concentração de *Leptospira* patogênica entre diferentes tipos de água urbana.
- Avaliar a associação entre os parâmetros de qualidade de água, com a concentração de *Leptospira* patogênica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Leptospirose

3.1.1. Aspectos gerais

A leptospirose é uma zoonose com ampla ocorrência mundial, possuindo caráter endêmico na região tropical devido aos fatores climáticos e sazonais (ROMERO *et al.*, 2003; BHARTI *et al.*, 2003). Essa região apresenta temperatura elevada e o alto índice pluviométrico possibilitando surtos de leptospirose (PAPPACHAN *et al.*, 2004). Esse fato ocorre pelas condições que favorecem a maior sobrevivência do agente da doença, a bactéria do gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001; SCHREIER *et al.*, 2012).

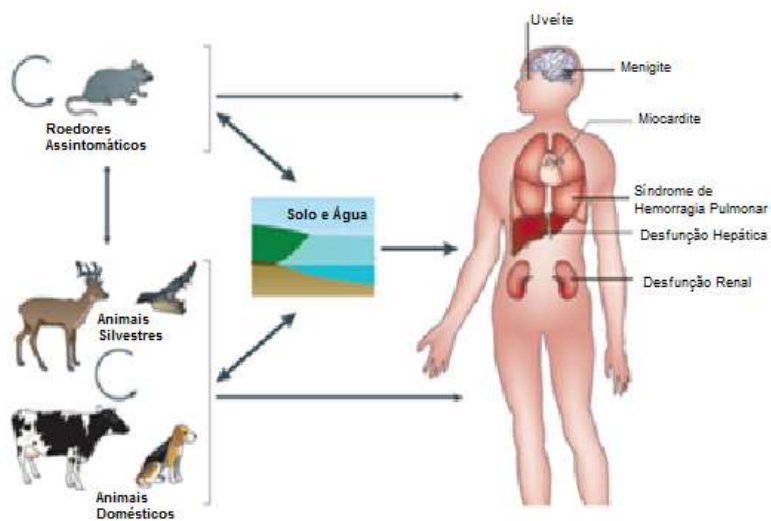
A distribuição da leptospirose é normalmente agravada nas áreas onde existem carência socioeconômica, pois, em tais regiões as famílias se encontram em situação de vulnerabilidade social, com moradias desestruturadas, falta de coleta de lixo, proliferação de ratos, esgoto a céu aberto e grandes enchentes urbanas, fatos que proporcionam o surgimento dos surtos da doença (KO *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2001; MCBRIDE *et al.*, 2007).

A primeira descrição da leptospirose aconteceu em 1880, por Larrey, médico militar francês, que observou dois casos de icterícia infecciosa (EVERARD, 1996; FAINE *et al.*, 1999). A icterícia apresenta um sinal característico, com uma tonalidade alaranjada da pele, aparecendo geralmente entre o terceiro e o sétimo dia da doença (LEVETT, 2001). Posteriormente, em 1886, Adolf Weil descreveu o quadro clínico a partir de quatro pacientes com sintomas de icterícia grave, febre e hemorragia com falência renal, em Heidelberg (FAINE *et al.*, 1999). Por conta desse relato realizado por Adolf Weil, durante anos, a leptospirose na sua forma mais grave foi conhecida como doença de Weil (LEVETT, 2001). Porém, a leptospirose ganhou atenção durante a primeira guerra mundial, quando surtos da doença atingiram tropas militares, sendo registrados 350 casos de leptospirose na França (EVERARD, 1996). Em 1915 a bactéria foi isolada pela primeira vez no Japão, ganhando o nome de *Leptospira* por conta da sua forma de espiroqueta (INADA *et al.*, 1916).

O ciclo de transmissão acontece por causa da interação entre elementos, sendo eles: os reservatórios animais, os reservatórios ambientais e o hospedeiro acidental, no qual o homem se enquadra (OLIVEIRA *et al.*, 2009; LEVETT, 2001). Estudos epidemiológicos apontam que o patógeno pode persistir no ambiente, infectando os reservatórios, normalmente os roedores, até chegar ao alcance de outros animais sinantrópicos e domésticos, aproximando-se do homem (FAINE *et al.*, 1999; BHARTI *et al.*, 2003; SCHREIER *et al.*, 2012). A transmissão da leptospirose pode ocorrer por meio de duas vias: via direta, que se dá através do contato do hospedeiro com o sangue, urina, ou outro fluido do reservatório, que contenha leptospiros; e, a via indireta, onde o contato com leptospiros se dá através do solo ou água contaminada (McBRIDE *et al.*, 2005; ESCÓCIO *et al.*, 2010; ISSAZADEH *et al.*, 2009). A via indireta evidencia a importância de estudos do ambiente, para uma melhor compreensão desse elo de transmissão (LEVETT, 2001; SAMPAIO *et al.*, 2011).

O ciclo de transmissão pode ser entendido, esquematicamente, de acordo com a Figura 1.

Figura 1. Ciclo de transmissão da leptospirose.



Fonte: modificada de Ko, 2009.

Após o patógeno infectar o hospedeiro, normalmente através da pele, por lesões visíveis ou não visíveis inicia-se a síndrome da leptospirose que acomete tanto humanos como animais domésticos e selvagens (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; BARTHI *et al.*, 2003). Na maioria dos casos, a leptospirose apresenta duas fases. A primeira fase, inicial, com um quadro clínico anictérico, manifestando uma diversidade de sintomas, tais como: febre, cefaleia, mialgias, dores abdominais, anorexia e conjuntivite, que normalmente finaliza com o surgimento de anticorpos IgM (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

É esperado que 5 a 10% dos pacientes com leptospirose evoluam para a forma grave. Apesar da existência de dados robustos, as pesquisas ainda não conseguiram desvendar quais fatores levam a essa evolução, acreditando que a doença pode evoluir dependendo de vários fatores da natureza do patógeno, da concentração de *Leptospira*, do estado nutricional do paciente e da presteza do atendimento médico (ADLER & MOCTEZUMA, 2010, MURRAY *et al.*, 2000; KO *et al.*, 2009).

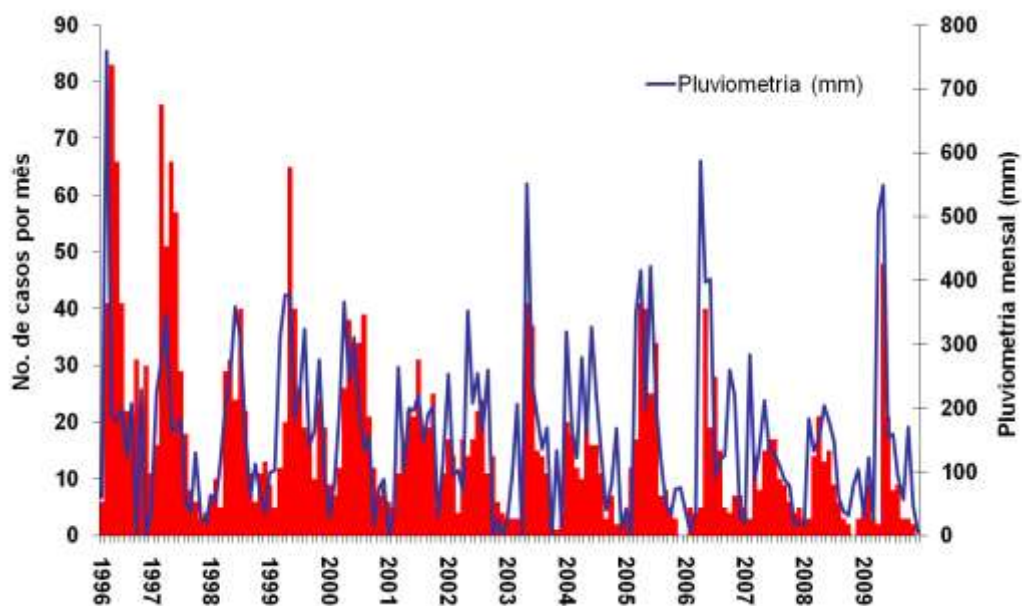
Entretando, a melhora clínica somada a grande dificuldade de diagnosticar a leptospirose durante a sua fase inicial, permite que alguns casos sejam subdiagnosticados, possibilitando com a doença evolua para um quadro mais grave (BRASIL, 2009) dando origem à segunda fase, ictérica, denominada inicialmente como síndrome de Weil (LEVET, 2001; FAINE *et al.*, 1999). Apresentando as seguintes manifestações clínicas: icterícia como insuficiência renal aguda e a hemorragia pulmonar, chegando a uma letalidade 10% e 50%, respectivamente (FAINE *et al.*, 1999; BRASIL, 2009).

3.1.2. Epidemiologia

A leptospirose ocorre tanto em países industrializados, como em países em desenvolvimento, tendo uma maior prevalência nos países tropicais por conta dos fatores socioeconômicos e ambientais, que favorecerem sua transmissão (VINETZ *et al.*, 1996; TANGKANAKUL *et al.*, 2000). Comporta-se como uma doença sazonal, apresentando uma maior prevalência no período onde existe maior incidência de chuva, principalmente após inundações extremas (KO *et al.*, 1999; PAPPACHAN *et al.*, 2004).

A Figura 2 apresenta os gráficos da pluviometria em Salvador, Bahia, no período de 1996 à 2009, bem como os gráficos da epidemiologia de leptospirose, para o mesmo período, mostrando total superposição dos eventos.

Figura 2. Epidemias anuais de leptospirose grave em Salvador. Vigilância populacional em Salvador-BA entre os anos de 1996 a 2009 (N=2.711)



Fonte: Ribeiro, 2010.

A leptospirose foi considerada como uma doença que acometia trabalhadores rurais, veiculada principalmente por bovinos, ovinos e caprinos infectados pelas leptospiras. Porém, com o crescimento desordenado dos grandes centros urbanos, a leptospirose se apresentou como uma epidemia urbana, mudando de forma notável os padrões sociais e culturais que afetavam a doença (FERRO *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2003; SARKAR *et al.*, 2002). A rápida migração da zona rural para a zona urbana contribuiu para a expansão das cidades, de forma desordenada, sem infraestrutura e sem gestão urbana adequada, onde não há um sistema apropriado de coleta de lixo, resultando no aumento da infestação de roedores, consequentemente agravando o risco de transmissão da leptospirose (MASI, 2006). Esses fatores contribuem diretamente para uma má qualidade de vida e aumenta a desigualdade social, pois os moradores dessas localidades possuem baixo nível socioeconômico e de educação (REIS *et al.*, 2008).

A leptospirose é endêmica tanto na zona rural, como na zona urbana. Entretanto, no Brasil e outros países em desenvolvimento, o maior impacto na saúde pública acontece na zona urbana, principalmente nas regiões denominadas de favela, que abrigam grupos socioeconômicos com baixo poder aquisitivo, sem acesso à educação e saúde, residindo em condições precárias, onde podem existir córregos ou esgotos a céu aberto, susceptíveis a constantes enchentes, validando o risco de contrair leptospirose através do contato com água contaminada (REIS *et al.*, 2008; SARKAR *et al.*, 2002).

No Brasil existem alguns fatores que favorecem a alta incidência da leptospirose como a alta pluviosidade, típica de países presentes na região tropical, baixo nível socioeconômico em algumas regiões, coleta de lixo ineficiente e crescimento desordenado de grandes centros urbanos sem saneamento básico (KO *et al.*, 1999; FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Somado a esses fatores de risco associados à doença, o sucesso da transmissão é beneficiado pela densidade populacional dos reservatórios animais (FAINE *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2000).

No Brasil a leptospirose é um importante problema de saúde pública por apresentar alta incidência, elevada taxa de letalidade e alta taxa de internação hospitalar (SINAN, 2012). Entre os anos de 2000 e 2011 foram confirmados 44.447 casos de leptospirose (Figura 3), com 4.535 óbitos, média de 378 óbitos/ano e letalidade média no período de 10,7%. Entre os casos confirmados, 60,3% tinham faixa etária de 20 a 49 anos e 78,6% compreendiam indivíduos do sexo masculino. Dos quais 61% ocorreram na área urbana e 19,9 % na área rural (BRASIL, 2013).

Figura 3. Casos confirmados e coeficiente de letalidade (%) por leptospirose, registrados durante os anos de 2000 a 2011, no Brasil.



Fonte: SVS/MS, 2013.

O mesmo se aplica aos trabalhadores que prestam serviços de saneamento ambiental, devido ao contato constante com ambientes contaminados pelo patógeno, onde há falta de saneamento básico, lugar propício a manutenção da alta população dos roedores, principais disseminadores de leptospiras no ambiente (KO *et al.*, 1.999; BRASIL, 2006; MCBRIDE *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2007).

Revisões sistemáticas estimam uma média global de incidência anual, excluindo os surtos, com uma taxa de 5 casos por 100.000 habitantes. Estudos têm mostrado que, mundialmente, os casos de leptospirose podem chegar a valores altos: Região Africana (95,5 casos por 100.000 hab), Américas (12,5 casos por 100.000 hab) e Europa (0,5 por 100.000 hab). Em algumas áreas, a incidência chega a 975 casos por 100.000 hab., segundo o *World Health Organization* (2011). É provável que este valor seja inferior ao valor real, uma vez que muitos casos da leptospirose não são diagnosticados, por conta da falta de conhecimento sobre a doença e pelas dificuldades na realização de testes de confirmação laboratorial. A incidência da doença vem crescendo globalmente com o passar do tempo, por conta da precariedade das condições de vida urbana. Acredita-se que mais de um bilhão de habitantes no mundo não tem acesso a serviços básicos, agravando o quadro epidemiológico da leptospirose (BRASIL, 2006).

Aliado a isso, em lugares que apresentam altas ocorrências de doenças febris é frequente ocorrer erros de diagnósticos (MCBRIDE *et al.*, 2005; FAINE *et al.*, 1999). Casos de leptospirose são confundidos com outras doenças endêmicas, como dengue e malária (BARTHI *et al.*, 2003, KO *et al.*, 1999;). Portanto, fatores comportamentais e sociais devem ser considerados como interpretação de dados e confirmados por análises laboratoriais, que é uma ferramenta essencial para evitar casos subdiagnosticados (DERRICK, 1969). No ano de 1996 foi detectada em Salvador a ocorrência de um surto de leptospirose, durante uma epidemia de dengue, onde 35% dos pacientes hospitalizados com leptospirose foram diagnosticados com dengue (KO *et al.*, 1999). Esse dado leva a crer que a leptospirose deve ter uma prevalência maior do que a encontrada nos registros de vigilância (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Com o surgimento das grandes favelas nos centros urbanos, a leptospirose foi vista como um problema de importância epidemiológica, pois passou a apresentar elevadas taxas de morbidade e mortalidade (VASCONCELOS *et al.*, 2012). Aliada a formação deste novo cenário, existe uma carência de informações referentes à evolução da doença, assim como falta de conhecimento sobre os fatores que influenciam a sua infecção, tornando difícil implementar intervenções eficazes para o seu controle (RIBEIRO, 2008). Dessa forma foi esperado que a leptospirose se tornasse um problema global, apresentando surtos anuais (SARKAR *et al.*, 2002; TASSINARI *et al.*, 2008). Um surto ou epidemia existe quando há um aumento de casos de uma determinada doença, em um dado período de tempo e área geográfica, em comparação com um período anterior (EVANS, 1998).

3.2. Agente etiológico: *Leptospira*

3.2.1. Classificação Taxonômica

O gênero *Leptospira* pertence à Ordem: *Spirochaetales*, composta por 14 gêneros e à família *Leptospiraceae*, distribuídas em três diferentes gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella* (LEVETT, 2001; MURRAY *et al.*, 2000).

Um dos temas mais complexos em relação ao estudo deste patógeno se refere a sua diversidade, principalmente pelas inúmeras tentativas de classificação taxonômica (FAINE *et al.*, 1999).

Inicialmente o gênero *Leptospira* era classificado fenotipicamente, em *Leptospira* patogênica, como o próprio nome diz, corresponde ao grupo que tem capacidade de causar a doença e *Leptospira* saprófita, sendo este, organismo de vida livre, não possuindo atividade patogênica. Em seguida esses dois grandes grupos foram identificados nas respectivas espécies: *Leptospira interrogans*, e *Leptospira biflexia* (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003).

Em 1987, Yasuda *et. al.* aproveitando o avanço da ciência e de técnicas da biologia molecular, conseguiram adotar a classificação genotípica. E hoje, através do sequenciamento de alguns genes foram identificadas 16 genomoespécies e mais de 200 sorovares, fornecendo um bom fundamento para a presente classificação (LEVETT, 2007; KO *et al.*, 2009, NALAM *et al.*, 2010).

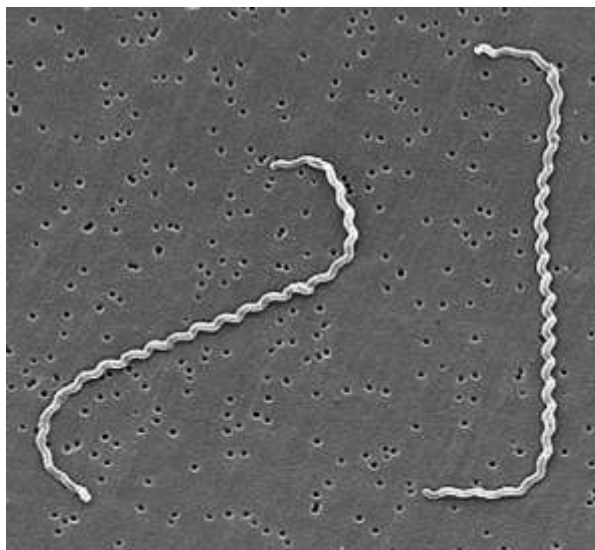
Os sorovares são identificados com base na sua composição antigênica, principalmente em relação às características dos lipopolissacarídeos (LPS) de superfície, considerado um importante determinante antigênico. A identificação do sorovar ocorre através de métodos que observam a aglutinação microscópica com absorção de aglutininas cruzadas. Sendo assim, dois ou mais sorovares são classificados em sorogrupos de acordo com suas semelhanças antigênicas (KMETY & DIKKEN, 1992).

Essa classificação é de grande relevância, pois conhecer os sorovares prevalentes em cada região é importante para a investigação epidemiológica, já que os sorovares variam entre diferentes regiões e produzem uma diversidade de fatores dentro do quadro clínico, por conta dos diferentes graus de virulência (SONGER & THIERMANN, 1988). A maioria dos casos que acontecem em Salvador está associada ao sorovar Copenhageni, onde *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* são os reservatórios mais comuns desse sorovar (KO *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2008).

3.2.2. Microbiologia

Morfologia: As leptospiiras (do grego *leptos*, fino, pequeno, delicado e *speira*, espira) são espiroquetas, de forma curta, regular e helicoidal. Apresentam aproximadamente 0,1 micrômetro de diâmetro e entre 6 e 22 micrômetros de comprimento (Figura 4), com as extremidades encurvadas, em forma de gancho (FAINE *et al.*, 1999).

Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae*



Fonte: Levett, 2001.

Possuem flagelos periplasmáticos que impulsionam seu movimento e sua flexibilidade, facilitando a penetração através da pele dos animais. A sua morfologia não difere entre as espécies que compõem este gênero, impossibilitando a sua utilização na classificação (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Sua estrutura e organização química são semelhantes às bactérias Gram-negativas, possuindo membrana externa que envolve a célula e a capa peptidoglicano da parede celular (ADLER & FAINE, 2006).

Metabolismo: São espiroquetas com respiração aeróbica obrigatória, que utilizam o oxigênio como aceptor final da cadeia de transportes de elétrons (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Catalase e oxidase positiva, uma defesa para esses organismos, pois a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) e o peróxido de hidrogênio é formado durante a respiração aeróbica normal, porém é uma

substância tóxica para as células (GREEN *et al.*, 1967; FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). O crescimento bacteriano exige a disponibilidade de alguns nutrientes, como fontes de carbono, nitrogênio, ferro, fósforo e outros minerais os quais as bactérias poderão sintetizar precursores de macromoléculas e vitaminas (PEREIRA, 2008). Leptospiras podem encontrar esses nutrientes no esgoto, que possuem uma composição de aproximadamente 99,9% de água e 0,1% de sólidos orgânicos, inorgânicos e microorganismos (VON SPERLING, 1996).

Utilizam na sua nutrição vitaminas dos tipos B1 e B12, que estimulam o seu crescimento (STALHEIM & WILSON, 1964), assim como íons de Ferro, que são essenciais para o crescimento tanto de leptospiras saprófitas, como das patogênicas. Têm a capacidade de utilizar várias fontes de ferro, incluindo sais de ferro ferroso e de sais férrico (HENNEBERRY & COX, 1970), além de ácidos graxos que funcionam como fonte de carbono e energia. A amônia é obtida na desamonificação de aminoácidos, para servirem como fonte de nitrogênio (FAINE *et al.*, 1999).

Crescimento/Sobrevivência: Muito do que se sabe sobre faixas ideais para o crescimento de leptospiras vem através de simulações das condições naturais, realizadas *in vitro*. Experimentos laboratoriais revelam que leptospiras saprófitas crescem a 11-13°C, enquanto leptospiras patogênicas não conseguem crescer a 13°C, e ambas possuem o desenvolvimento ótimo de 28-30°C, sendo que as patogênicas se desenvolvem bem a uma temperatura de 37°C, típica de um reservatório animal. Tanto as saprófitas, como as patogênicas apresentam um crescimento ótimo no intervalo de pH 7,2-7,6, sendo sensíveis ao pH ácido, inferior a 6,8. Condições aeróbicas e uma indefinida concentração de CO₂ inicial são essenciais para o início do seu crescimento (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Poucos estudos como os de Alston e Broom (1958) e Larson *et al.* (1957) publicaram sobre curvas de crescimento de *Leptospira*. O que se sabe é que seguem as mesmas fases que são observadas em outras bactérias, com a diferença que o tempo é longo, variando de três horas para espécies saprófitas e entre 8 a 18 horas para espécies patogênicas, apresentando a fase de atraso, logarítmica e estacionária (FAINE *et al.*, 1999). Para outras bactérias, o tempo de geração varia entre diferentes microorganismos, podendo ser de 10 a 20 minutos até

dias, sendo que em muitos dos microrganismos conhecidos, o tempo varia de 1 a 3 horas (BRASIL, 2013).

Leptospira tem capacidade de sobreviver em solos alcalinos, rios, córregos, animais vivos e até mesmo mortos (PEET *et al.*, 1983). Não existe um padrão que determine o tempo de sobrevivência de *Leptospira* no ambiente. A sua sobrevivência tem relação com variáveis ambientais e climáticas, tais como índice pluviométrico, umidade e calor (REIS *et al.*, 2008; HARTSKEERL, 2006). Com isso, cada ambiente permitirá maior ou menor tempo de sobrevivência das (VIAU & BOEHM, 2011).

Existem alguns trabalhos realizados com amostras ambientais e conduzidos em laboratório através da inoculação do patógeno, porém eram metodologias que controlam os fatores que determinam a sobrevivência do organismo (CHANG *et al.*, 1948; OKAZAKI & RINGEN, 1957; HENRY & JOHNSON, 1978). Estudos concluíram que *Leptospira* não sobrevivem a um ambiente seco, com alta salinidade ou pH tendendo a ácido (FAINE *et al.*, 1999).

3.3. Reservatórios

3.3.1. Reservatórios animais

Alguns animais, como gatos, cachorros, porcos, cavalos e ratos são susceptíveis a terem infecção crônica, liberando leptospiros no ambiente, através da urina. Essa capacidade de descarga do patógeno no ambiente se dá em virtude do pH relativamente alcalino de sua urina (BABUDIARI, 1958; FAINE *et al.*, 1999).

Apesar dessa variedade de animais que funcionam como possíveis reservatórios de *Leptospira*, os roedores são os mais importantes, tanto no ambiente urbano, como no rural (DE FARIAS *et al.*, 2008; MASI *et al.*, 2008). Também, dentre a infinidade de espécies de roedores, três espécies são consideradas sinantrópicas, isto é, que convivem próximas ao homem, onde encontram água, abrigo e alimento para sobreviver e são responsáveis por gerar problemas de saúde pública. São eles: *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato-de-telhado) e *Mus musculus* (camundongo), onde o *Rattus norvegicus* apresenta-se como o mais eficiente

reservatório na eliminação de leptospiras no ambiente, contaminando o solo e a água (VINETZ *et al.*, 1996; SUNBUL *et al.*, 2001).

Os roedores, mesmo quando estão infectados com leptospiras, normalmente são doentes crônicos e assintomáticos. Entretanto, possuem grande receptividade à infecção, com reduzida patogenicidade, pelo seu estado assintomático, presença de infecção renal com infecção crônica e transmissão eficaz das leptospiras (BHARTI *et al.*, 2003). Comumente a infecção é adquirida quando são juvenis e a frequência da excreção pela urina aumenta com sua idade (LEVETT, 2001; JANSEN, 2005).

Outra informação inerente aos reservatórios é que algumas espécies possuem afinidade com determinados sorovares, no entanto esta especificidade do hospedeiro não é sorovar exclusiva e muitos reservatórios podem ser hospedeiros de vários sorovares, que se alojam nos túbulos proximais dos rins, podendo persistir nesta região durante semanas ou até mesmo anos (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003). Não se sabe em geral se essa associação de espécies-hospedeiras e sorovar de *Leptospira* é baseada em fatores imunológicos, ou em relações ecológicas (FAINE *et al.*, 1999). O que se sabe é que essa associação pode ser um bom indício a investigação epidemiológica (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003).

3.3.2. Reservatórios ambientais

Apesar do conhecimento referente à associação dos casos de leptospirose com o índice de pluviosidade, estudos epidemiológicos sugerem que o modelo de transmissão de leptospirose por inundações está incompleto. Alguns casos ocorrem meses após chuvas fortes, ou em meses que não são típicos de chuva, assim como nem sempre há leptospirose após inundações, indicando que a habilidade do patógeno sobreviver no ambiente é um importante fator de transmissão (GANOZA *et al.*, 2006; BARRAGAN *et al.*, 2011). Uma série de estudos realizados (SMITH & SELF, 1955; HENRY & JOHNSON, 1978; JOHNSON & HARRIS, 1967) tinha como objetivo testar a habilidade do patógeno sobreviver em diferentes condições ambientais, verificando se essas características influenciavam na transmissão da doença, observando diferenças entre

L. saprófitas e L. patogênicas e testando técnicas mais eficientes na detecção de *Leptospira*.

Alguns estudos já mostraram que a persistência de *Leptospira* patogênica sobreviver no ambiente depende do pH, temperatura, baixa concentração de bactéria e baixa salinidade, ou seja, de fatores ambientais que influenciam na presença de *Leptospira* (CHANG *et al.*, 1948; SMITH & TURNER, 1961, DIESCH *et al.*, 1969; HENRY *et al.*, 1971; PARKER & WALKER, 2011). Porém, essa relação não tem sido sistematicamente pesquisada, ainda que seja confirmado que leptospiros podem sobreviver por meses em água e solo, sob a influência dessas variáveis (CHANG *et al.*, 1948; OKAZAKI & RINGEN, 1957; HELLSTROM & MARSHALL, 1978).

Os primeiros estudos que utilizaram solo e água como fontes de investigação do comportamento de *Leptospira* já apontam o interesse de explorar sua distribuição em amostras ambientais. Diferentes tipos de água, como rio, córrego, lago podem interferir no tempo de sobrevivência de leptospiros, por causa da relação do organismo com as condições ambientais (KHAIRANI-BEJO *et al.*, 2004).

Dentre os primeiros trabalhos que analisaram esse aspecto, o proposto por Sawyer e Bauer (1928) teve como objetivo verificar se a bactéria apresentava capacidade de sobreviver em água estagnada. Ele observou que, dentro das condições aplicadas em laboratório, as leptospiros conseguiam sobreviver até 55 dias nas amostras de água. Seguindo essa mesma linha, Chang *et al.* (1948) tentou determinar o tempo de sobrevivência de leptospiros em água pura e esgoto, isolando o patógeno através de meio de cultura. Esses trabalhos tiveram como resultado a evidência que leptospiros podem sobreviver no ambiente por dias e até meses, dependendo das condições ambientais, que incluem presença de nutrientes, além de fatores inerentes as amostras ambientais (HENRY & JOHNSON, 1978; VIAU & BOEHM, 2011).

Esses trabalhos também evidenciam que diferentes tipos de água (rio, córrego, água do mar, lago, dentre outros) possuem características físico-químicas variadas, influenciando diretamente no maior ou menor tempo de sobrevivência de *Leptospira* (KHAIRANI-BEJO *et al.*, 2004).

Esses estudos também trazem resultados bem variados referentes aos fatores ambientais e diversidade de sorovares. Chang *et al.* (1948) indicou que a decomposição da matéria orgânica era um potencial de estresse, por interferir na variação de pH, onde a presença de bactérias decompositoras e uma pequena concentração de nutrientes diminuía o pH do meio, observando também que o pH neutro tornava o ambiente favorável para um maior tempo de sobrevivência. Okazaki & Ringen (1957) e Parker & Walker (2011) identificaram em seus experimentos que temperaturas acima de 40°C reduziam o tempo de sobrevivência do organismo.

Smith e Turner (1961) analisaram a influência do pH em uma variedade de sorovares, indicando diferença significativa entre eles. Quando diferentes sorovares foram submetidos a uma variação de pH na faixa de (5,3 a 8,0) o tempo de sobrevivência aumentou com o aumento desta variável, apresentando diferenças significativas entre os sorovares.

Os estudos de Pereira (2008) mostraram que o solo constitui um sistema muito dinâmico e organizado, representando um excelente meio para a sobrevivência e proliferação de uma variedade de organismos. Fatores como arejamento e condições de umidade, além de reações e teor nutritivo estabelecem a presença de microorganismos. Trabalhos como o de Henry & Johnson (1978) e Smith & Self (1955) apontam uma maior afinidade em relação ao solo, quando também foi detectada a presença de *Leptospira* em amostras de água adjacente. O mesmo tipo de interação é estudado sobre a estrutura do solo, considerando que, apesar de apresentar uma diferença de positividade entre diferentes tipos de solo, o principal fator que interfere na presença de *Leptospira* é a umidade do solo (KHAIRANI-BEJO *et al.*, 2004).

As propriedades físicas do solo são de fundamental importância para caracterização e manutenção de parâmetros que atuam sobre o solo, considerando que fatores geológicos do solo e estrutura da rocha determinam quanto tempo o solo manterá sua umidade (BRAGAGNOLO & MIELNICZUCK, 1990). É sugerido que a estrutura argilosa do solo, pela sua grande capacidade de absorver e manter a umidade permite a sobrevivência de leptospiros, porque podem encolher e rachar em períodos de seca, para que os colóides argilosos possam reter a umidade, permitindo assim absorver

microorganismos. Presumi-se que essas condições permitam que leptospiros sobrevivam por mais tempo dentro das condições de estiagem (ELDER *et al.*, 1986).

Um dos maiores empecilhos para se determinar o risco de transmissão de leptospirose pelo ambiente está em conseguir isolar o patógeno, pois muitas técnicas não permitem a diferenciação entre espécies patogênicas e espécies saprófitas (CRAWFORD *et al.*, 1969). A exemplo do isolamento pelo meio de cultura, onde leptospiros saprófitas competem pelo mesmo nutriente, e por ter um tempo mais rápido de crescimento, terão vantagem em relação as leptospiros patogênicas (FAINE *et al.*, 1999; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Existe um risco do observador confundir partículas com espiroquetas, quando as amostras são observadas através do exame de campo escuro (CHANDRASEKARAN & GOMATHI, 2004; KABOOSI *et al.*, 2010). Pesquisas têm focado em técnicas para isolar e detectar leptospiros em águas superficiais, com mais especificidade e menos passíveis aos erros (LEVETT, 2001; BUNNELL *et al.*, 2003). Entretanto, mesmo com a utilização de técnicas mais sensíveis a detecção de *Leptospira*, pode ocorrer erros na sua metodologia (RIEDIGER, 2007). Meites *et al.* (2004) em seu experimento obteve duas amostras positivas através da microscopia de campo escuro, e as mesmas foram negativas por PCR (PCR apresenta uma maior sensibilidade na detecção).

Outros estudos apontam uma diferença na concentração de *Leptospira* patogênica em águas superficiais entre área rural e urbana, onde a última, por apresentar condições favoráveis, indicam maiores níveis de concentração do patógeno, associando essa diferença com casos graves de leptospirose (GANOZA *et al.*, 2006). Concentrações mais baixas de leptospiros são inativadas pela resposta do sistema imunológico do hospedeiro, ao contrário de concentrações mais elevadas, porque antes do patógeno ser eliminado, existe um aumento da toxina, aumentando o grau de infecção (FAINE *et al.*, 1957).

Johnson & Harris (1967) para determinarem a diferenciação entre organismos patogênicos e saprófitos, realizaram um experimento que identificava a temperatura mínima para o crescimento desses dois grupos filogenéticos. Culturas de *Leptospira* foram mantidas em diferentes temperaturas. A temperatura mínima de crescimento das

leptospiras patogênicas é entre 13°C e 15°C. As leptospiras saprófitas apresentaram uma temperatura mínima de crescimento entre 5°C e 10°C, cerca de 5°C abaixo da temperatura dos agentes patogênicos, existindo uma predominância de *Leptospira* saprófita, pois essas crescem mais rápido e competem pelos mesmos nutrientes (GANOZA *et al.*, 2006).

Essa variação foi observada por Smith & Turner (1961), a partir de diferentes genomoespecies, que foram expostos a diversos valores de pH, apresentando como consequência um aumento da variação no tempo de sobrevivência. *L. icterohaemorrhagiae* sobreviveu por cerca de 10 dias a um pH 7,0, mas esteve presente por mais de três meses, quando o pH estava levemente acima deste nível. O mesmo foi observado com o genomoespecie *Leptospira Hyos* sobrevivendo durante 10 e 30 dias na faixa de pH (5,3-6,8) e durante 30 a 80 dias a níveis de pH mais elevados. *L. australis* A também apresentou um tempo médio de sobrevivência com cerca de 70 dias em pH 5,3 aumentando 110 dias em pH 8,0.

Seja para estudos clínicos, como para estudos ecológicos da leptospirose, os métodos moleculares permitem uma maior precisão referente às fontes de transmissão (CORNEY *et al.*, 1997). O método de PCR surgiu através dos avanços científicos e tecnológicos, possibilitando que todas leptospiras presentes na amostra fossem detectadas (MURGIA *et al.*, 1997). A PCR é uma técnica molecular simples que provou ser mais específica e sensível do que métodos diagnósticos convencionais, permitindo a partir de um pequeno fragmento do DNA de interesse, a sua amplificação até um número detectável (ASHFORD *et al.*, 1995; SOINI *et al.*, 1994).

Porém, estudos como os de Aviat *et al.* (2009), Vital-Brazil (2010) e Viau & Boehm (2011) utilizavam *primers* que não eram específicos de leptospiras patogênicas, mantendo a mesma falha presente em outros métodos diagnósticos. Outra carência estava na limitação em informar apenas a presença do organismo, já que eram métodos qualitativos.

3.4. Barreiras na prevenção da leptospirose

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece o grau de risco e prováveis fontes de infecção através de informações relevantes que ajudam na investigação epidemiológica, para a partir daí estabelecer medidas de higiene, ações continuadas de informação, utilização de EPIs para evitar o contato com o ambiente contaminado (BRASIL, 2005).

Técnicas e diagnósticos laboratoriais: Existem diversos métodos que podem confirmar o diagnóstico de leptospirose. Alguns se baseiam na detecção de anticorpos presentes no sangue, logo após o início dos sintomas, aproximadamente entre 5 a 7 dias de infecção, outros na observação direta ou indireta da bactéria, além dos que fazem a detecção do material genético presente em diversos tipos de amostras (JOUGLARD, 2005).

O isolamento por meio de cultura possibilita a identificação do sorovar infectante, porém essa técnica apresenta baixa sensibilidade, por ser facilmente contaminada, permitindo o crescimento de leptospiras saprófitas. Essas, ao competirem por nutrientes com leptospiras patogênicas levam vantagem, já que as características metabólicas favorecem as saprófitas, prejudicando o isolamento de espécies patogênicas (FAINE *et al.*, 1999; TURNER, 1970). Essa técnica possui um rápido processamento, porém seu resultado tende a ser demorado. Inúmeros meios artificiais já foram descritos, tanto na forma líquida, como semi-sólida e sólida, no entanto o meio mais utilizado atualmente é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris – EMJH (ELLINGHAUSEN J.R. & MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON & HARRIS, 1967; ELLINGHAUSEN JR., 1983).

A detecção de anticorpos pode ocorrer pela soroaglutinação microscópica (SAM), tendo como base a aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes, com respectivos antígenos de natureza lipopolissacarídica, de membrana de vários sorovares de *Leptospira*. Porém, pela possibilidade de ocorrerem reações cruzadas, apresenta um viés no resultado, por dificultar a identificação do sorovar infectante. Outro teste sorológico é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), também chamado antígeno gênero-específico. Nesse teste não se faz necessário a utilização do antígeno, por detectar apenas anticorpos da classe IgM e IgG, correlacionando apenas

o tempo de infecção. Porém ambos os testes apresentam baixa sensibilidade no início do quadro clínico, impossibilitando diagnósticos precoces (PLANK & DEAN, 2000; LEVETT, 2001).

A utilização da microscopia na visualização direta de leptospiros aumenta a chance de identificar o patógeno quando este está vivo, pois sua motilidade facilita a sua observação. No entanto, a baixa sensibilidade neste método está na possibilidade do observador confundir as leptospiros com outras partículas presentes na amostra, além do que, como não é possível diferenciar as patogênicas das saprófitas, não é um método recomendado para diagnóstico ambiental. Além disso, a não visualização das espiroquetas não confirma que elas não existem no meio em estudo, sendo necessária a confirmação por outros testes (AHMAD *et al.*, 2005; KABOOSI *et al.*, 2010).

Dentre as técnicas baseadas na detecção de DNA, a reação em cadeia de polimerase (PCR) está cada vez mais em uso, pela facilidade da obtenção do material genético de *Leptospira* e por não necessitar da presença de anticorpos, sendo um excelente diagnóstico na fase inicial da doença, confirmando e diferenciando o gênero, o que oportuniza o tratamento dos pacientes antes que a doença progrida (AVIAT *et al.*, 2009; GORDON *et al.*, 2008; VITAL-BRAZIL, 2010).

Vacina: O tratamento da leptospirose está relacionado com os sintomas e a fase da doença. O tratamento com antibióticos e hidratação é suficiente para recuperar pacientes no estágio inicial da doença, evitando complicações e a evolução da mesma. Caso não ocorra uma intervenção na fase inicial e a leptospirose progrida para a forma grave, a depender do quadro clínico, é necessário uma intervenção maior, baseada em diálise e internação em unidades de terapia intensiva (UTI) (BHARTI *et al.*, 2003). Normalmente as leptospiros são sensíveis à maioria dos antibióticos, apresentando resistência apenas ao cloranfenicol e rifampicina (FAINE *et al.*, 1999).

As vacinas começaram a ser produzidas a partir de culturas mortas de *Leptospira* na década de 1920, para proteger homens, cães e outros animais domésticos (FAINE *et al.*, 1999). Diversas vacinas que atuam na prevenção da leptospirose foram desenvolvidas e até mesmo são utilizadas com sucesso em países como Rússia, China e Cuba principalmente em períodos de inundação, porém são vacinas que não

protegem contra todos os sorovares, por conta da sua especificidade, sendo muitas vezes necessário o uso da vacina que combata o sorovar prevalente de uma determinada região, através da sua prévia identificação (CHEN, 1985). Não existem registros da duração de proteção após sua utilização, além de apresentarem uma série de efeitos colaterais como náusea, dor e febre (TORTEN *et al.*, 1973). Esses resultados sinalizam que é necessário compreender mais a imunidade da leptospirose e investigar a variabilidade dos sorovares, com o intuito de encontrar vacinas mais eficazes (BHARTI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007).

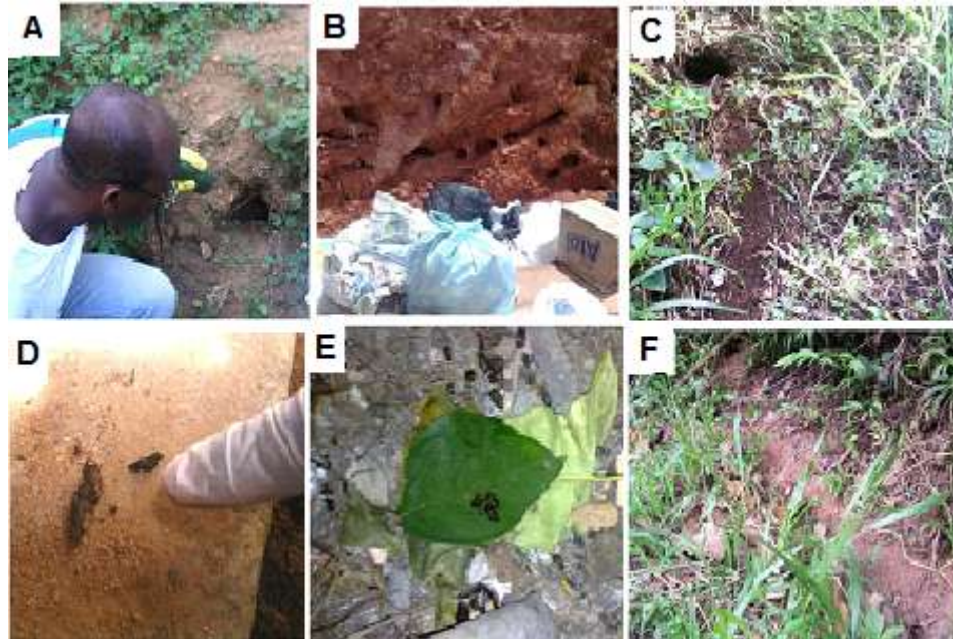
Profilaxia: A profilaxia é um método preventivo que pode acontecer antes ou após a infecção. Ela normalmente é empregada em trabalhadores que poderão se encontrar em situação de risco, numa área com alta prevalência da leptospirose. A profilaxia ocorre através do uso da quimioprofilaxia pré-exposição, a exemplo do uso de antibióticos. A quimioprofilaxia pós-exposição é indicada em situações de exposição de alto risco, com um potencial contato com *Leptospira* (FAINE *et al.*, 1999).

Controle de roedores Reservatórios: Roedores sinantrópicos distribuem-se no espaço de acordo com a acessibilidade de recursos essenciais à sua sobrevivência, considerando que o tamanho de sua população é determinado pelo suporte que o ambiente oferece e seus fatores limitantes, tais como: água, abrigo e competição. Condições ideais que irão permitir que a população explore seu potencial de crescimento (POCOCK *et al.*, 2004).

A constatação da infestação de roedores é realizada com base na observação de vestígios dos animais, como presença de fezes, tocas ativas e gordura (Figura 5). Além desses indícios, são coletadas informações sobre as condições ambientais, referentes à disponibilidade de alimento, abrigo, imóveis e áreas adjacentes. Esses dados têm o objetivo de implementar e direcionar os programas de controle de roedores (DAVIS *et al.*, 1974). Esses programas fundamentam-se no controle químico das populações com rodenticidas. Porém, só esse controle não é suficiente, caso não haja uma conciliação com o manejo ambiental com o objetivo de reduzir a capacidade suporte do ambiente. A intervenção ambiental, principalmente as que estão relacionadas com as condições de saneamento ambiental, educação e renda oferecem um resultado permanente

quanto à diminuição da população de roedores, porque reduzem de maneira significativa as fontes de alimento e acesso (MASI *et al.*, 2008).

Figura 5. Variáveis ambientais relacionadas com fonte de comida, água, abrigo e acesso para roedores. Fotografias de vestígios dos roedores, tocas (A, B e C), fezes de *Rattus norvegicus* (D e E) e trilha (C e F)



Fonte: modificado de Costa, 2010.

4. METODOLOGIA

4.1. Estudo multidisciplinar da leptospirose urbana

O grupo de leptospirose pertencente ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz juntamente com a universidade de Yale estão desenvolvendo estudos multidisciplinares em uma comunidade carente, para caracterizar a transmissão da leptospirose urbana e identificar possíveis estratégias de intervenção, com o intuito de prevenir a doença humana.

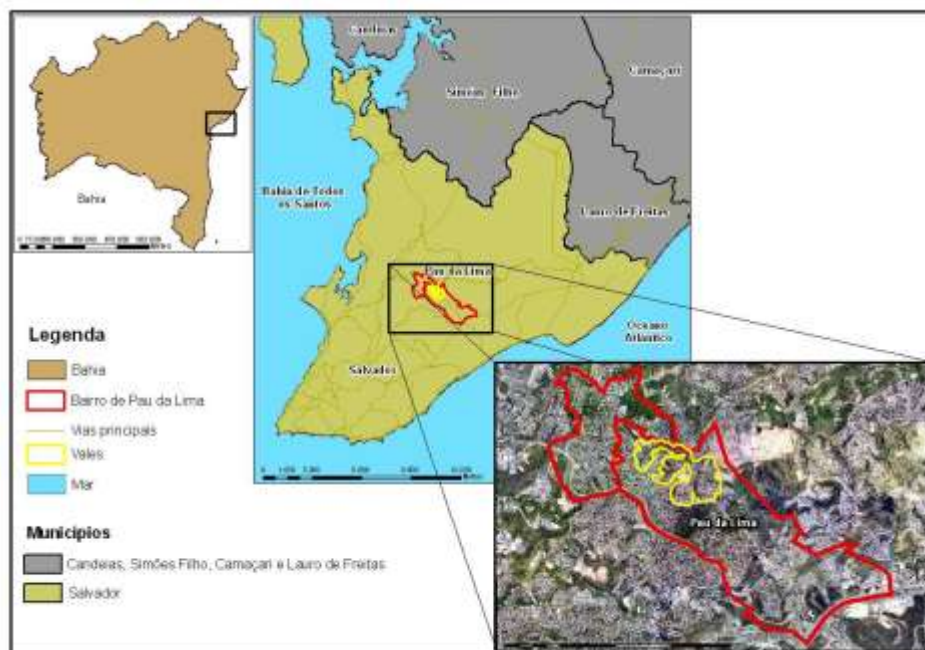
Esse projeto (R01 AI052473) é financiado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH) que integra os seguintes elementos: A) um componente humano para descrever a incidência da doença e identificar fatores sócio-demográficos e comportamentais associados a transmissão; aplicação de estudos de coorte, acompanhando anualmente 2.300 pessoas, analisando a sorologia e aplicando questionários para identificar infecção assintomática por leptospiras, quando são identificados casos graves pela equipe no Hospital Couto Maia. B) um componente relacionado ao hospedeiro reservatório, o rato de esgoto, caracterizando sua ecologia, transmissão intraespecífica de leptospiras e fatores genéticos das populações de roedores. O desfecho final da ecologia de roedores se dá através de um modelo matemático, para prever o risco de excreção por leptospiras e suas variações espaço-temporais. C) um componente ambiental para identificar a sobrevivência de leptospiras no ambiente, caracterizando os reservatórios ambientais, como água e lama, as variações nas taxas de contaminação e densidade de contaminação, assim como as suas variações espaço temporais e associação com o risco de infecção nos homens. Como parte deste último componente, o estudo desenvolvido aqui contribui com o projeto geral, identificando as possíveis causas da presença e sobrevivência de *Leptospira* no ambiente.

4.2. Local do estudo

A área utilizada para o presente estudo localiza-se no bairro de Pau da Lima em Salvador, capital da Bahia, que possui uma população equivalente a 2.675.656 habitantes e uma área de 693km², sendo a principal metrópole da Região Nordeste do Brasil e a terceira cidade do país em população, superada apenas por São Paulo e pelo Rio de Janeiro (IBGE, 2010), resultado de um intenso processo de urbanização no centro da cidade e entorno (PORTO & CARVALHO, 2001).

A comunidade de Pau da Lima (Figura 6) está localizada no centro da cidade e apresenta a segunda maior incidência de casos de leptospirose na capital, sendo superada apenas pelo subúrbio ferroviário. Segundo o IBGE (2002) possui uma população de 35,3 mil habitantes, onde os chefes dos domicílios têm uma renda média mensal de pouco mais de um salário mínimo.

Figura 6. Área de estudo. O bairro de Pau da Lima (delimitado por uma linha vermelha). Dentro do bairro de Pau da Lima está definido (linhas amarelas) o local de estudo.



Nessa região a Fiocruz-BA vem desenvolvendo atividades de pesquisa sobre leptospirose de Pau da Lima, com participação dos moradores e associações existentes. A região de estudo possui uma população de aproximadamente 14.122

habitantes vivendo em 0,46km². Essa área é composta por quatro vales, caracterizados pela falta de saneamento, presença de população carente que normalmente possui o ensino fundamental incompleto (66%) e a renda média *per capita* é de R\$5,00/dia por morador. A área apresenta elevada incidência de casos de leptospirose (57,8 casos /100.000 habitantes) (REIS *et al.*, 2008). Entre os quatro vales, as coletas foram realizadas apenas no vale dois, já que o presente estudo não tem o objetivo de avaliar a variação entre os vales.

4.3. Desenho de estudo

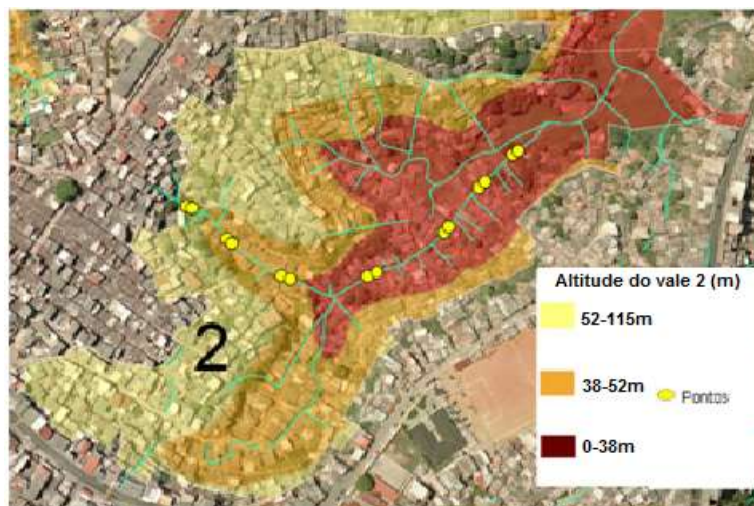
Para obtenção das amostras de água, o vale foi estratificado por nível com uma amostragem heterogêna. Esse desenho amostral se deu pelo intuito de verificar associação de fatores topográficos, examinando uma possível variação na concentração de *Leptospira* e diferentes riscos de infecção por nível, agrupando uma maior quantidade de pontos amostrais no fundo do vale, sob o argumento que seria uma área que apresenta maior risco de infecção. Examinar uma possível variação na concentração de *Leptospira*, relacionado à topografia, encontrou respaldo na literatura, pois foi comprovado que a altitude da residência no local do estudo foi um fator de risco para a leptospirose (REIS *et al.*, 2008).

As coletas foram realizadas apenas no vale dois por não ter o objetivo de avaliar variação entre os vales.

Por não existir informações contundentes sobre taxa de positividade de *Leptospira* patogênica, a quantidade de amostras foi baseada na capacidade de seu processamento e custo de reagentes, considerando os seguintes fatores categóricos:

A. Altura do vale: o vale foi dividido em três níveis de acordo a altitude, como mostra na Figura 7:

Figura 7. Altitude ao longo do vale dois (em metros) com os 14 pontos de coleta.



0l—38m (Nível baixo), contendo oito pontos de coleta.

38l—52m (Nível médio), contendo quatro pontos de coleta.

52l—115m (Nível alto), contendo dois pontos de coleta.

A distância entre os pontos é de 30m e cada ponto foi amostrado em duplicata, estando a uma distância de dez metros entre si.

B. Tipo de água: Em cada um dos 14 pontos de amostragem foram coletadas amostras de água, nas seguintes condições:

Córrego com esgoto - Definido como canal contínuo e aberto que veicula águas residuais proveniente dos domicílios (banheiro e cozinha) e água pluvial.

Água empoçada - Água acumulada ao nível do chão, sem conexão com esgoto ou qualquer tipo de água corrente.

C. Sazonal: As amostras foram coletadas durante o período de três dias na estação chuvosa (Julho/2011) e três dias estação seca (Janeiro/2012). As estações foram definidas seguindo o padrão de chuva apresentado na cidade de Salvador nos últimos dez anos.

D. Diária: Para avaliar se existe variação ao longo do dia foram coletadas amostras pela manhã, entre as 06h00 e 08h00, e pela tarde, entre as 15h00 e 17h00.

Durante os períodos (chuvoso e seco), as coletas foram efetuadas por uma semana, com três dias intercalados.

As matrizes de água foram balanceadas, consistindo em: uma amostra de água empoçada para cada amostra de córrego com esgoto.

O número de amostras é sumarizado no cálculo abaixo:

$$A = P \times T \times C \times D$$

Onde, define as letras

$$A = 14 \times 2 \times 2 \times 6 = 336$$

A=Amostras; P=Pontos de coleta; T=Turnos; C=Tipos de água; D=Dias.

4.4. Coleta de amostras

Os pontos amostrais, devidamente localizados com um GPS, foram previamente georreferenciado com auxílio do *software* Arcview 9.1, a fim de permitir que cada coleta de amostra incidisse exatamente desde o primeiro dia de coleta.

Para cada ponto de coleta de água de córrego com esgoto foi estabelecido um ponto equivalente para coleta de amostra de água empoçada. Quando não foi encontrada água empoçada disponível no ponto exato de coleta, a amostra foi coletada dentro de um raio de 2m a partir do ponto estabelecido. Não existindo poças de água neste raio, a amostra não foi coletada.

Os procedimentos para a coleta consistiu em submergir contra a corrente e na superfície do córrego, frasco de coleta de 400mL. Para a coleta de água empoçada, foi utilizado um frasco de coleta menor, com capacidade para de 50mL, onde em alguns pontos de água empoçada foi necessário utilizar seringas descartáveis para realização da coleta. Em seguida, o volume de 50mL de cada amostra foi transferido para tubos Falcon, previamente enumerados com um código referente ao local e data da coleta e tipo de água coletada. Esses tubos contendo as amostras foram acondicionados em

caixas térmicas e transportados ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM pertencente a FIOCRUZ-Bahia, onde foram processadas no período máximo de 18h, para verificação da concentração de *Leptospira*.

Para as análises físico-químicas, as amostras foram transferidas para sacos estéreis, acondicionadas em caixas térmicas e transportadas para o Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA) pertencente à Universidade Católica do Salvador (UCSal).

4.5. Análises laboratoriais

Previamente foi desenvolvido um ensaio de PCR Taqman quantitativo usando iniciadores específicos para o gene *lipL32*. No laboratório de patologia e biologia molecular (LPBM) da Fiocruz contamos com a máquina ABI 7500 na qual realiza a leitura da concentração de material genético. O gene *lipL32* foi escolhido como alvo porque é altamente conservado em espécies patogênicas de *Leptospira* e não está presente no genoma de leptospiros saprofitas. Para estimar a concentração de *Leptospira*, no laboratório, as amostras foram homogeneizadas invertendo os tubos do tipo Falcon cuidadosamente, por aproximadamente 10 vezes. Com o auxílio de uma pipeta graduada estéril, foi retirada uma alíquota de 40 mL de cada amostra de água (córrego com esgoto e água empoçada) em tubos do tipo Oak Ridge (tubos de centrifuga que suportam elevada velocidade).

Essas alíquotas foram centrifugadas a 15.000rpm por 20min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e os pellets (concentrado da amostra) respectivos, foram ressuspensos e posteriormente colocados em tubos do tipo eppendorfs com auxílio da pipeta Pasteur. Em seguida, foram centrifugados novamente por 3 minutos na velocidade máxima de 12,9rpm a 4°C e desprezados os sobrenadantes. Os eppendorfs referentes as amostras do mês de julho foram imediatamente congelados a -80°C e remetidos em gelo seco para o Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN). Os eppendorfs referentes as amostras do mês de janeiro foram preservadas a mesma temperatura na FIOCRUZ-BA, baseado no protocolo do CPqGM de preservação de DNA.

Extração de DNA: A extração do DNA dos pellets da primeira campanha foi realizada no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN - PR), pertencente à Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública do Brasil, localizado em Curitiba – PR. Após o descongelamento dos pellets, o DNA foi extraído usando o PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A extração do DNA dos pellets da segunda campanha foi realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM pertencente a FIOCRUZ-Bahia, obedecendo os mesmos procedimentos.

Quantificação do DNA bacteriano por qPCR: Para a detecção do gene *lipL32*, a mistura de reação consistiu de 12,5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 200 nM dos iniciadores senso (LipL32-45F) e anti-senso (LipL32-286R), 100 nM de cada sonda (LipL32-189 e QS-lepto-LipL32), 5 µL de DNA extraído (ou água ultrapura, no caso de controle negativos de DNA). O volume final da reação foi ajustado para 25 µL com água ultrapura. As reações de PCR em tempo real foram realizadas usando o equipamento ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O protocolo de amplificação consistiu de 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e anelamento e extensão a 60°C por 1 min. Foram considerados válidos Cts entre 34 e 38. O controle interno foi do tipo *armored DNA*, que é construído pela associação da estratégia de *overlapping extension PCR* com o uso de um vetor viral (bacteriófago M13), sendo utilizado em todas as amostras da primeira campanha, servindo de controle para a preparação, extração, amplificação e detecção do processo de cada amostra. A produção do inserto se deu pela técnica de *overlapping extension PCR* (HECKMAN & PEASE, 2007; STOCHER *et al.*, 2003) e o produto foi purificado usando kit comercial (Purelink PCR Purification kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e quantificado por espectrofotometria (ND-1000 Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O vetor viral M13mp18 (7.249 pb, GenBank X02513.1), derivado do bacteriófago M13 DNA simples-fita foi quantificado usando o espectrofotômetro (ND-1000 Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A ligação do inserto com o vetor seguiu uma proporção molar de 1 parte de vetor para cada três partes de inserto. A mistura de ligação consistiu de 3 µL de vetor digerido, 1 µL de T4 DNA Ligase

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1 μ L de tampão 5 \times , 1 μ L de produto de PCR purificado e água ultrapura para 10 μ L.

Análise físico-química: A aferição da temperatura foi realizada no campo, com o auxílio de um termômetro analógico. As medidas de salinidade, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos (TDS) foram aferidas com o auxílio de uma sonda multiparâmetro (Tetracon 325). O pH foi medido com o auxílio do pHmetro digital inoLab e a turbidez através do espectrofotômetro (Hach Lange), usando a seguinte metodologia do Standard Methods (APHA, 2005)

4.6. Análises estatísticas

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se as amostras possuem uma distribuição normal. Para avaliar se todas as amostras possuem distribuição normal, admitiu-se nível de significância, do teste de Kolmogorov-Smirnov, igual a 0,05. Logo, estabeleceram-se duas hipóteses:

H₀: Os dados seguem uma distribuição normal.

H₁: Os dados não seguem uma distribuição normal.

Como todas as variáveis não seguiram uma distribuição normal, onde foi rejeitado H₀, foram aplicados testes não paramétricos.

Para testar a diferença entre três grupos foi realizado o teste Kruskal Wallis, analisando se são verificadas diferenças significativas no comportamento de diferentes categorias de uma variável. Este teste é uma prova extremamente útil para decidir se K amostras independentes provém de populações diferentes. Os valores amostrais quase que invariavelmente diferem entre si e o problema é decidir se essas diferenças entre as amostras significam diferenças efetivas entre as populações, ou se representam apenas variações casuais, que podem ser esperadas entre as amostras aleatórias de uma mesma população. O teste Kruskal Wallis comprova a hipótese de nulidade, de que K amostras provenham da mesma população ou de populações idênticas com relação às medianas. A prova propõe que a variável em estudo tenha distribuição contínua e exige mensuração no mínimo ao nível ordinal (SIEGEL & CASTELLAN, 2006). Pode-se mostrar que, se as K amostras provém efetivamente da mesma população, isto é:

H₀: As amostras são provenientes da mesma população.

H₁: As amostras não são provenientes da mesma população.

Estatística de teste:

$$KW = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k n_j (\bar{R}_j - \bar{R})^2$$

Em que: k é o número de amostras ou grupos; n_j é o número de casos na j -ésima amostra; N é o número de casos na amostra combinada (a soma dos n_j 's); R_j é a soma dos postos na j -ésima amostra ou grupo; \bar{R}_j é a média dos postos na j -ésima amostra ou grupo e $\bar{R} = \frac{N+1}{2}$ é a média dos postos na amostra combinada.

Regra de Decisão: aceita-se a hipótese nula se KW é maior igual do que KW_{tabelado} ao nível de confiança estabelecido.

O teste de Mann-Whitney pode ser usado para testar se dois grupos independentes foram extraídos de uma mesma população quando são obtidas pelo menos mensurações em escalas ordinais para as variáveis estudadas. Este é um dos testes não-paramétricos mais poderosos, sendo uma alternativa muito útil para o teste paramétrico T de Student (SIEGEL & CASTELLAN, 2006).

Sejam X e Y variáveis aleatórias e independentes.

Hipóteses testadas:

H_0 : As duas amostras são provenientes da mesma população.

H_1 : As duas amostras não são provenientes da mesma população.

Estatística de teste:

$$\mu_{wx} = \frac{m(N+1)}{2}$$

$$\sigma_{wx}^2 = \frac{mn(N+1)}{12}$$

$$Z_{\text{calculado}} = \frac{W_x \pm 0,5 - m(N+1)/2}{\sqrt{mn(N+1)/2}}$$

em que:

W_x é a soma dos postos da amostra X .

m é o tamanho da amostra e X.

n é o tamanho da amostra de Y.

N é o tamanho da amostra.

Regra de Decisão: aceita-se a hipótese nula se Zcalculado é maior igual do que Ztabelado ao nível de confiança estabelecido.

A correlação mede o grau de associação entre duas ou mais variáveis (TOLEDO & OVALLE, 1985). Neste estudo, foram utilizadas duas variáveis e verificado a existência de correlação linear entre elas. Existem diversas maneiras de medir esta correlação. Aqui foi utilizado o coeficiente de correlação linear, em que pode ser utilizado o coeficiente de correlação de Pearson e o coeficiente de correlação de Spearman. O coeficiente de correlação de Pearson é indicado quando os dados seguem distribuição normal bivariada. Caso contrário, e indicado que o pesquisador utilize o coeficiente de correlação de Spearman. Para testar a força de associação entre concentração de *Leptospira* e os parâmetros físico-químicos durante diferentes estações do ano, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman.

Quando os pressupostos para a utilização do coeficiente de correlação de Pearson não são satisfeitos, uma alternativa é utilizar o coeficiente de correlação de Spearman.

Este coeficiente considera o posto das observações e não os valores das variáveis, logo, a magnitude dos valores observados não tem relevância. Para se utilizar este coeficiente, é necessário que as duas variáveis estejam em uma escala pelo menos ordinal. Os valores assumidos por estas variáveis devem ser dispostos em ordem crescente ou decrescente. Quando há empates, considera-se o posto médio.

O coeficiente de correlação de Spearman é dado por (SIEGEL & CASTELAN, 2006):

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N d_i^2}{N^3 - N},$$

em que $d_i = x_i - y_i$ é a diferença nos postos entre x_i (que é a i -ésima observação da variável X) e y_i (que é a i -ésima observação da variável Y).

Se existirem muitas observações empatadas é necessário aplicar um fator de correção,

$$T_x = \sum_{i=1}^g (t^3 - t_i)$$

que é dado por: , em que g é o número de grupos de diferentes postos empatados e t_i é o número de postos empatados no i-ésimo grupo. Logo, o coeficiente de correlação de Spearman é dado por:

$$r_s = \frac{(N^3 - N) - 6 \sum d^2 - \frac{(T_x - T_y)^2}{2}}{\sqrt{(N^3 - N)^2 - (T_x - T_y)(N^3 - N) + T_x T_y}}$$

Para a confecção dos gráficos estatísticos será utilizado o programa GraphPad Prisma para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise descritiva

Dentre as 336 amostras propostas no planejamento da pesquisa, foi coletado um total de 288 amostras, sendo 155 para o mês de julho e 133 para o mês de janeiro.

No mês de julho foram obtidas 84 amostras de córrego com esgoto e 71 amostras de água empoçada. No mês de janeiro foram obtidas 83 amostras de córrego com esgoto e 50 amostras de água empoçada. Tendo uma perda global de 14%, compreendendo 27% no mês de julho e 73% no mês de janeiro (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas

Período	Córrego com esgoto		Água empoçada		Total de amostras coletadas
	Amostras esperadas	Amostras coletadas	Amostras esperadas	Amostras coletadas	
Julho	84	84 (100%)	84	71 (84%)	155
Janeiro	84	83 (98%)	84	50 (60%)	133
Total	168	167 (99%)	168	121 (72%)	288

Das 168 amostras que seriam coletadas na matriz de água córrego com esgoto, houve apenas uma perda de amostra, pelo não acesso ao ponto, no dia e horário da coleta, sendo que a maior perda de amostras se concentra na matriz de água empoçada e no período de janeiro. Durante o período da amostragem, esse mês apresentou uma baixa pluviosidade, e por conta da matriz de água empoçada ser formada principalmente por água de chuva, alguns pontos amostrais não continham água para coleta de amostras.

Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas e microbiológica

Variável	Julho/2011	Janeiro/2012	Total
Mediana (Mínimo e Máximo)			
Concentração de <i>Leptospira</i>	5 (5 - 432) GEq/mL	5 (5 -28) GEq/mL	5 (5 - 432) GEq/mL
Temperatura	24 (21 - 27,5)°C	28 (24 - 36)°C	25 (21 -36) °C
pH	7,2 (5,9 - 10,3)	7,2 (4,5 - 9,4)	7,2 (4,5 -10,3)
Turbidez	0,277 (0,016 - 1,038)NTU	0,254 (0,000 - 1,026)NTU	0,270 (0,000 -1,038) NTU
Condutividade Elétrica	0,895 (0,168 - 5,590)µS	0,921 (0,204 - 1,730)µS	0,903 (0,168 - 5,590)µS
TDS	0,385 (0,000 - 1,384)mg/L	0,622 (0,167 - 1,539)mg/L	0,489 (0,000 -1,539) mg/L
Salinidade	0,2 (0,0 - 3,0)‰	0,2 (0,0 - 1,0)‰	0,2 (0,0 -3,0)‰

Na Tabela 2 são apresentados os valores da mediana, mínimo e máximo das análises microbiológicas e físico-químicas. Observa-se que o valor máximo da concentração de *Leptospira* patogênica foi de 432 GEq/mL, enquanto sua mediana, assim como a mínima foi de 5 GEq/mL. A temperatura variou entre 21°C e 36°C, apresentando uma mediana no valor de 25°C. Observa-se ainda que, o valor da mediana do pH foi 7,2 tanto para o período julho/2011, como para o período janeiro/2012. Apresentando uma variação global entre pH 4,5 e 10,3. A turbidez variou entre 0,000NTU e 1,038NTU. Os dados da referida tabela mostram também que a condutividade elétrica alcançou valores superiores a 1,000 µS/cm, tanto no mês de julho/2011, como no mês de janeiro/2012. A mediana da condutividade elétrica foi de 0,895µS e 0,921 µS para os respectivos períodos, julho/2011 e janeiro/2012. O TDS e a salinidade tiveram respectivamente, uma mediana nos valores 0,489 mg/L e 0,2‰.

Trabalhos como os de Aviat (2008), Vital (2010) e Thaipadungpanit (2013) que utilizaram a técnica de PCR em tempo real, que além de informar a taxa de positividade, também mensura a concentração de *Leptospira*, não mencionaram o valor real da concentração do genoma do organismo nas amostras de água, impossibilitando devidas comparações, informando apenas que essa técnica laboratorial é válida para estudos do patógeno no ambiente. E dentro desse contexto, apenas Vital (2010) e Thaipadungpanit (2013) utilizaram primers específicos na detecção exclusiva de

Leptospira patogênica. De qualquer forma, esses trabalhos realizaram ensaios com amostras ambientais, aplicando PCR em tempo real, verificando a influência de fatores presentes no ambiente na concentração de leptospiros.

Em geral, dentre as variáveis que já foram mensuradas em laboratório, referentes à presença de *Leptospira* patogênica, os valores de mediana da temperatura, pH e salinidade se mostraram propícios a manutenção do organismo nos corpos de água coletados em Pau da Lima. A literatura informa que a faixa de temperatura da água que permite a sobrevivência de *Leptospira* patogênica é de 13-34°C, uma variação que compreende ao que foi mensurado em Pau da Lima. Tanto Meites (2004), como Barragan (2011) tiveram em seus experimentos um tempo ótimo para a sobrevivência do organismo, inferindo a temperatura da água a exatamente 29°C. A mesma temperatura que Smith (1961) obteve em seu trabalho, entre 27-31°C.

A mediana do pH presente nas águas do vale 2 de Pau da Lima foi adequada para que o organismo conseguisse se manter presente nas amostras de água. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados fornecidos por Smith (1955). Seu trabalho evidenciou que *Leptospira* patogênica sobrevivia por 24 dias a um pH 6,6, isto é, levemente ácido. Em um trabalho seguinte, ele passa a informação que valores extremos de pH são letais ao organismo, ainda que se tenha registro de leptospiros sobreviverem em condições laboratoriais por meses num pH 5,3 e 8,0, dependendo do sorovar (SMITH, 1961; FAINE *et al.*, 1999). Essa amplitude faz referência à faixa obtida no presente estudo, onde em alguns pontos amostrais do vale apresentaram valores extremos, com um pH 4,5 bastante ácido, ou bem alcalino 10,3. De qualquer forma, o que se sabe é que o valor ótimo para a sua sobrevivência é pH próximo a neutro (FAINE *et al.*, 1999).

A salinidade apresentou também uma faixa que possibilitaria a presença de *Leptospira*. Khairani-Bejo (2004) constatou que o tempo de sobrevivência de *Leptospira* diminui a medida que ocorre o aumento da salinidade, onde o organismo morre imediatamente na água do mar, onde a salinidade é em média 35‰. E os valores obtidos nas matrizes de água de Pau da Lima apresentaram-se com uma baixa salinidade.

Recentemente, pesquisadores que trabalham com o foco ambiental da leptospirose têm avaliado a influência de algumas variáveis não estudadas anteriormente, evidenciando que elas também mostraram-se diretamente relacionadas com a presença do organismo em amostras ambientais. Viau (2011), em seu estudo, observou a relação de *Leptospira* patogênica com a turbidez e salinidade, levantou a questão que mais estudos seriam necessários incluindo essas variáveis, por serem excelentes pistas de concentração da bactéria após inundações, já que as leptospirosas têm a habilidade de se agregar as partículas presentes na água (TRUEBA *et al.*, 2004), além de formarem biofilme (RISTOW *et al.*, 2008). E quanto à salinidade, os sais presentes na água atuam como fonte de nutriente para elas, fornecendo sódio, potássio, cálcio e ferro.

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 provocada por partículas em suspensão (BRASIL, 2006). Já a condutividade indica a capacidade de se conduzir corrente elétrica, estando relacionado com a presença de íons dissolvidos na água. Logo, quanto maior for a quantidade de íons dissolvidos, maior será a condutividade elétrica. (MACHADO, 2006). Outra variável relacionada a quantidade de compostos presente na água são os sólidos totais dissolvidos (TDS), que incluem todos os sais presentes na água, além de compostos orgânicos dissolvidos, onde todas as impurezas da água, com exceção dos gases dissolvidos, contribuem para a carga de sólidos presentes nos corpos d'água (TUNDISI e MATSUMURA TUNDISI, 2008). Logo, a condutividade elétrica e TDS estão relacionadas a presença de partículas e sais nas amostras de água, sendo que no caso específico deste trabalho, esses componentes em suspensão são também provenientes da decomposição da matéria orgânica no esgoto. Os resultados obtidos da condutividade elétrica e TDS servem apenas como descrição dos corpos d'água presente no vale dois de Pau da Lima, já que não foram encontrados registros científicos que relacionem a presença de *Leptospira* com as medidas dessas variáveis físico-químicas. O alto valor da condutividade elétrica observado nas matrizes de água pode estar relacionado aos processos de decomposição da matéria orgânica.

5.1.1 Taxa de positividade de *Leptospira* patogênica

A proporção de amostras positivas foi de 13 (4,5%), do total de 288 amostras. No mês de julho, período que apresentou precipitação >200mm foi de 12 (7,7%) amostras do total de 155 amostras para este mês, enquanto no mês de janeiro, onde a precipitação foi de <100mm, apenas uma amostra foi positiva (0,7%) do total de 133 amostras, apresentando uma diferença significativa entre as duas estações. Comparando a taxa de positividade de *Leptospira* nos dois períodos do dia, a proporção foi de 11 (7,4%) amostras no turno da manhã (148) e 2 (1,4%) amostras no turno da tarde (140), também apresentando uma diferença estatística entre os dois turnos. Referente ao nível do vale, o nível mais alto apresentou 3 (7,5%) amostras positivas, do total de 40 amostras, enquanto no nível médio 1 (1,5%) amostra positiva, do total de 65 amostras e por fim, no nível mais baixo do vale 9 (5%) amostras foram positivas, do total de 183 amostras. A matriz de água córrego com esgoto apresentou 10 (6%) amostras positivas, do total de 167 amostras. Enquanto na matriz de água empoçada foi observado a positividade de 3 (2,5%) amostras, do total de 121 (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de positividade de *Leptospira* patogênica de acordo a variação espaço-temporal

Características	Total	qPCR positivo (%)
Período		
Julho	155	12(7,7%)*
Janeiro	133	1(0,7%)
Turno		
Manhã	148	11(7,4%)*
Tarde	140	2(1,4%)
Nível		
Alto	40	3(7,5%)
Médio	65	1(1,5%)
Baixo	183	9(5%)
Tipo de água		
Córrego com esgoto	167	10(6%)*
Água empoçada	121	3(2,5%)

* significativo ($p < 0,05$)

O trabalho realizado na França, por Aviat (2008), para identificar a relação entre o papel de roedores na transmissão de leptospirose e a concentração da bactéria em amostras de água obteve uma positividade de 5/38 (13%) em amostras de água oriundas dos sítios associados com casos de leptospirose humana e 1/113 (0,9%) em regiões selecionadas com fins epidemiológicos. Porém, nesse trabalho foi utilizado o primer *rrs16S* que detecta o gene que também se encontra presente em *Leptospira* saprófita.

Seguindo essa mesma linha, e utilizando primers específicos na detecção do gene *lipL32*, Thaipadungpanit (2013) obteve uma positividade de apenas 1/110 (0,9%) em Bangkok-Tailândia. País comum em apresentar surto de leptospirose, principalmente após inundações.

O presente trabalho, realizado na comunidade de Pau da Lima, apresentou uma positividade abaixo do que Aviat (2008) encontrou na França, na região específica onde foram registrados casos de leptospirose, no entanto, aqui foi feito um esforço amostral

maior. Também foi encontrada que diferença entre os resultados obtidos comparando as duas estações do ano também levam a hipótese de que as chuvas podem ter contribuindo no carreamento de leptospiras presentes na água do solo, oriundas da urina do rato, em direção às matrizes de água. A maior concentração e positividade no período chuvoso estão de acordo com a incidência de leptospirose na cidade de Salvador, assim como na própria comunidade de Pau da Lima, principalmente após chuvas fortes, seguidas por inundações. Cenário que não é típico do período mais seco do ano, que compreende entre os meses de dezembro a fevereiro.

Considerando os dados obtidos, que comparam os dois turnos, pode-se observar que também houve uma diferença significativa entre eles, onde o turno da manhã apresentou resultado acima do obtido pelo turno da tarde. Esse fato pode estar associado pela influência no comportamento dos roedores sinantrópicos, nesse caso, em especial, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*). Esses animais, que apresentam hábito noturno, abrigam em seus rins leptospiras, que serão dispersadas pela urina no ambiente. Algumas pesquisas comprovam que, em uma única noite, esses animais podem penetrar 20 a 30 diferentes locais à procura de alimentos e, com isso, aumentar a chance de excretar a bactéria em diversos pontos, tendo então um importante papel no risco de transmissão da leptospirose (MEEHAN, 1984; MASI, 2009).

Embora estudos de coorte, realizados no mesmo local de estudo, tenham evidenciado que o nível do vale é um fator de risco para a leptospirose, onde moradores do nível mais baixo apresentam uma maior vulnerabilidade para a doença, os resultados do presente trabalho não evidenciam qualquer tipo de relação entre concentração e positividade de *Leptospira* ao longo do vale, com a sua topografia. Por outro lado, considerando as matrizes de água, o córrego com esgoto apresentou-se mais propício a presença e concentração de *Leptospira*. Esta diferença entre as matrizes de água pode ser causada por diversos fatores desconhecidos. É possível que exista relação com a concentração de oxigênio, visto que é um dos principais responsáveis pela sobrevivência de organismos aeróbios. Ainda que essa variável não tenha sido mensurada no presente estudo, sabe-se que a concentração de oxigênio dissolvido na água é resultado da interação de diversos processos. Sendo assim, o consumo de oxigênio para a decomposição da matéria orgânica e a respiração realizada pelo

ecossistema aquático auxiliam na redução do oxigênio dissolvido na água. Por outro lado, considerando que a água empoçada é um sistema fechado e em inércia é plausível a hipótese que a concentração de oxigênio nesse ambiente tende a ser menor, quando comparada com um ambiente dinâmico, como o córrego, no qual, a turbulência favorece a dissolução do O₂ da atmosfera na água.

Ainda que os Kits de extração de DNA utilizem colunas de sílica para reter moléculas de DNA de alto peso molecular, que decantarão com maior facilidade após sucessivas centrifugações (BRAID *et al.*, 2003), moléculas inibidoras, como ácidos húmicos, metais, além de algumas proteínas poderão competir com os ácidos nucleicos, pelos sítios preferenciais de ligação à sílica, levando à perda das moléculas de DNA, nessa etapa prévia a amplificação do gene (LLOYD *et al.*, 2010). O kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA), utilizado neste estudo, apresenta uma boa eficiência na remoção de substâncias inibidoras em amostras ambientais. No entanto, existe a possibilidade de não ter sido excluído completamente essas substâncias contidas nas alíquotas das amostras de Pau da Lima, por apresentarem alto teor de matéria orgânica, já que são oriundas de efluentes e regiões alagadas, ultrapassando a capacidade de ligação e remoção através do kit, existindo a possibilidade do método estar subestimando a concentração de *Leptospira*.

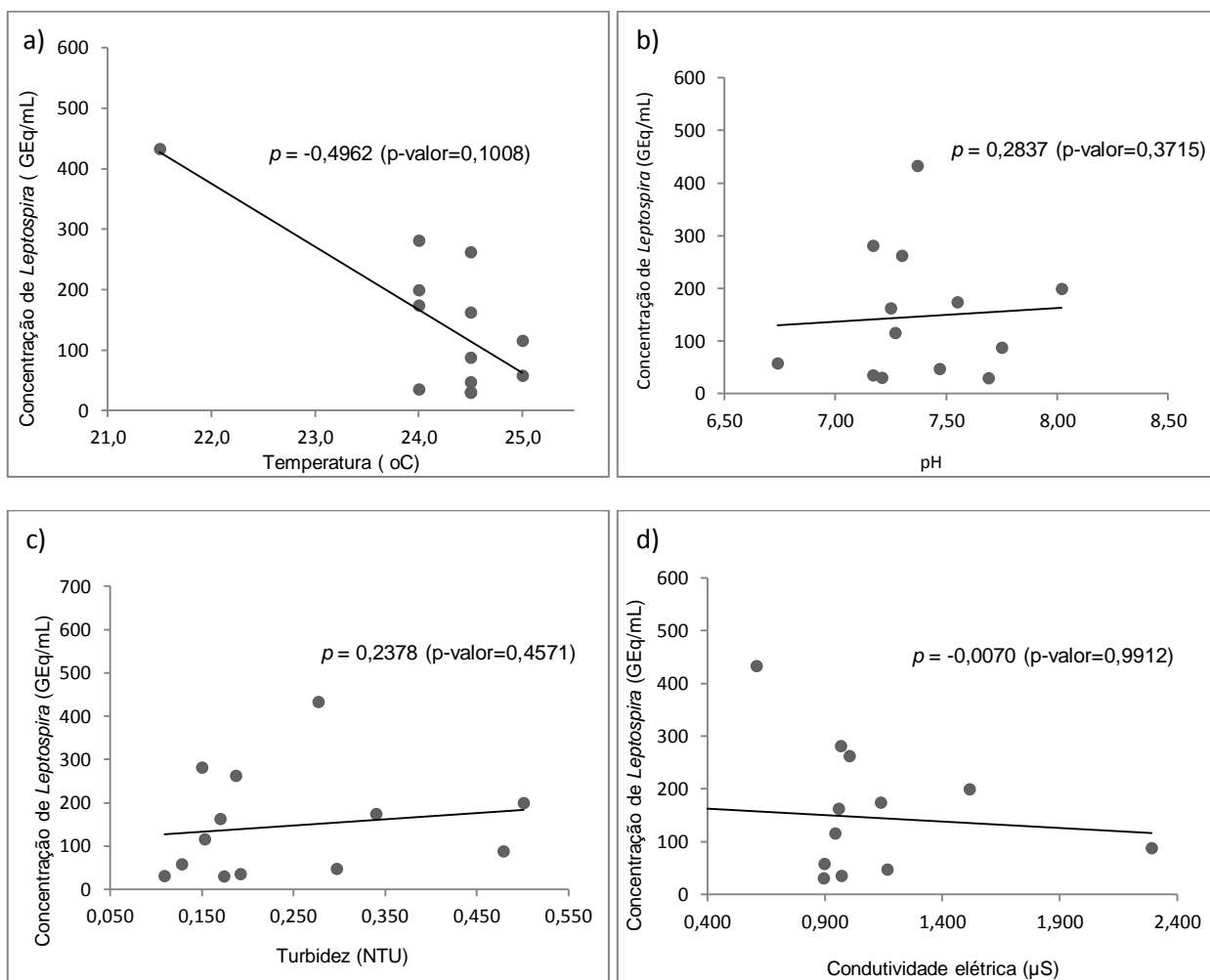
As substâncias inibidoras também podem interferir na etapa de amplificação do gene, sendo conhecidas por reduzirem drasticamente a eficiência da amplificação do DNA durante a qPCR, ainda que algumas Taq DNA polimerases consigam tolerar a maioria dos inibidores presentes em amostras (WILSON, 1997; BAAR *et al.*, 2011).

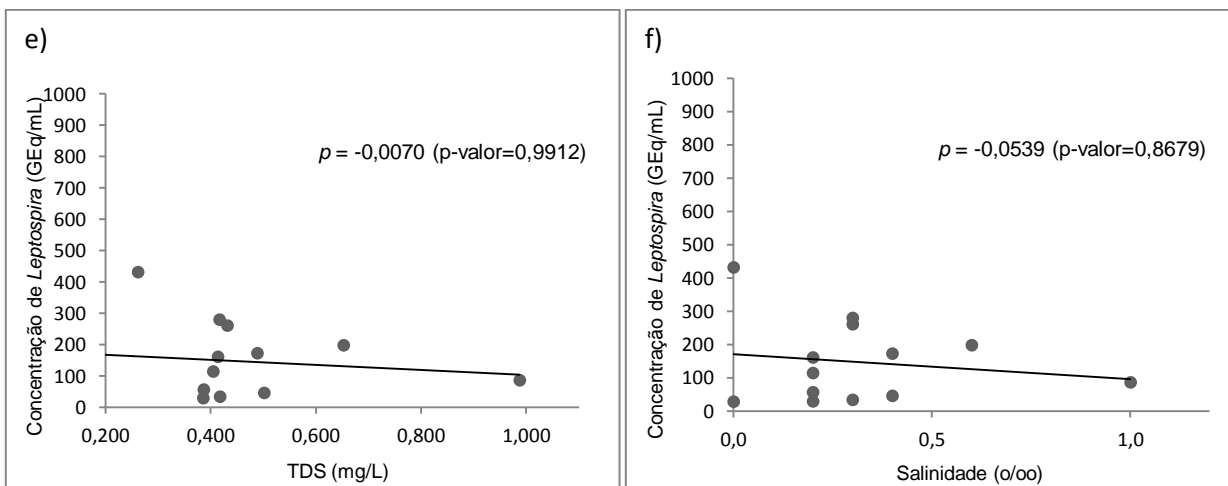
5.2 Teste de correlação

5.2.1 Teste de correlação (*Leptospira* x Variáveis físico-químicas)

Para testar a força de associação entre a concentração de *Leptospira* patogênica com as variáveis físico-químicas, foi aplicado o teste de correlação de Spearman. Para essa análise foram tratados apenas os dados que apresentaram a concentração de *Leptospira* acima de 5 GEq/mL, isto é, amostras positivas. Esse valor é a quantidade mínima de DNA que a técnica qPCR consegue quantificar. Logo então, como não se pode afirmar, de forma contundente, que valores abaixo desse limite possuem ausência de material genético, usa-se 5 GEq/mL para apresentar amostras negativas.

Figura 8. Diagrama de dispersão, visualizando relação entre a concentração de *Leptospira* patogênica e a) Temperatura, b) pH, c) Turbidez, d) Condutividade elétrica, e) TDS e f) Salinidade.





Das possíveis associações entre a concentração de *Leptospira* com as variáveis físico-químicas, apenas a relação com o pH e turbidez foram positivas. E nenhum dos pares de correlação foi significativo, estatisticamente (Figura 8). De qualquer forma, ainda que não exista uma correlação significativa entre as variáveis, é possível identificar que existe uma tendência das variáveis físico-químicas estarem influenciando a concentração de *Leptospira* patogênica nas amostras de água. Através dos dados apresentados, a maior concentração de *Leptospira* patogênica estava relacionada a valores mais altos de pH e turbidez, assim como a valores mais baixos de temperatura, salinidade, condutividade elétrica e TDS. Podendo ser observado, dentro deste aspecto, que a temperatura foi a variável que mais se aproximou a uma correlação com a concentração de *Leptospira* patogênica.

No trabalho de Viau (2011) foi mostrado o mesmo padrão de correlação de *Leptospira* com a turbidez, sendo este um resultado esperado, pois, como foi citado anteriormente, as leptospiros podem se associar as partículas em suspensão na água. No entanto, houve uma divergência nos resultados referentes a salinidade entre os dois estudos. No trabalho de Viau (2011), a correlação entre a concentração de *Leptospira* patogênica com a salinidade foi positiva, sugerindo que é possível que leptospiros sobrevivam em em águas relativamente salinas, nem que seja por um curto período de tempo, equivalente a algumas horas, enquanto que, no presente estudo a correlação foi negativa. Esse resultado obtido por Viau (2011) foi interessante, pois poucos estudos correlacionaram a salinidade, com *Leptospira*. No entanto, trabalhos como os de Schuffner (1934), Chang *et al.* (1948) e Faine (1959) têm evidências que o aumento da

salinidade reduz o tempo de sobrevivência do patógeno no ambiente. Schuffner (1934) realizou um experimento com diferentes salinidades e conseguiu observar que leptospiras sobreviviam em menos de 24 horas na água do mar e cerca de uma semana na água do rio. Outro estudo que analisou a salinidade foi proposto por Chang *et al.* (1948), que também observou que o tempo de sobrevivência na água com alta concentração de sais é inferior à um ambiente com baixa concentração. E por fim, Faine (1959) detectou que leptospiras reduzem seu crescimento em ambientes salinos, após realizar testes em meio de cultura com diferentes concentrações de sais.

5.2.2 Teste de correlação entre Variáveis físico-químicas

Os coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,217*				
Turbidez	0,083	-0,010			
Condutividade elétrica	-0,002	0,367	-0,061		
TDS	0,050	0,432	0,024	0,904*	
Salinidade	-0,020	0,451	0,035	0,882*	0,975*

* significativo ($p < 0,05$)

Os coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4 indicaram fraca correlação entre as variáveis, com exceção dos pares condutividade elétrica/salinidade, condutividade elétrica/TDS e salinidade/TDS. Essas três variáveis apresentam fortes relações porque, a condutividade elétrica da água é a sua capacidade em transmitir corrente elétrica por conta da presença de sais e substâncias dissolvidas que se dissociam em ânions e cátions (PORTO *et al.*, 1991).

Nas tabelas 5 e 6 são apresentados os coeficientes de correlação de Spearman para os respectivos meses, julho/2011 e janeiro/2012.

Tabela 5. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho/2011.

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	0,070				
Turbidez	0,163	0,048			
Condutividade elétrica	-0,034	0,316	-0,135		
TDS	-0,049	0,353	0,017	0,834*	
Salinidade	-0,044	0,360	0,029	0,797*	0,979*

* significativo ($p < 0,05$)

Das possíveis associações entre as variáveis físico-químicas, 11 foram positivas e dessas, três foram associações significativas: condutividade elétrica/TDS, condutividade elétrica/salinidade e TDS/salinidade (Tabela 5).

Tabela 6. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro/2012.

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,259				
Turbidez	-0,156	-0,054			
Condutividade elétrica	-0,275	0,549*	-0,1725		
TDS	-0,285	0,669*	0,0714	0,735*	
Salinidade	-0,223	0,665*	0,4183	0,709*	0,975*

* significativo ($p < 0,05$)

Após análise da Tabela 6, verifica-se que ocorreu um maior número de associações significativas, sendo que tanto os sólidos totais dissolvidos, como a salinidade e a condutividade elétrica, apresentaram-se com uma forte correlação.

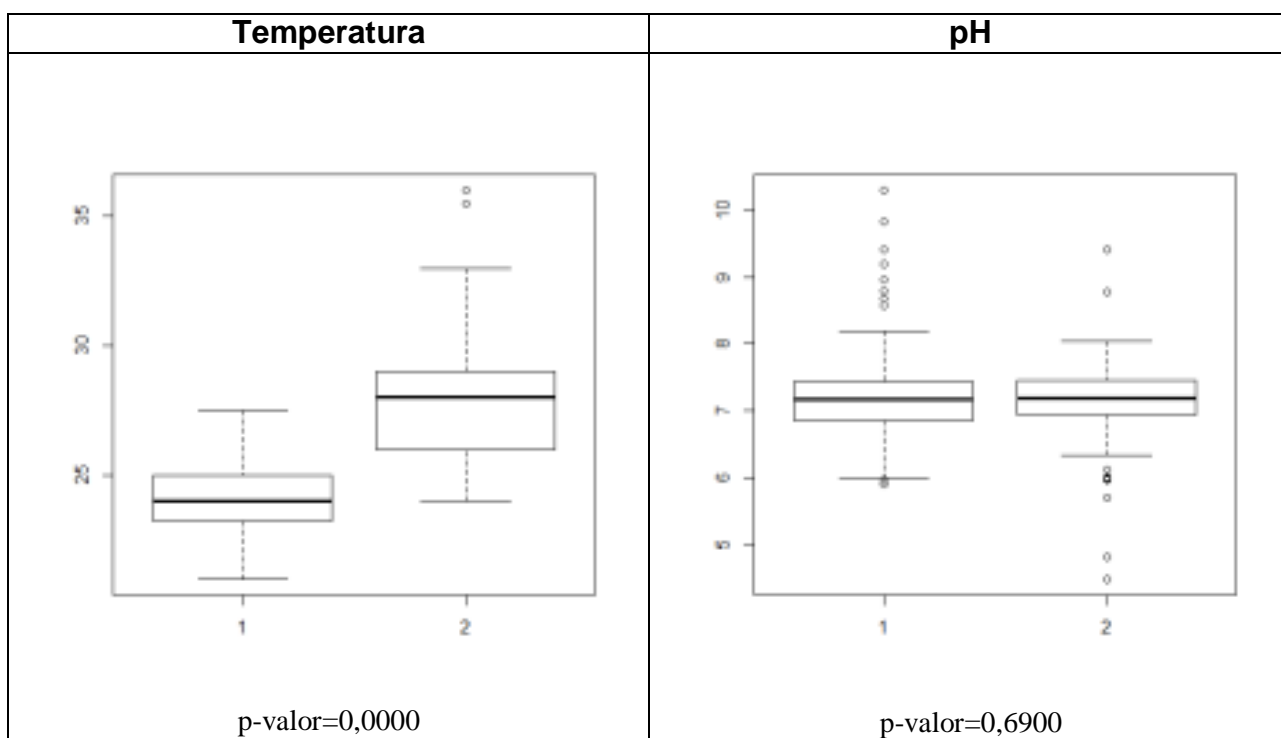
Os sólidos totais dissolvidos estão associados com a quantidade de substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas na água, sendo um indicativo da contaminação por descargas de efluentes domésticos, os quais podem ter em sua composição matéria orgânica, que em decomposição liberam sais, aumentando por sua vez a condutividade elétrica (BOLLMANN, 2003).

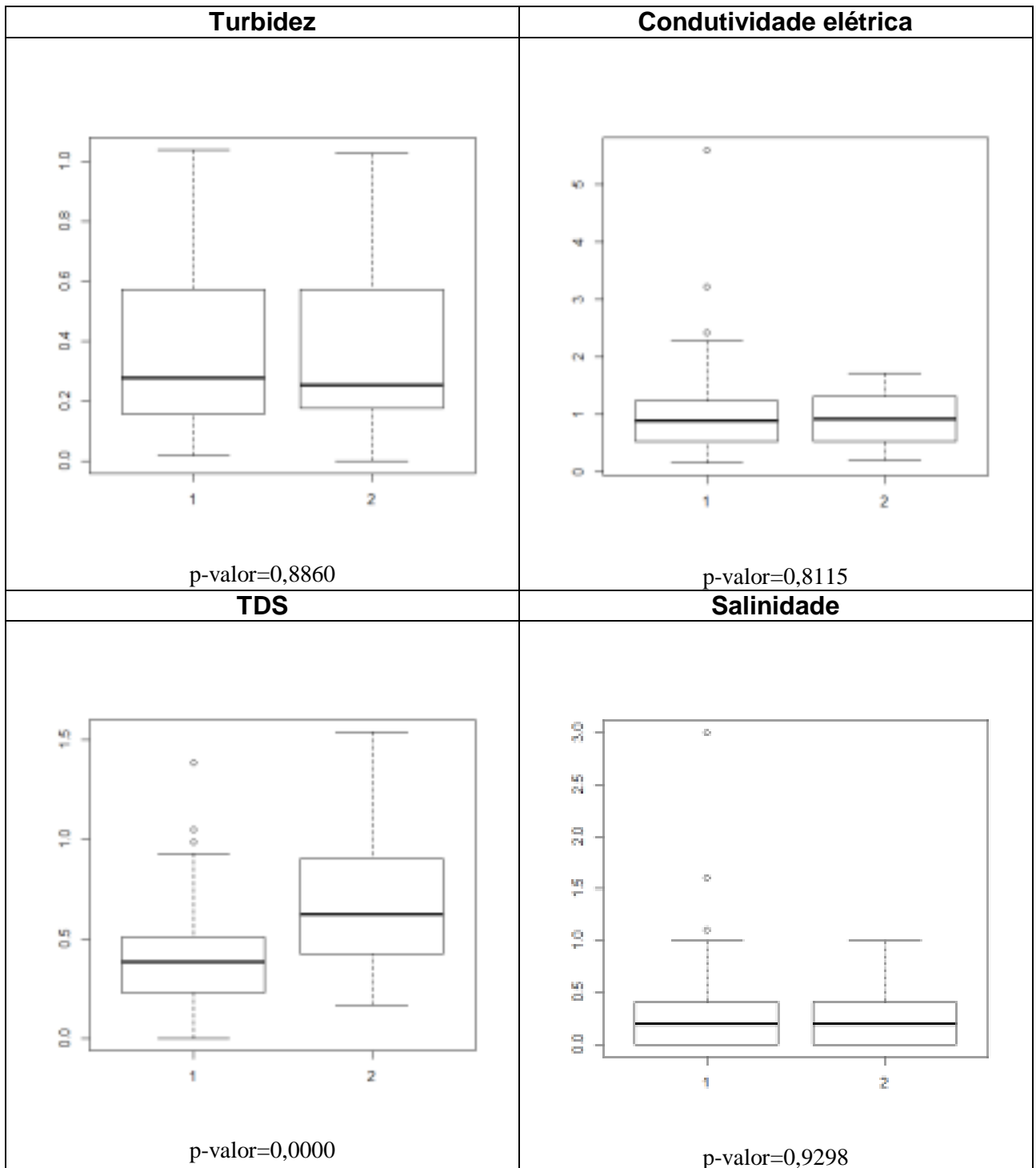
A variável pH também apresentou uma correlação significativa e positiva com essas três variáveis no mês de janeiro. Apesar do pH ser um parâmetro fundamental para o estudo dos ambientes aquáticos, a sua interpretação torna-se complexa devido ao grande número de fatores que podem influenciá-lo (ESTEVES, 1988).

5.3 Variação espaço-temporal

A Figura 9 mostra a diferença entre cada variável físico-química, entre o período chuvoso, que compreende neste trabalho o mês de julho/2011 e o período seco, referente ao mês de janeiro/2012.

Figura 9 Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando as duas estações: 1 (julho/2011) e 2 (janeiro/2012).





Através do teste de Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $< \alpha$ para as variáveis temperatura e TDS, pode-se afirmar que existe diferença significativa dessas variáveis entre o primeiro e o segundo período.

Analisando a Figura 9, é possível constatar as diferenças nas tendências centrais dos gráficos, pelo posicionamento do traço central na caixa. Referente a variável temperatura, observa-se que 50% dos dados do primeiro período são menores ou iguais à menor temperatura do segundo período. Para a variável pH também foi possível observar que 50% apresentou valores menores ou iguais ao pH 7,2 para ambos os períodos. Os dados foram praticamente idênticos entre os dois períodos, quando observamos as variáveis turbidez e condutividade elétrica. A Figura 9 também traz a informação que 50% dos valores observados para o TDS no primeiro período foi menor ou igual a 0,399 enquanto que 25% dos valores observados para o TDS no segundo período foi menor ou igual a 0,406. Observa-se ainda que 75% dos valores de salinidade para o primeiro período são menores ou iguais a 0,5 enquanto que 25% dos valores de salinidade para o segundo período são iguais a zero. Também é possível notar que para ambos os períodos estudados, 50% dos valores de salinidade são menores ou iguais a 0,2.

A temperatura da água pode ser diferenciada por diversos fatores, tais como radiação solar, latitude, altitude, estação do ano, período do dia e profundidade (ZUMACH, 2003). Os dados da variação da temperatura da água entre as duas campanhas ratificam o conhecimento que se tem, onde a diferença da radiação solar que incidente entre o mês de julho e o mês de janeiro resulte no aumento de temperatura em janeiro, com isso, esse mês apresentou uma temperatura mais elevada. Esse aumento foi acompanhado pela variável TDS.

O pH, apesar de ter uma maior amplitude no período julho/2011, não apresentou diferença significativa entre os períodos, assim como a condutividade elétrica. Tanto a turbidez, como a salinidade apresentaram valores bem próximos, cujas medianas são aproximadamente iguais, não apresentando diferença significativa.

Embora os dados referentes a taxa de positividade de *Leptospira* patogênica não apresentem força suficiente para inferir de forma significativa a relação da concentração ou presença do patógeno com as variáveis físico-químicas, é notável identificar que, no período de julho, onde a positividade foi maior, assim como o histórico da frequência da

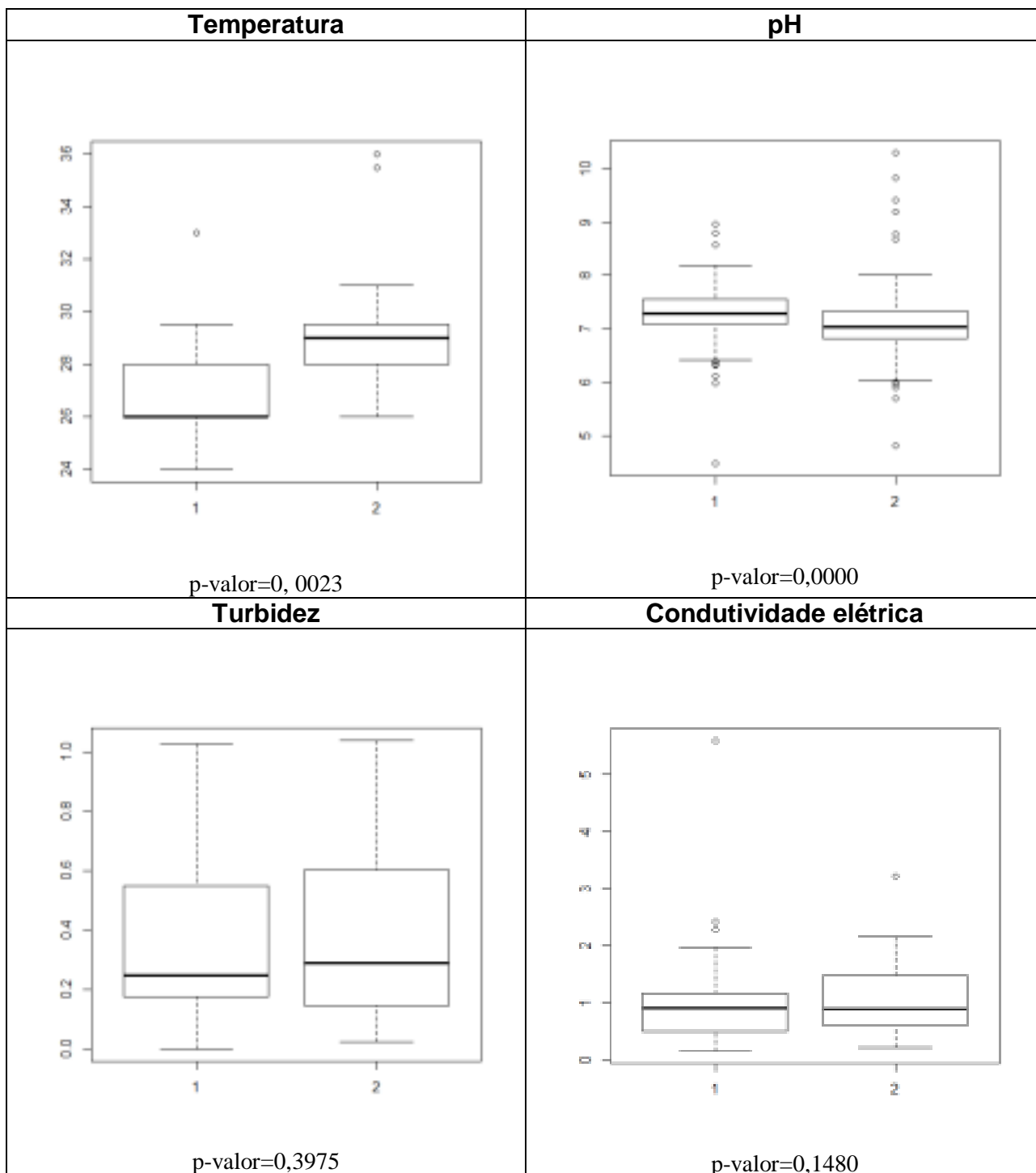
doença é maior, tanto a temperatura, como o TDS foram inferiores nas matrizes de água, indicando uma possível relação.

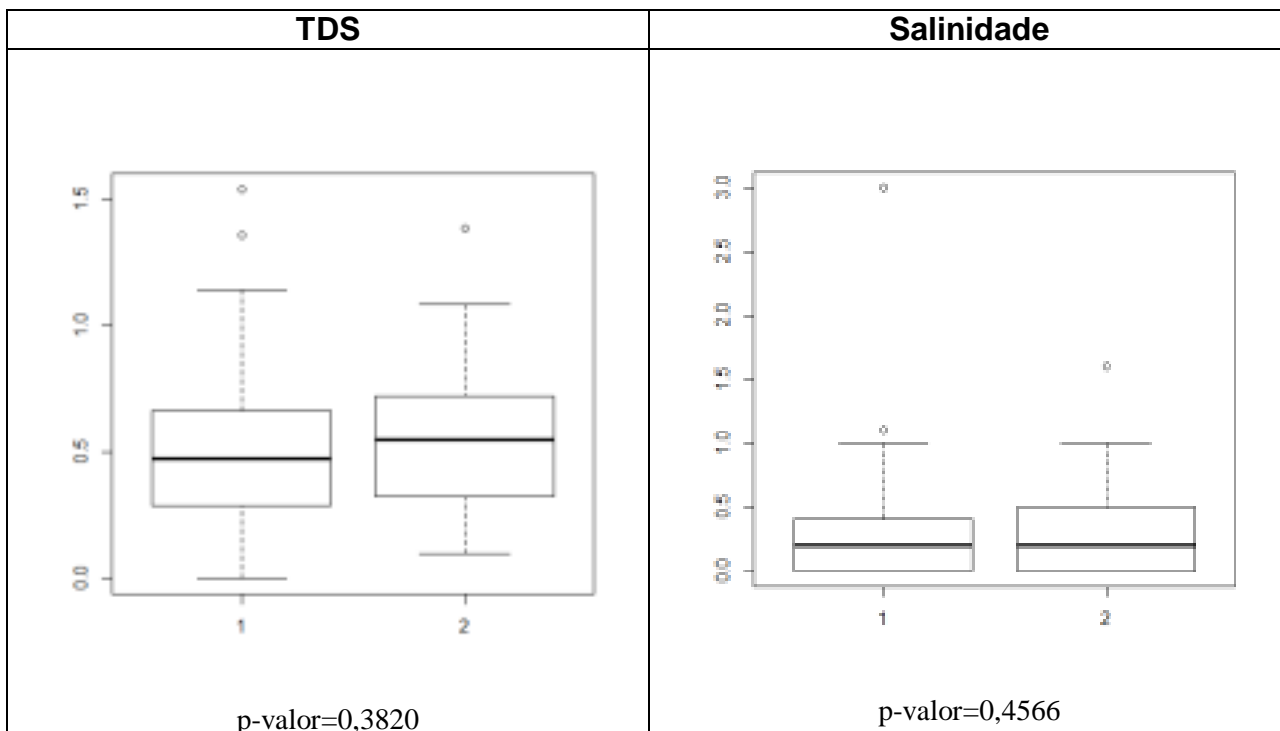
É difícil estabelecer quais variáveis estejam influenciando na concentração de leptospiros no meio ambiente, fazendo-se necessário que estudos relacionados ao padrão de variação espaço-temporal, bem como estudos de ecologia populacional de roedores, principais disseminadores do patógeno no ambiente, além de outros fatores ainda não analisados, sejam explorados, para uma maior compreensão da dinâmica do organismo.

5.3.1 Variação entre horários de coleta

As Figuras 10, 11 e 12 servem para comparar diferenças entre os turnos.

Figura 10 Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando os dois turnos: 1 (manhã) e 2 (tarde).





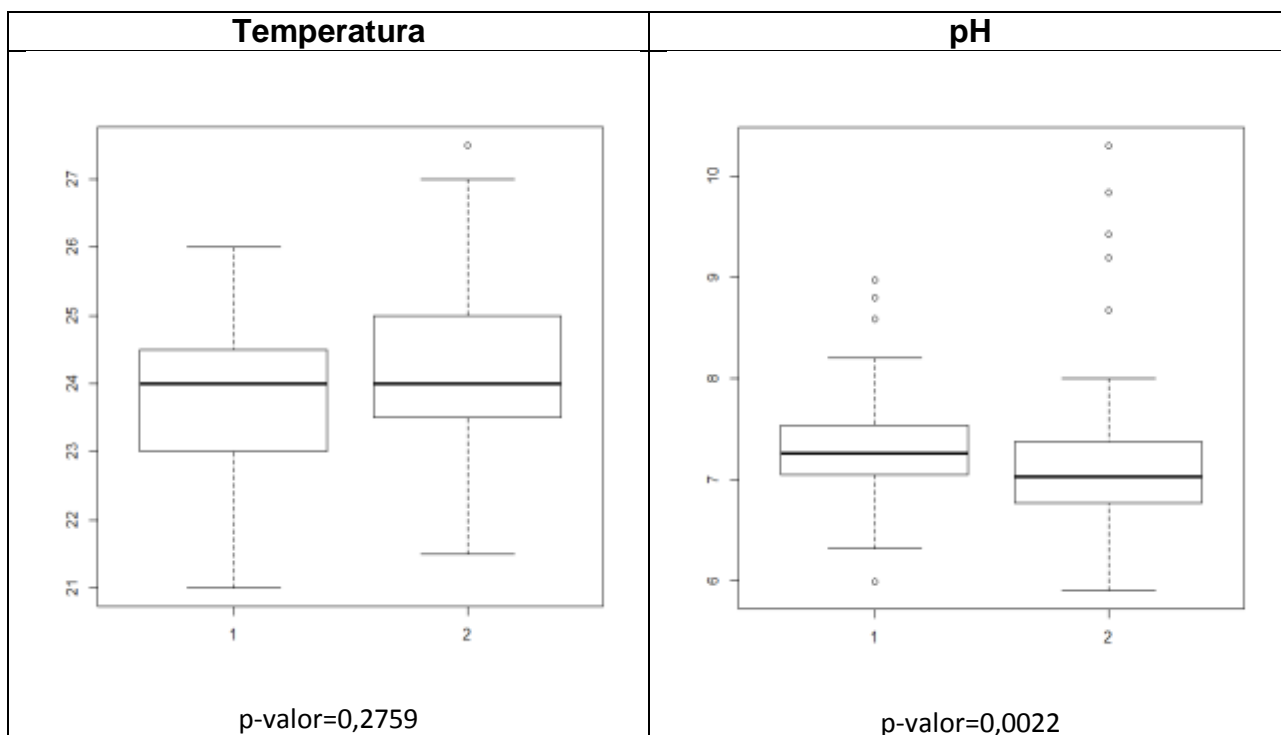
Considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $> \alpha$ para as variáveis turbidez, TDS, condutividade elétrica e salinidade, aceitou-se H_0 , concluindo então que essas variáveis não apresentaram diferença significativa entre os turnos.

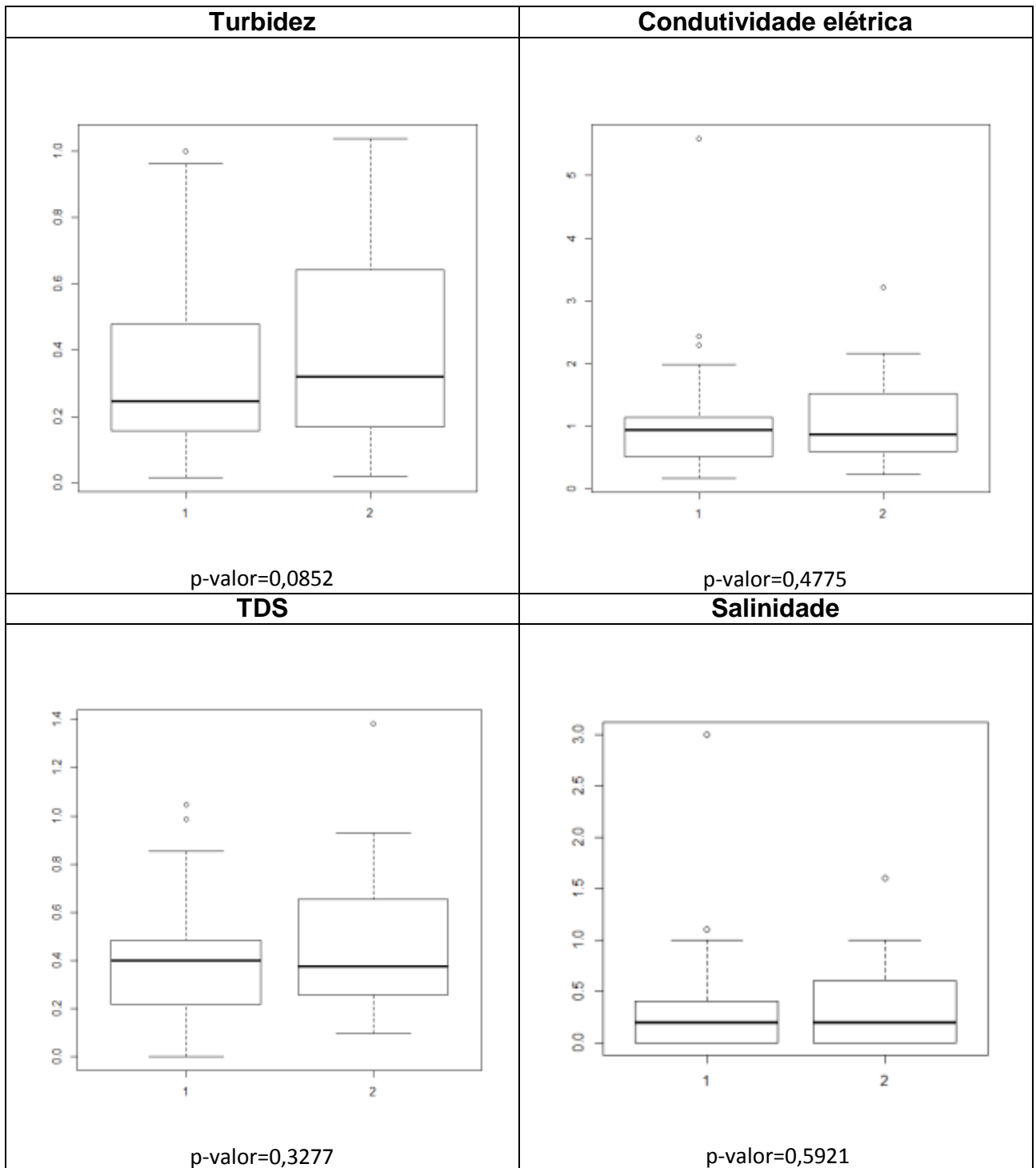
Houve um aumento da temperatura do turno da manhã para o turno da tarde. Era esperado que esse aumento ocorresse, devido ao fator das águas superficiais receberem uma maior incidência solar durante o dia. Já a variável pH, que está relacionada ao processo de decomposição, reduziram durante o dia, possivelmente por conta do acúmulo de íons de hidrogênio. Como as águas coletadas em Pau da Lima são provenientes principalmente de efluentes domésticos, é bem provável que exista um alto teor de matéria orgânica, que ao ser decomposta por bactérias, libera CO_2 , reduzindo os valores do pH. Isso ocorre porque o CO_2 presente na água forma o ácido carbônico, que é um ácido fraco e ao se dissociar, libera íons de hidrogênio (ESTEVES, 1988). Já a turbidez se manteve constante, não apresentando diferença significativa.

Analisando a condutividade elétrica, foi observado que o turno da tarde registrou levemente maiores valores em comparação ao turno da manhã. Esse resultado era esperado, pois poderia haver um acúmulo de íons e sais durante o dia, resultantes do

maior tempo para os processos de decomposição da matéria orgânica presente nas matrizes de água de Pau da Lima. Essa hipótese é compreensível, pois, a condutividade elétrica é uma variável que está associada à quantidade de sais e íons dissolvidos na água, resultante da decomposição da matéria orgânica (BOLLMANN, 2003).

Figura 11. Box-plot das variáveis físico-químicas (julho/2011), comparando os dois turnos: 1 (manhã) e 2 (tarde).



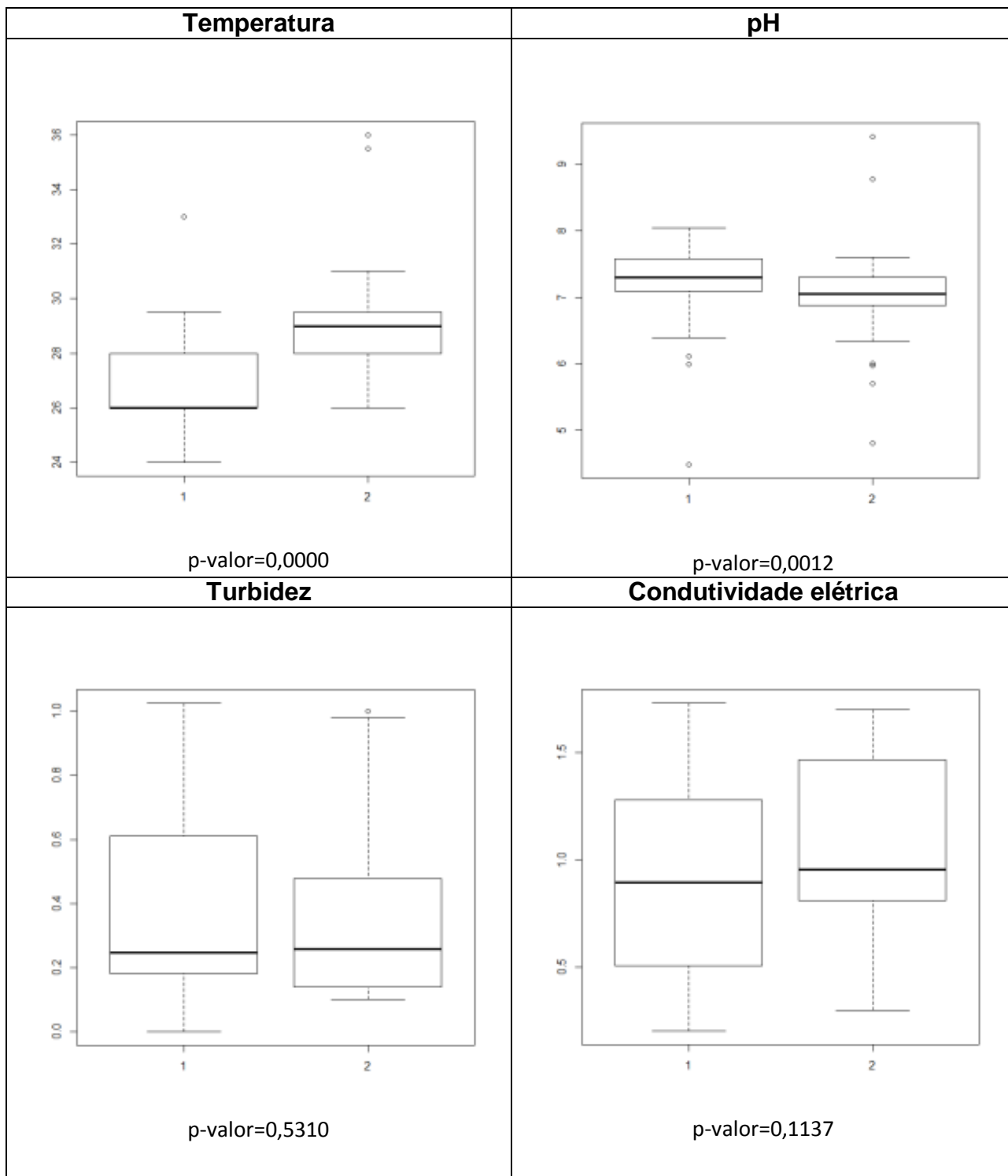


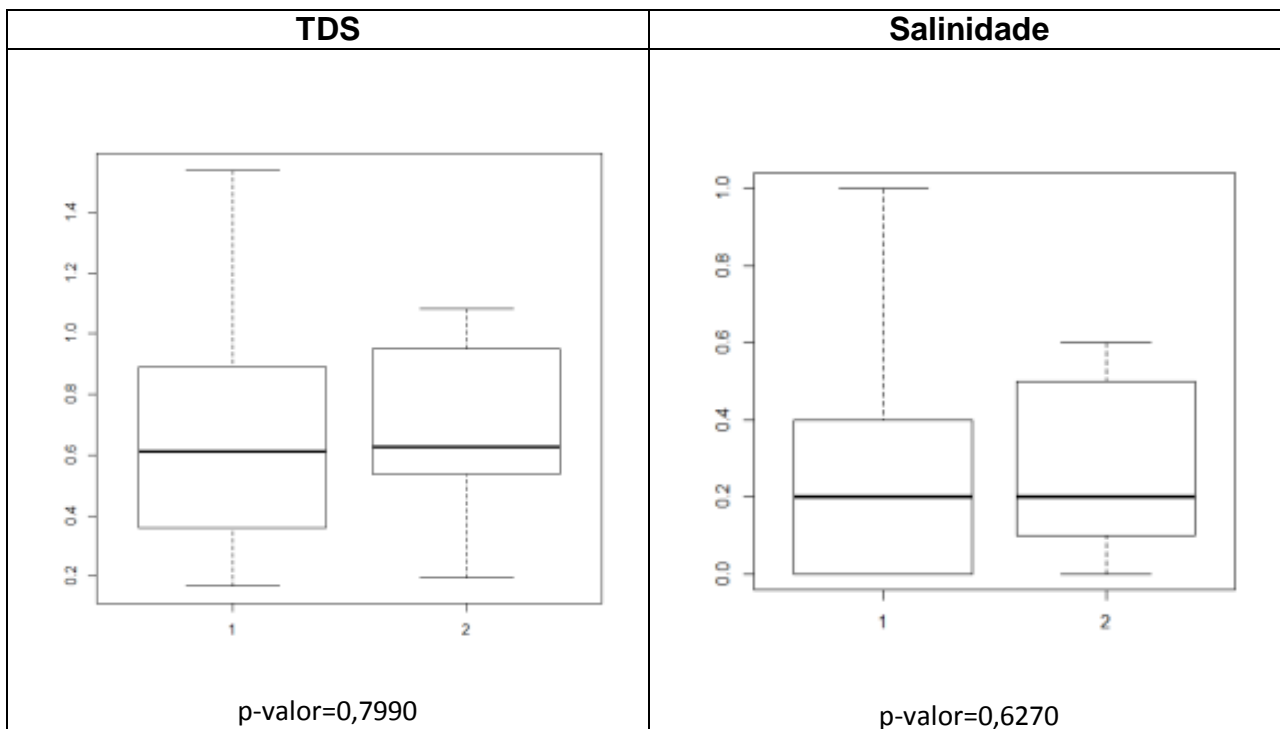
Ao compararmos a variabilidade da temperatura nos dois conjuntos, para o período de julho, fica evidente que não houve de diferença entre os dois turnos. A temperatura no turno da tarde foi levemente maior em relação ao turno da manhã. Verifica-se também

que no turno da tarde existe um resultado discrepante. Ao efetuar a análise da variável pH, ficou evidente que existe diferença entre os dois turnos. O pH no turno da tarde foi menor que no turno da manhã, possivelmente por conta do acúmulo de íons de hidrogênio, proveniente da decomposição da matéria orgânica. A diferença significativa foi confirmada através do teste Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $< \alpha$ aceitando-se H_0 .

Por outro lado, a turbidez, assim como a condutividade elétrica, apesar de terem apresentado uma maior dispersão dos dados no turno da tarde, não apresentaram diferença significativa, entre os turnos. A Figura 11 também fornece informações referentes as variáveis TDS e salinidade, onde essas duas variáveis não apresentaram diferença significativa.

Figura 12. Box-plot das variáveis físico-químicas (janeiro/2012), comparando os dois turnos: 1 (manhã) e 2 (tarde).





Também é feita uma análise, comparando os dois turnos, no período de janeiro, através da Figura 12. Ficou evidente que, além da temperatura, o pH também apresentou diferença significativa, através do teste Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $< \alpha$, aceitando-se H_0 . O *Box-plot* da Figura 12 também informa que a temperatura foi maior no turno da tarde, em comparação ao turno da manhã, enquanto o pH apresentou menores valores no turno da manhã.

Tanto a turbidez, como a condutividade elétrica, TDS e salinidade apresentaram uma maior amplitude no turno da manhã, porém sem diferença significativa.

Dentre todas variáveis, tanto para o período julho/2011, como para o período janeiro/2012, a temperatura e pH mostram-se mais influenciadas pela variação diária. Para as demais variáveis não ficou evidente que, elas sofrem algum tipo de influência temporal, que venha corroborar com a hipótese que a variação das variáveis físico-químicas durante o dia pode influenciar nas características das águas do vale dois de Pau da Lima.

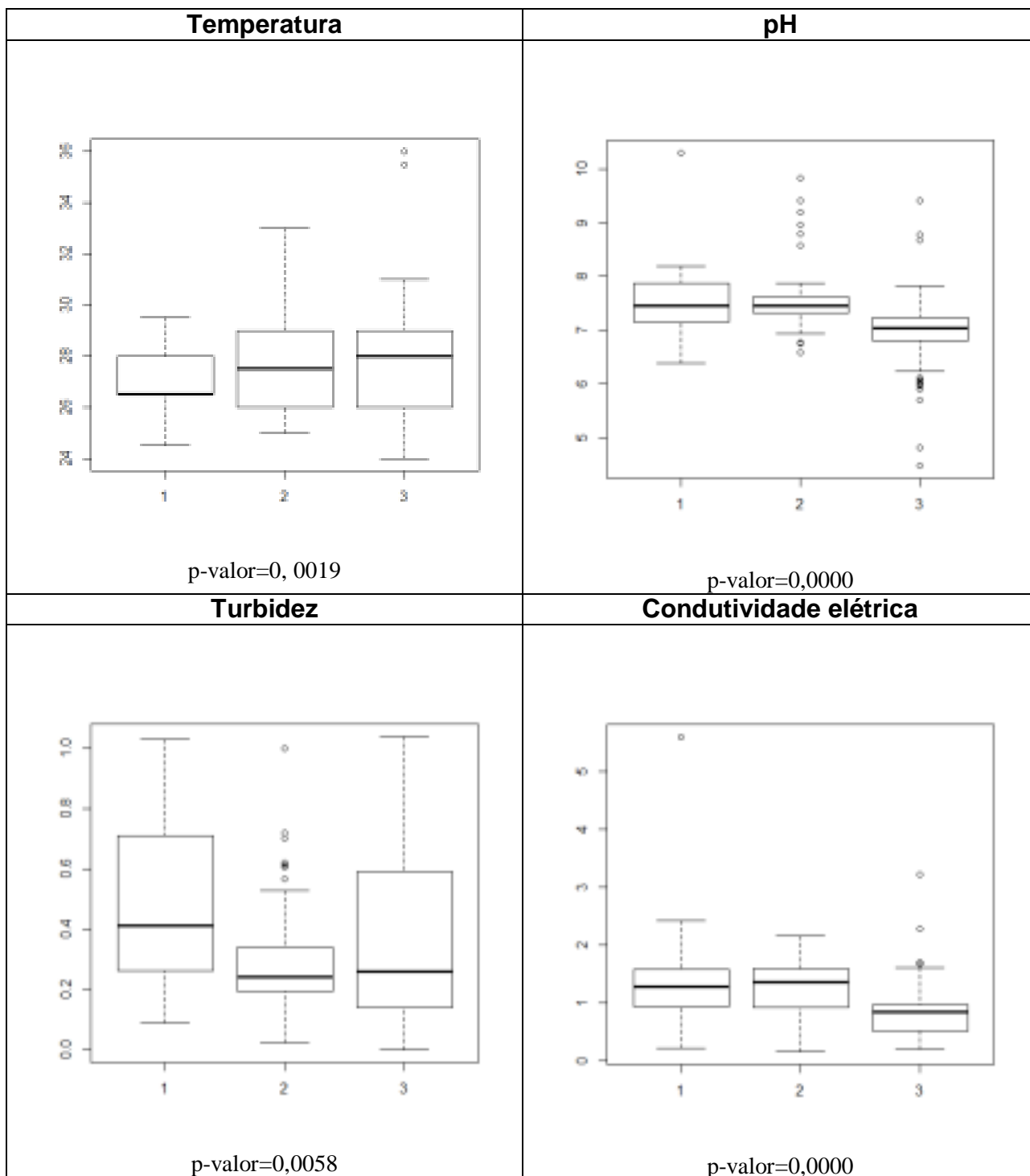
Fazendo uma comparação desses resultados físicoquímicos com a taxa de positividade entre os turnos, tem-se que, ainda que ocorresse uma maior presença do organismo no

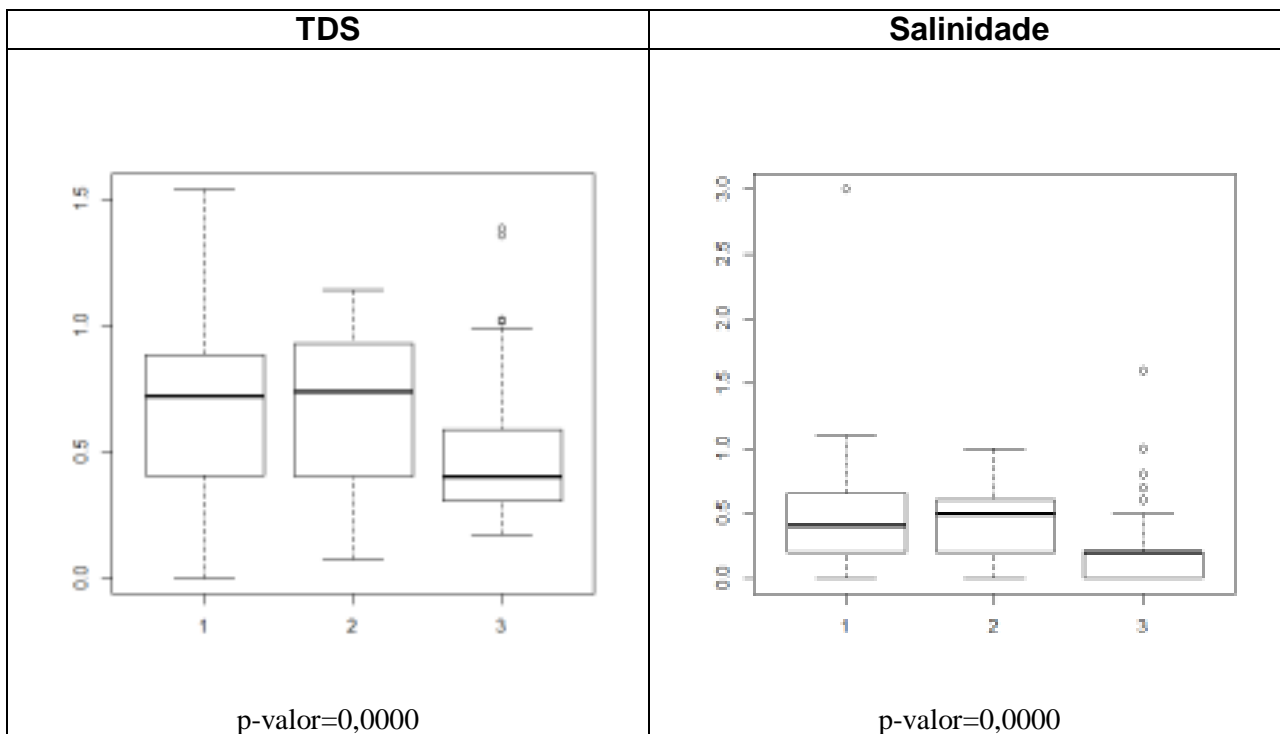
turno da manhã, onde as matrizes de água apresentaram uma menor temperatura e um pH tendendo a alcalino, não foi possível inferir, através desses dados, que essa variabilidade tenha influenciado na presença de *Leptospira*. Ficando apenas evidente que essas variáveis apresentaram uma amplitude propícia a sobrevivência do mesmo.

5.3.2 Variação entre níveis do vale

As Figuras 13, 14 e 15 servem para comparar diferenças entre os níveis do vale dois.

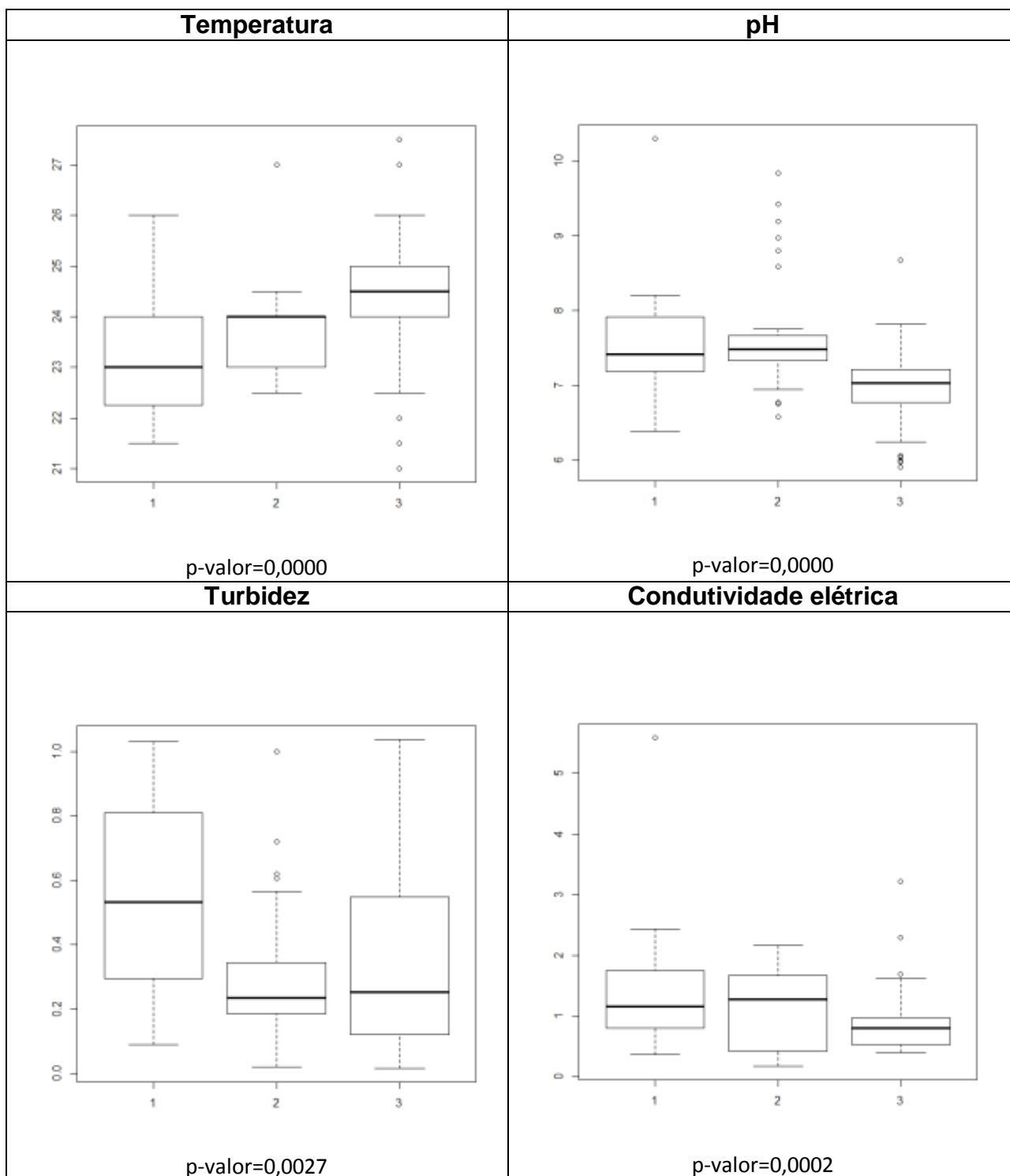
Figura 13. Box-plot das variáveis físico-químicas, comparando os três níveis do vale: 1 (alto); 2 (médio) e 3 (baixo).

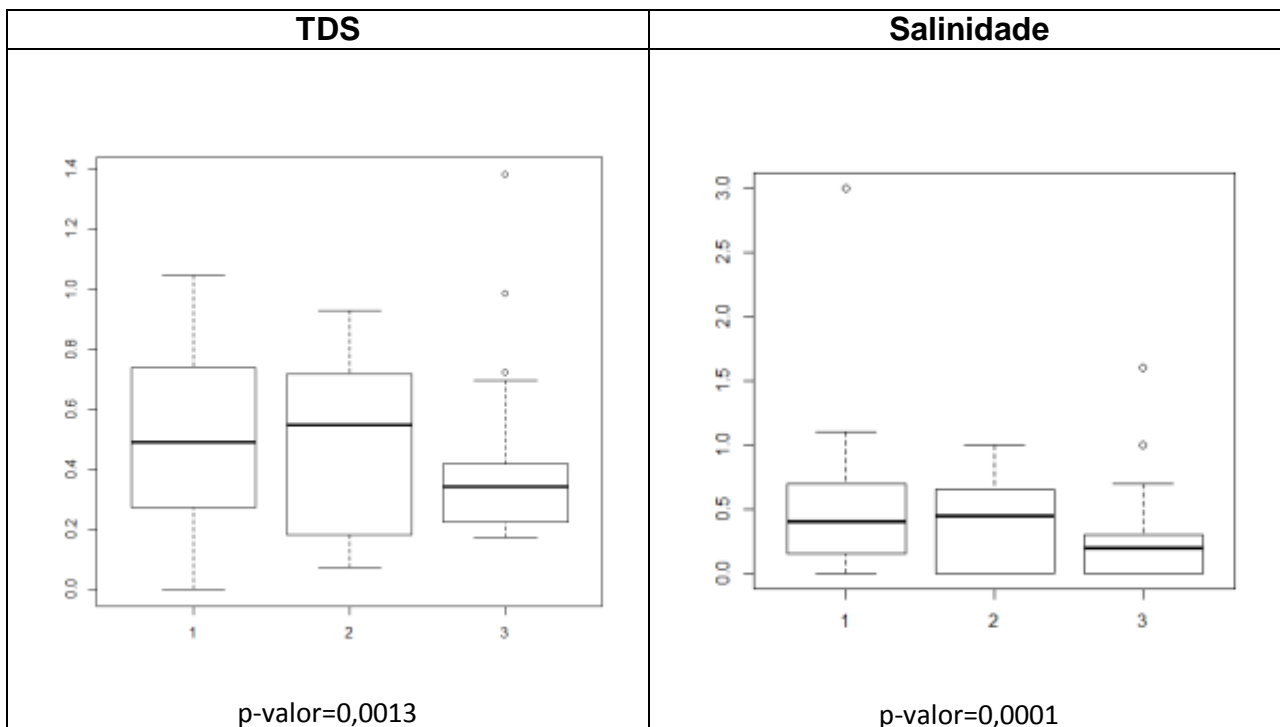




A Figura 13 apresenta a variação dos fatores físico-químicos entre os três níveis. De todas as variáveis, apenas a temperatura apresentou uma mediana superior no nível mais baixo do vale. As demais variáveis apresentaram uma mediana inferior no nível mais baixo do vale, sendo que dessas, a turbidez apresentou uma mediana inferior no nível médio do vale. Considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o $p\text{-valor} < \alpha$ para todas as variáveis físico-químicas, aceitando-se H_0 . Conclui-se que os dados observados no presente estudo mostram evidência suficiente para garantir que exista diferença significativa entre os níveis do vale.

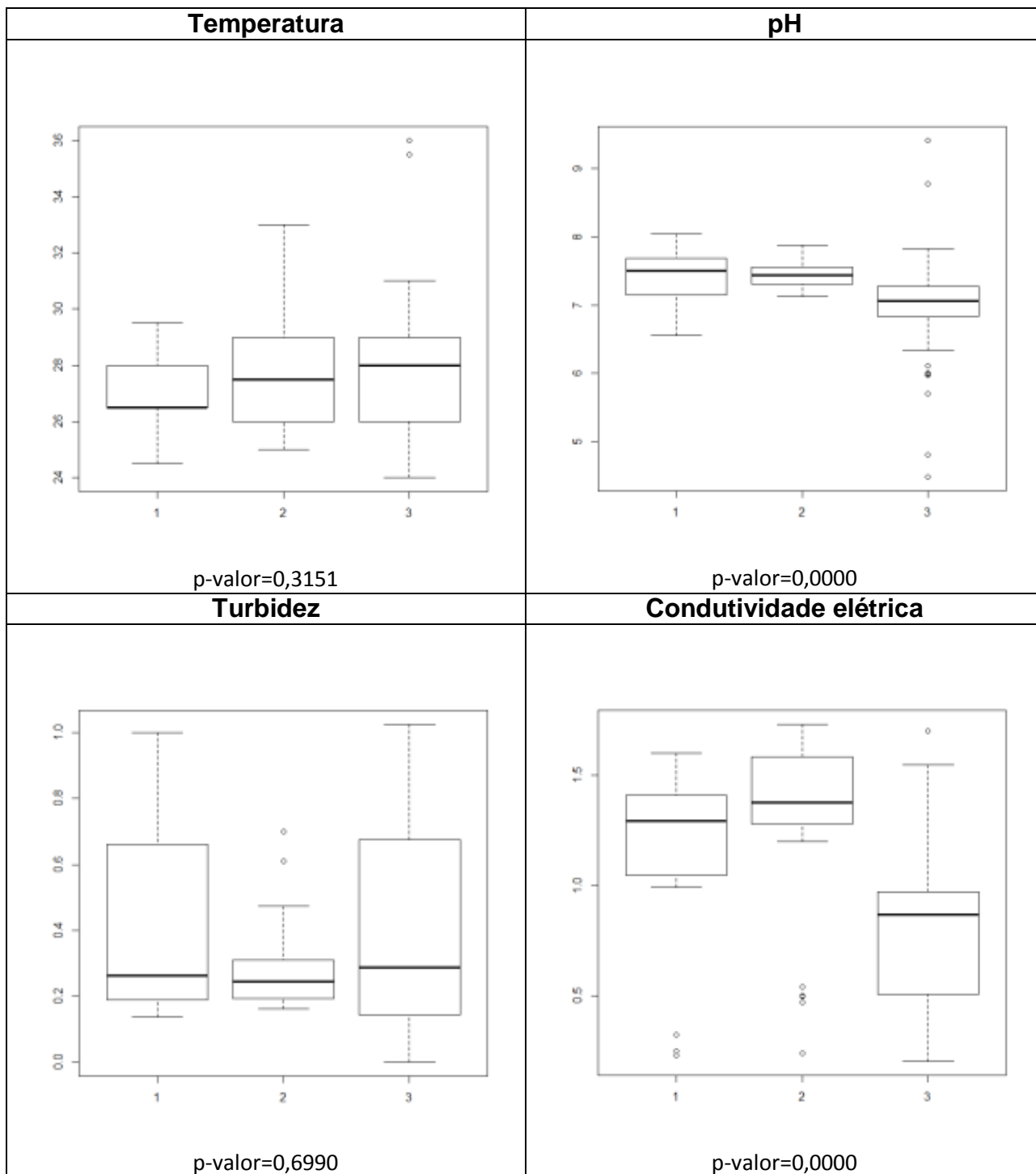
Figura 14. Box-plot das variáveis físico-químicas para o período (julho/2011), comparando os três níveis do vale: 1 (alto); 2 (médio) e 3 (baixo).

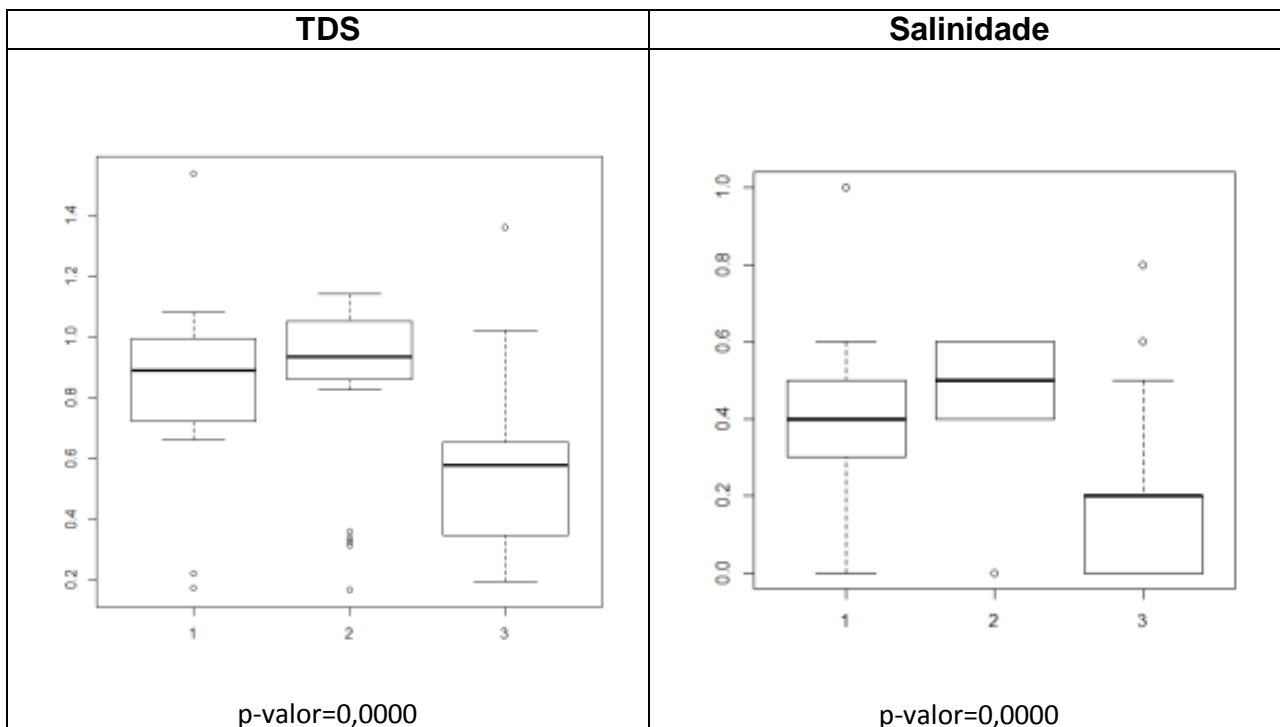




Através do teste de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $< \alpha$ para todas as variáveis físico-químicas, aceitando-se H_0 . Conclui-se que os dados observados no presente estudo mostram evidência suficiente para garantir que exista diferença significativa entre os três níveis do vale, no primeiro período. A Figura 14 traz a comparação, por meio de um gráfico *box-plot*, das variáveis físico-químicas entre os três níveis do vale para o mês de julho. Através da observação da caixa, pode ser visualizar que existe diferença na temperatura entre os três níveis, sendo inferido que a mediana aumenta gradualmente do nível mais alto do vale, para o nível mais baixo. A variável pH também apresentou diferença entre os três níveis do vale. O pH no nível mais baixo do vale apresentou uma mediana inferior aos outros níveis. Na comparação da variável turbidez entre os três níveis do vale, pode ser observar que existe uma diferença entre os três níveis coletados. A mediana das variáveis condutividade elétrica e TDS foi menor no nível mais baixo do vale, assim como a salinidade.

Figura 15. Box-plot das variáveis físico-químicas para o período (janeiro/2012), comparando os três níveis do vale: 1 (alto); 2 (médio) e 3 (baixo).





A Figura 15 faz a mesma comparação, para o mês de janeiro. Ficou evidente, através da observação da caixa, que existe diferença na temperatura entre os três níveis, sendo inferido também que a mediana aumenta gradualmente do nível mais alto do vale, para o nível mais baixo. A variável pH também apresentou diferença entre os três níveis do vale, sendo que o pH no nível mais baixo do vale apresentou uma mediana inferior aos outros níveis.

A mediana da turbidez foi maior no nível mais baixo. A mediana das variáveis condutividade elétrica, TDS e salinidade foi menor, no nível mais baixo do vale. Apenas as variáveis temperatura e turbidez não apresentaram diferença significativa, confirmada através do teste Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$).

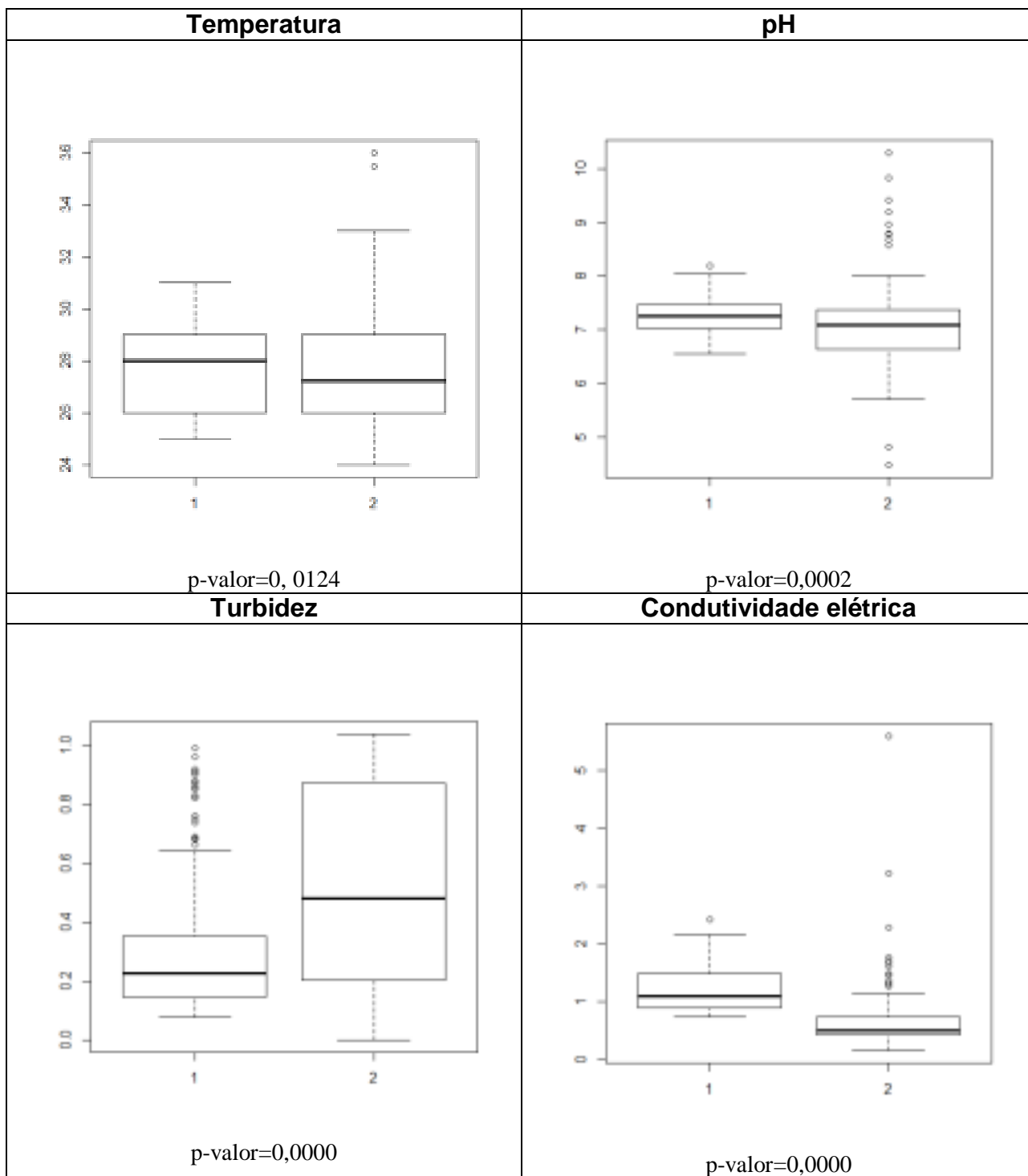
Houve similaridade no aumento da temperatura no nível mais baixo do vale, entre os dois períodos. Por outro lado, quando analisamos o pH, fica evidente que o mesmo teve seu valor reduzido no nível mais baixo do vale. Os mesmos gráficos indicam que a turbidez apresentou-se maior no nível mais alto do vale, enquanto as variáveis condutividade, TDS e salinidade foram maiores no nível mais alto e menores no mais baixo do mesmo vale. Ainda que muitas dessas variáveis apresentem diferença

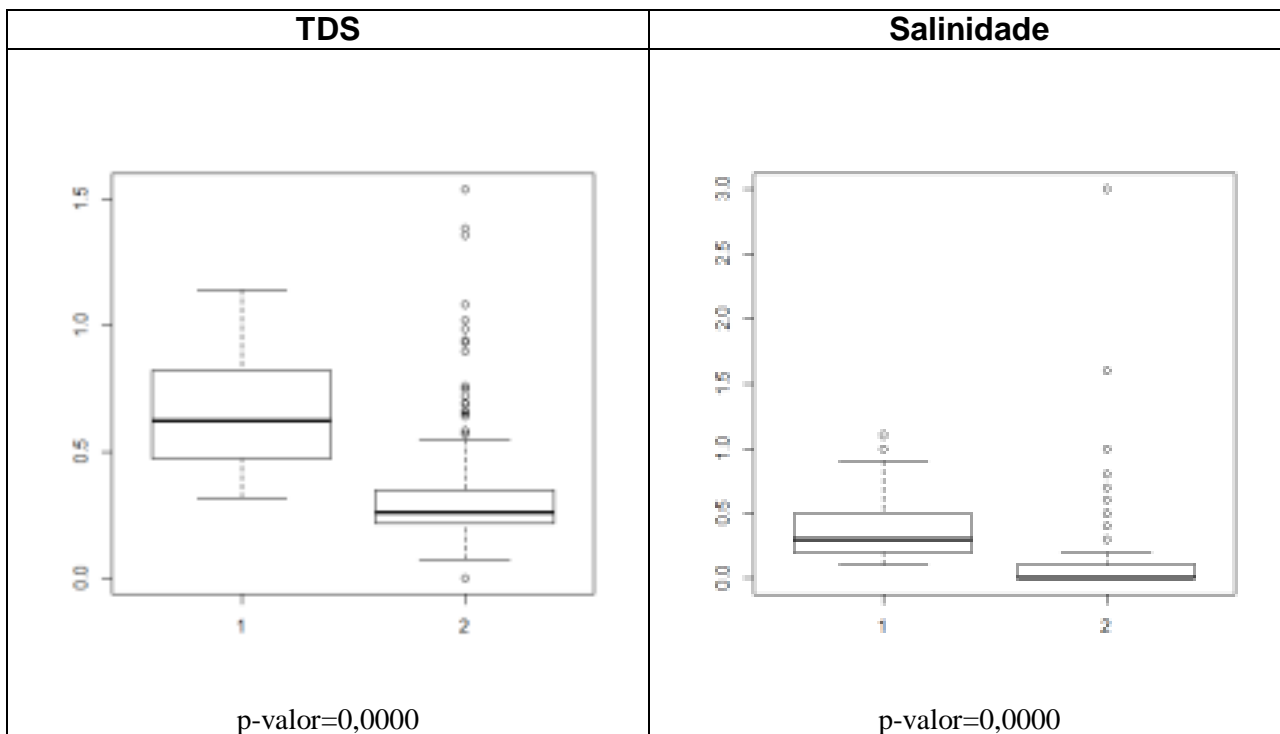
significativa entre os níveis, não foi possível identificar algum padrão de comportamento dos dados físico-químicos que venha estratificar o vale através da sua topografia, sendo necessário identificar outros fatores que possam estar relacionados com a localização da moradia e a incidência da doença. De qualquer forma, observando os dados apresentados, ainda que não seja possível ratificar que as variáveis físicoquímicas estejam influenciando na taxa de positividade de *Leptospira* patogênica no presente estudo, há indícios que a menor temperatura, assim como pH e turbidez mais elevados estejam favorecendo à presença do organismo no ambiente.

5.3.3 Variação entre tipos de água

As Figuras 16, 17 e 18 servem para comparar diferenças entre as matrizes de água.

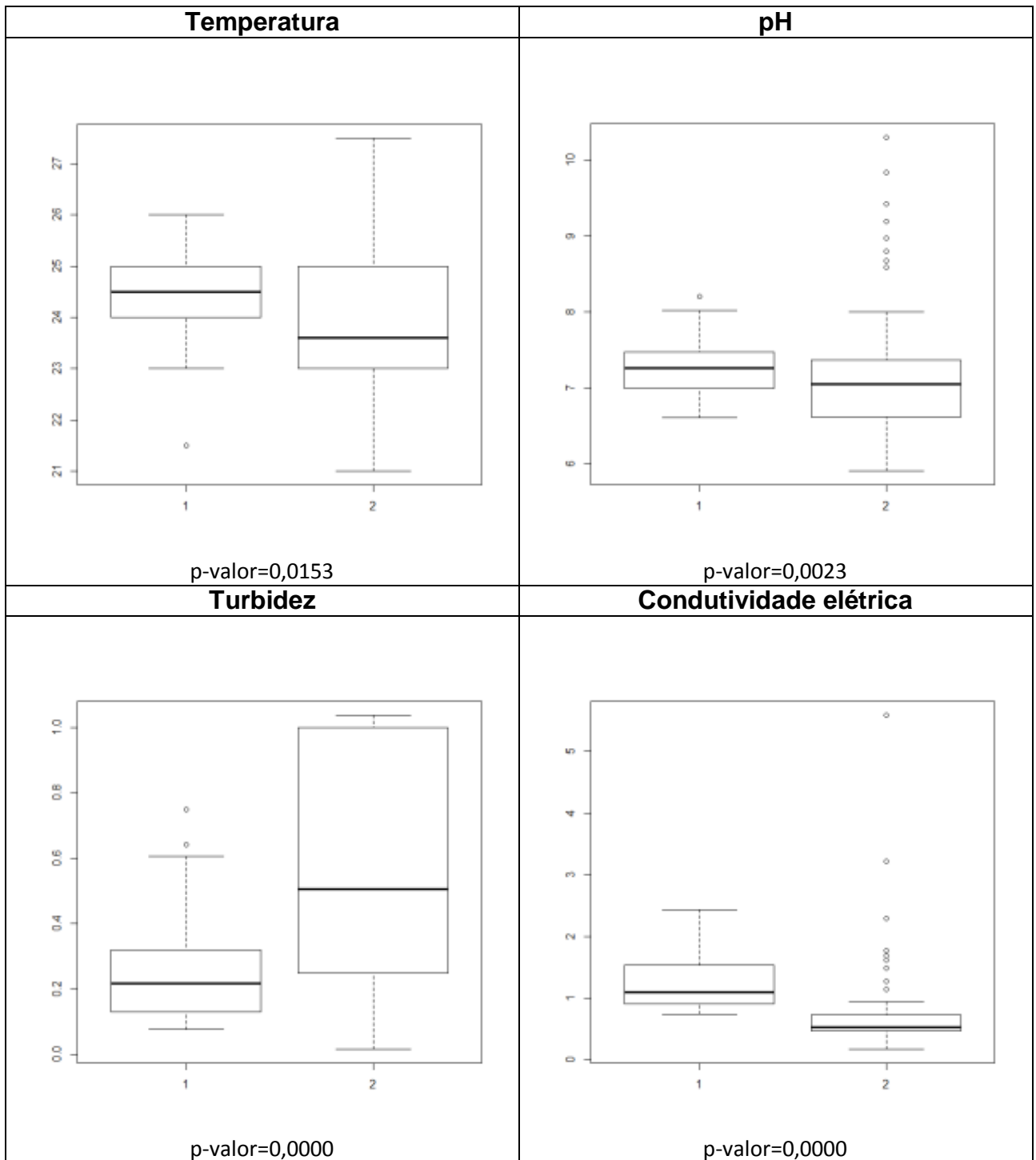
Figura 16. Box-plot da variáveis físico-químicas, comparando as duas matrizes de água: 1 (córrego com esgoto) e 2 (empoçada).

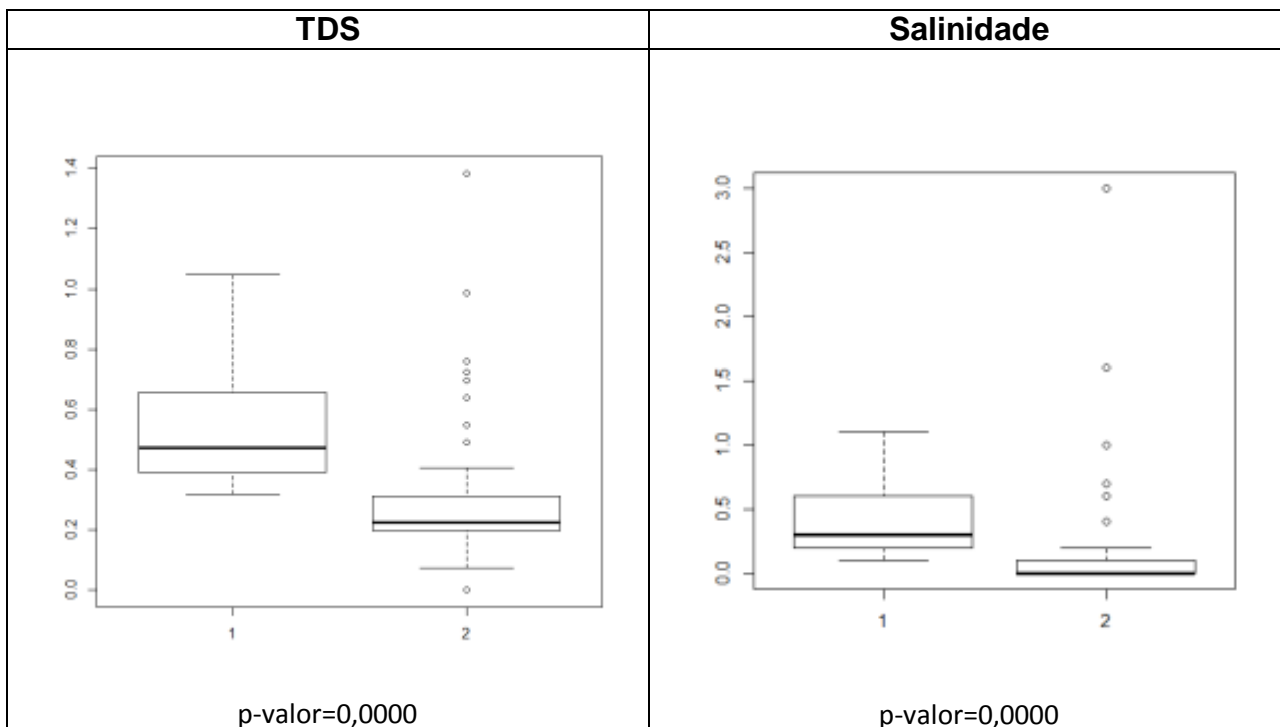




Por meio do gráfico da Figura 16 é possível notar que na matriz de água córrego com esgoto os valores das variáveis: temperatura, pH, condutividade elétrica, TDS e salinidade foram superiores, em relação a matriz de água empoçada. Sendo comprovado, através do teste Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $< \alpha$ para todas as variáveis físico-químicas, aceitando-se H_0 . Conclui-se que os dados observados no presente estudo mostram evidência suficiente para garantir que exista diferença significativa entre os dois tipos de água.

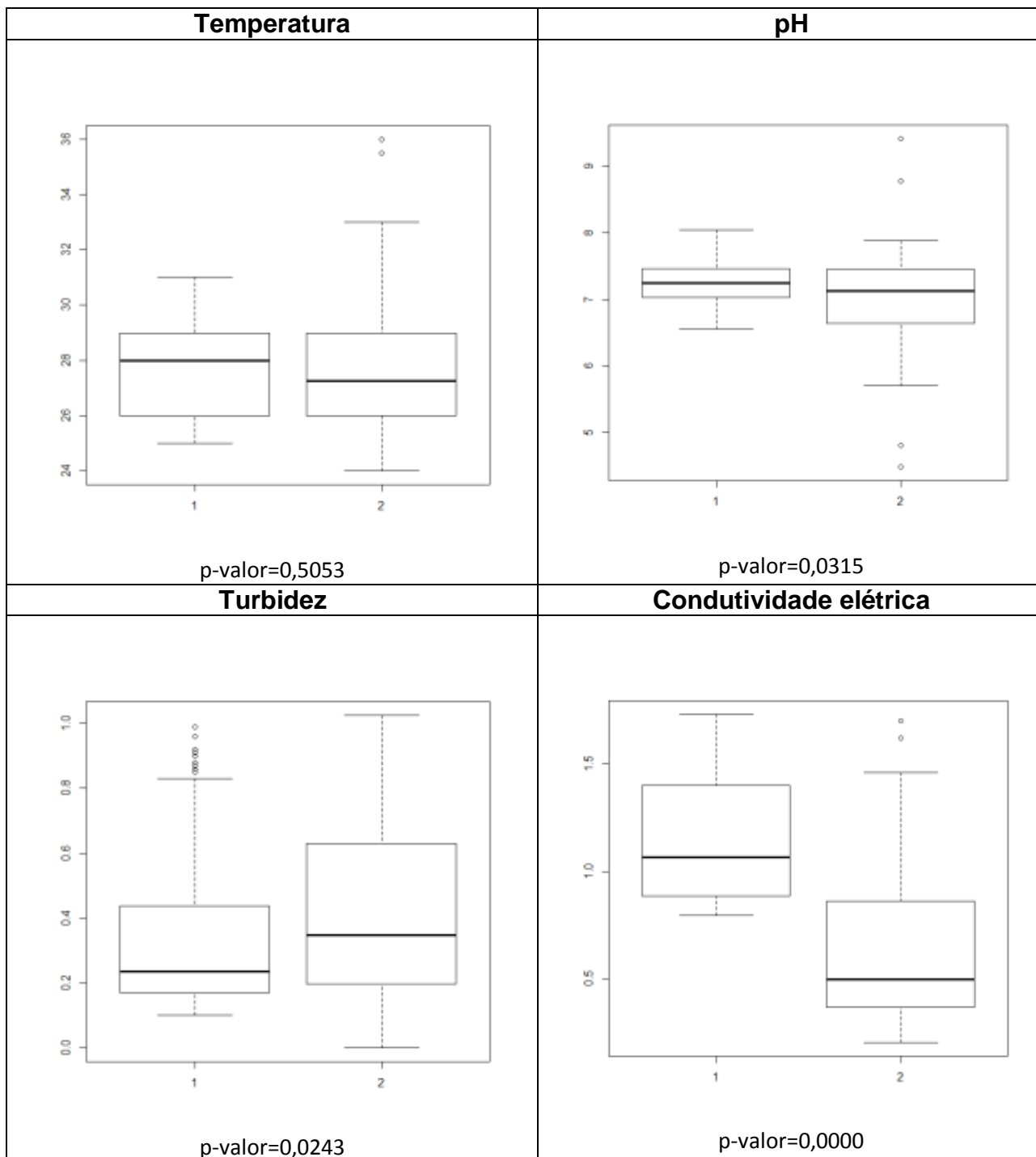
Figura 17. Box-plot das variáveis físico-químicas (julho/2011), comparando as duas matrizes de água: 1 (córrego com esgoto) e 2 (empoçada).

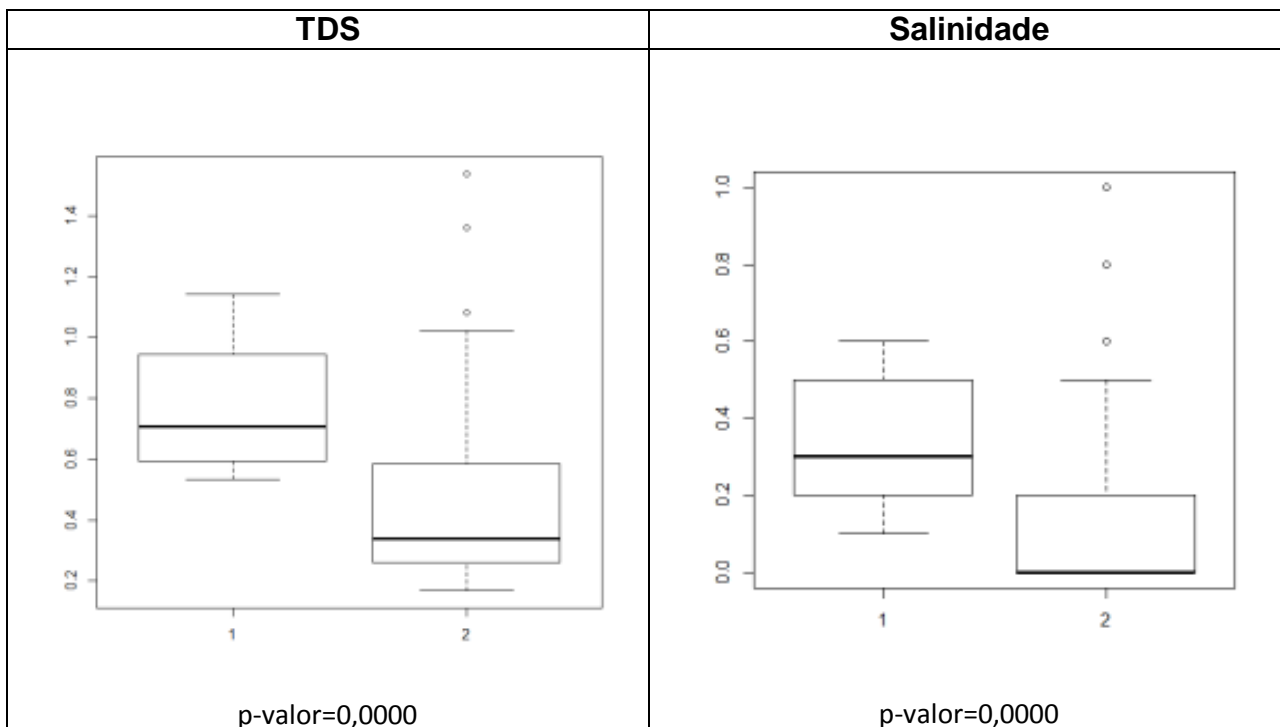




Analisando o *Box-plot* da Figura 17, quando comparamos a variabilidade da temperatura nas duas matrizes de água, por meio dos tamanhos das caixas, há evidência, que a temperatura na água empoçada apresentou uma maior dispersão nos resultados, porém ela apresentou uma maior mediana no córrego com esgoto. O mesmo comportamento foi observado com a variável pH. Já a Turbidez, apresentou maiores valores na água empoçada, assim como uma maior variação nos dados. Para as demais variáveis: condutividade elétrica, TDS e salinidade, foram observados o mesmo comportamento, onde essas variáveis apresentaram uma menor dispersão nos dados, na matriz de água empoçada. Sendo que todas variáveis apresentaram diferença significativa entre as duas matrizes de água, de acordo o teste Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o p-valor $< \alpha$ para todas as variáveis físico-químicas, aceitando-se H_0 .

Figura 18. Box-plot da variáveis físico-químicas (janeiro/2012), comparando as duas matrizes de água: 1 (córrego com esgoto) e 2 (empoçada).





Analisando o *Box-plot* da Figura 18, quando comparamos a variabilidade da temperatura nas duas matrizes de água, por meio dos tamanhos das caixas, há evidência, que a temperatura na água empoçada apresentou uma maior dispersão nos resultados e apresentou uma maior mediana na matriz córrego com esgoto. O mesmo comportamento foi observado com a variável pH, repetindo o padrão que ocorreu no mês de julho. Já a Turbidez, apresentou maiores valores na água empoçada, assim como uma maior variação. Para as demais variáveis: condutividade elétrica, TDS e salinidade, foram observados o mesmo comportamento, onde essas variáveis apresentaram uma menor dispersão nos resultados. Sendo que todas variáveis, com exceção da temperatura, apresentaram diferença significativa entre as duas matrizes de água, de acordo o teste Mann-Whitney, considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 5$), onde o $p\text{-valor} < \alpha$ para essas variáveis físico-químicas, aceitando-se H_0 .

Após ter sido realizado os gráficos de todas variáveis, para verificar se existe diferença entre elas, considerando as matrizes de água, ficou evidente que dentre todas elas, apenas a turbidez apresentou valores superiores na matriz água empoçada. Uma das principais diferenças entre os ecossistemas dinâmicos, como córregos e estáticos como a água empoçada é que os córregos tendem a ser mais abertos, apresentando trocas

entre a terra e a água, com fluxo contínuo e mais intenso, transportando materiais e nutrientes, o que poderia diretamente aumentar sua turbidez. No caso especial das águas de Pau da Lima, é possível que o solo do tipo argiloso, tenha influenciado na maior turbidez encontrada na água empoçada, já que essa tende a ser mais concentrada. Por outro lado, como o córrego capta todo o efluente doméstico, que a princípio é rico em matéria orgânica e nutrientes, aconteceu o resultado esperado de encontrar maior valor da condutividade elétrica, TDS e salinidade na matriz córrego com o esgoto, já que a decomposição da matéria orgânica libera íons e nutrientes (GOLTERMAN, 1978).

Comparando os resultados microbiológicos obtidos por esta pesquisa com a análise físico-química, pode-se constatar que, a redução de todas as variáveis entre as matrizes de água, com a exceção da turbidez, favoreceu a uma menor positividade na água empoçada. No caso especial da variável temperatura, estudos informam que ambientes com elevadas temperaturas favorecem ao melhor desenvolvimento do patógeno no ambiente. Considerando que o local de estudo apresentou uma faixa ótima para seu desenvolvimento (21-36°C), ficou evidente também que, dentro dessa faixa, a redução da temperatura indicou uma maior taxa de positividade. Essa inferência serve para demonstrar que não há explicações definitivas para esse achado, indicando que os processos entre os fatores presentes na água são complexos e abrangentes, estando condicionadas à resultante dos efeitos sinérgicos e antagônicos de inúmeras variáveis.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

A amplificação do gene *lipL32*, através da técnica qPCR apresentou validade na detecção de *Leptospira* patogênica em amostras ambientais, provando ser uma ferramenta valiosa na compreensão do patógeno, além de servir como uma ferramenta científica que poderá atuar de forma eficiente nas estratificação do risco de leptospirose.

A maior positividade de *Leptospira* durante o mês de julho está em concordância com a incidência da doença durante o mesmo período, que se surge em forma de surtos anuais, após fortes chuvas .

É provável que a maior taxa de positividade de *Leptospira* no turno da manhã tenha ocorrido por conta do hábito noturno dos roedores, principais disseminadores do patógeno no ambiente. Outra hipótese contemplada no desenho em estudo é que, a temperatura seja uma possibilidade de diferenças de positividade para amostras coletadas em diferentes períodos ao longo do dia.

Considerando os resultados encontrados pelas análises físico-químicas, pode-se identificar que as matrizes de água de Pau da Lima apresentam faixas de temperatura, pH e salinidade propícias a um maior tempo de sobrevivência do patógeno no ambiente. Estando de acordo com o que já foi mensurado em experimentos realizados em laboratório.

Os resultados obtidos não indicaram que o nível mais baixo do vale atua como um fator de risco para leptospirose, indicando que outros fatores podem estar auxiliando na maior incidência da doença de acordo com a moradia.

Com base nos resultados analisados, ficou evidente que existem diferenças significativas na taxa de positividade de *Leptospira* em relação à variação temporal.

Ainda que os dados apresentados não forneçam evidências estatísticas significativas sobre a correlação significativa entre a concentração de *Leptospira* e as variáveis físico-

químicas é observado que as variáveis mensuradas poderiam influenciar na concentração do patógeno, *in vivo*.

Dentre todas as variáveis físico-químicas, a condutividade elétrica, a salinidade e o TDS foram as que apresentaram correlação significativa entre si, como deve acontecer, devido às características destes três parâmetros.

Considerando os dois períodos, julho/2011 e janeiro/2012, a temperatura e TDS foram as únicas variáveis que apresentaram diferença significativas, onde as duas tiveram valores superiores no mês de janeiro.

Dentre todas variáveis, a temperatura e pH se apresentaram como as mais influenciadas pela variação diária.

Ainda que todas variáveis físico-químicas apresentem diferença significativa entre os níveis do vale, não foi possível identificar um padrão que possa estratificar o vale, de acordo sua topografia.

As matrizes de água também apresentaram diferença significativa entre as variáveis físico-químicas.

Para a continuidade deste trabalho sugerem-se estudos aprofundados incluindo outros fatores ambientais presentes na água, como o oxigênio, além de explorar a importância do solo como reservatório ambiental de *Leptospira*. E em paralelo a investigação ambiental, correlacionar a presença do patógeno, com a transmissão da doença aos humanos, juntamente com um estudo ecológico dos roedores, para que sejam identificados os componentes que mais influenciam na presença e concentração de *Leptospira* patogênica no ambiente, e se essa dinâmica tem direta relação com o desfecho da transmissão no homem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. & FAINE, F. The genus *Leptospira*. In: DWORKIN, M. *et al.* The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Singapore: Springer, 2006, p. 1037.
- ADLER, B. & MOCTEZUMA, A. D. L. P. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AHMAD, S.N., SHAH, S. & AHMAD, F.M.H. Laboratory diagnosis of Leptospirosis, *Journal of Postgraduate Medicine*. 51: 195-200, 2005.
- ALSTON, J. M. & BROOM, J. C. Leptospirosis. in man and animals, E. e S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 1958.
- ASHFORD, D.A., BOZZA, M., FREIRE, M., MIRANDA, J.C., SHERLOCK, I., EULALIO, C. & LOPES, U. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 251-255, 1995.
- AVIAT, F.; BLANCHARD B.; MICHEL V. & BLANCHET B. *Leptospira* exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Exeter, v. 32, n. 6, p. 463-476, 2009.
- BAAR, C.; d'ABBADIE, M.; VAISMAN, A. & MERCEDES, E. Arana Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acid Research*, Tokyo, v. 39, n. 8, p. e51-e51, 2011.
- BABUDIERI, B.. Animal reservoirs of leptospirosis. *Annals New York Academy Science*. N. 70, 1958.
- BARRAGAN, V. A.; MEJIA, M. E.; TRAVEZ, A. & ZAPATA, S.. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Curr Microbiol*, v.62, n.6, p.1802-1806, 2011.

BRAGAGNOLO, L. & MIELNICZUK, J. Cobertura do solo por palha de trigo e seu relacionamento com a temperatura e umidade do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 14, p. 369-374, 1990.

BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICARDI, J.N., MATTHIAS, M.A. & DIAZ, M.M. Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 3 : 757 – 771, 2003.

BOLLMAN, H. A. *Relação da densidade populacional sobre variáveis de qualidade físicoquímico das águas superficiais em Microbacias hidrográficas urbanas sem cobertura sanitária em Porto Alegre- RS.* 2003. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS, Porto Alegre, 2003.

BRAID M.D.; DANIELS L.M. & KITTS CL. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 389-393, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de saneamento. 4ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006. 408 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: Ministério da Saúde, Série B, 2006. 212p.

BRASIL. Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico. Brasília – DF, p. 01-34, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013. 149p.: il.9 volumes ISBN.

BUNNELL J.E.; BUSHON R.N.; STOEKEL D.M.S. & GIFFORD A.M. Preliminary geochemical, microbiological, and epidemiological investigations into possible linkages between lignite aquifers, pathogenic microbes, and kidney disease in northwestern Louisiana. U.S. Geological Survey Open- File Report 2003-374, 2003.

- CHANG, S.I.; 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. Department of sanitary engineering, graduate school of engineering and school of public health. Journal of Infectious Diseases 82 (3), 256– 266, 1948.
- CHANDRASEKARAN, S. & GOMATHI, S. A standard screening test for the early and rapid diagnosis of leptospirosis. Indian Journal of Medical Microbiology, Mumbai, v.22, n. 1, p. 23-27, 2004.
- CHEN, T. Development and present status of a leptospiral vaccine and the technology of vaccine production in China. Japanese Journal of Bacteriology, v. 40, n. 4, p. 755-762, 1985.
- CORNEY, B. G., COLLEY J. & GRAHAM, G. C. Simplified analysis of pathogenic leptospiral serovars by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Journal of Medical Microbiology, 46, 927-932, 1997.
- COSTA E., COSTA Y.A.; LOPES A.A.; SACRAMENTO E. & BINA J.C. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. Rev Soc Bras Med Trop. 34(3):261-67, 2001.
- COSTA, F. Estudos ecológicos sobre reservatórios urbanos de leptospirose em Salvador. 114 f. il. Dissertação (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.
- CRAWFORD, R. J.; Jr., BRAUN, J. L.; McCULLOCH, W. F. & DIESCH, S. L. Characterization of leptospires isolated from surface waters in Iowa. Bull. Wildlife Disease Assoc. 5: 157-165, 1969.
- DAVIS, H.; CASTA, A. & SCHATZ, G. Urban rat surveys. Atlanta: U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service. 22p. (CDC 77-8344), 1974.
- DE FARIA M.T, CALDERWOOD M.S, ATHANAZIO D.A, MCBRIDE A.J.A, HARTSKEERL R.A. & PEREIRA M.M. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from a high endemic urban setting for leptospirosis in Brazil. Acta Trop. Oct;108(1):1-5, 2008.

DERRICK, E.H. Estimation of the incubation period of canefield leptospirosis from the weekly work pattern. *Pathology*. 1:73-75, 1969.

DI BERNARDO, L. Métodos e Técnicas de Tratamento de Água. Columes I ell. Associação Brasileira de engenharia Sanitária e Ambiental – ABES 481 p. Rio de Janeiro, 1993.

DIAS J.P.; TEIXEIRA M.G.; COSTA M.C.; MENDES C.M. & GUIMARAES P. Factors associated with *Leptospira sp* infection in a large urban center in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 499–504, 2007.

DIESCH, S. L., McCULLOCH, W. F., BRAUN, J. L. & CRAWFORD, R. P. Environmental Studies on the Survival of Leptospire in a Farm Creek Following a Human Leptospirosis Outbreak in Iowa. *Bull. Wild. Dis. Assoc.* 5: 166-173, 1969.

ELDER, J. K.; MCKEON, G. M.; DUNCALFE, F.; WARD, W. H. & LEUTTON, R. D. Epidemiological studies on the ecology of *Leptospira interrogans* serovars *pomona* and *hardjo* in Queensland. *Preventive Veterinary Medicine*. 3:501-521, 1986.

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. *Am. J. Vet.*, 1965.

ELLINGHAUSEN, H.C. Growth, cultural characteristics, and antibacterial sensitivity of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Cornell Veterinarian*. 73:225-239., 1983.

ESCÓCIO, C.; GENOVEZ, M. E.; CASTRO, V.; PIATTI, R. M.; GABRIEL, F. H. L.; CHIEBAO, D. P.; AZEVEDO, S. S.; VIEIRA, S. R. & CHIBA, M. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 77, n. 3, p. 371-379, 2010.

EVANS, A. S. Chapter 1. Epidemiologic Concepts, p. 13-64. In A. S. Evans and P. Brachman (ed.), *Bacterial Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3rd ed. Plenum Medical, New York, 1998.

EVERARD, J.D. Leptospirosis. In: Cox, F.E.G. *The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases*, London: The Wellcome Trust. p.111-119., 1996.

- FAINE, S. Virulence in *Leptospira*. II. The growth in vivo of virulent *Leptospira* icterohaemorrhagiae. *British Journal of Experimental Pathology*. 38:8-14., 1957.
- FAINE, S.A.; BOLIN, B. & PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2 ed. Melbourne, Australia: MedSci, 1999.
- FERRO B.E, RODRIGUEZ A.L, PEREZ M. & TRAVI B.L. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomedical*, 26(2): 250-257. [Seroprevalence of *Leptospira* infection in habitants of peripheral neighborhoods in Cali, Colombia]., 2006.
- FIGUEIREDO, C.M.; MOURAO, A.C.; OLIVEIRA, M.A.A.; ALVES, W.R.; OOTEMAN, M.C.; CHAMONE, C.B. & KOURY, M.C. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. *Rev Soc Med Trop*, v34, p331. 2001.
- GANOZA C.A., MATTHIAS M.A., COLLINS-RICHARDS D., BROUWER K.C. & CUNNINGHAM C.B. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 3: e308. doi:10.1371/journal.pmed.0030308, 2006.
- GOLTERMAN, H. L.; *Methods for chemical analysis of freshwater*, Oxford and Edinburgh: Blacwell Scientific Publications: Philadelphia, 1978.
- GORDON K.V., VICKERY M.C., DEPAOLA A., STALEY C. & HARWOOD V.J. Real-time PCR assays for quantification and differentiation of *Vibrio vulnificus* strains in oysters and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1704–1709, 2008.
- GREEN, S. S.; GOLDBERG H. S. & BLENDEN, D. C. Enzyme patterns in the study of *Leptospira*. *Applied Microbiology*. 15:1104-1113, 1967.
- HARTSKEERL, R.A. Leptospirosis: current status and future trends. *Indian J. Med. Microbiol.*,v.24, 2006. p.309.
- HELLSTROM, J.S. & MARSHALL, R.B. Survival of *Leptospira-interrogans* serovar *pomona* in an acidic soil under simulated New-Zealand field conditions. *Research in Veterinary Science* 25 (1), 29–33, 1978.

- HENRY, R.A., JOHNSON, R.C., BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. Detection of *Leptospira* in soil and water by immunofluorescence staining. *Appl Microbiol.* May;21(5):953–956. 1971.
- HENRY, R. A. & JOHNSON, R. C. Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology* 35 (3), 492–499. 1978.
- HENNEBERRY, R. C. & COX, C. D. β -Oxidation of fatty acids by *Leptospira*. *Canadian Journal of Microbiology*. 16:41-45. 1970.
- IBGE. Resultados do Universo. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2000. 2002
- IBGE. Censo Demográfico 2010. Salvador, 2012. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas|censo-demografico-2010>. Acesso em: 25 nov. 2012.
- INADA, M.D.; YUTAKA IDO, M.D.; ROKURO HOKI, M.D., RENJIRO KANEKO, M.D. & ITO, M.D.. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J. Exp. Med.*, v.23, p.377-402, 1916.
- ISSAZADEH, K.; AMIRMOZAFFARI, N.; MEHRABIAN, S.; ORYAN, H. Assessment of distribution *Leptospira spp.* in surface waters of Guilan province. *World Journal of Zoology* 4(2): 79–84, 2009.
- JANSEN, A.; SCHÖNEBERG, I.; FRANK, C.; ALPERS, K. & SCHNEIDER, T. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 11, n. 7, p. 1048-1054, 2005.
- JOHNSON R.C. & HARRIS V.G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 94:27–31, 1967.
- JOUGLARD, S.D.D. Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira spp.* por sequenciamento do 16S rDNA e análise de VNTR. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, 2005.

KABOOSI H., RAZAVI M.R. & NOOHI A.A. Efficiency of filtration technique for isolation of leptospires from surface waters: role of different membranes with different pore size and materials. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2010.

KHAIRANI-BEJO,S.; BAHAMAN, 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* 3(3):123-129, 2004.

KMETY, E. & DIKKEN, H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. 1st edition ed.: Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*, 1992.

KO. A.I.; REIS, M.G.; DOURADO,C.M.R.; JOHNSON JR., W.D. & RILEY, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Rev. The Lancet*, London, 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*, London, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

LARSON, A. D., TREICK, R. W.; EDWARDS, C. L. & COX, C. D. Growth studies and plate counting of leptospires. *Journal of Bacteriology*. 77:361-366. 1957.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 14 (2), 296–326. 2001

LEVETT, P. N. *Leptospira*. In: MURRAY, P. R. *et al.* *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D. C.: ASM Press, 2007, p. 1267.

LLOYD, K. G. et al. Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford v.72, n. 1, 2010. p. 143-151.

MACHADO, B. C. Avaliação da qualidade dos efluentes das lagoas de estabilização em série da Estação de Tratamento de Esgoto de Samambaia, DF para o cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Brasília, DF, 2006. 126 f.

MASI, E. Avaliação da efetividade das ações de controle de roedores na região do Campo Limpo, município de São Paulo/SP. 2006. 45p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MASI, E.; VILAÇA, P. & RAZZOLINI, M.T. Environmental conditions and rodents infestation in Campo Limpo district, São Paulo municipality, Brazil. *Int. J. Environ. Health Res.*, v.19, n.1, p.1-16, 2008

McBRIDE, A.J., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G. & KO, A.I.. Leptospirosis *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18: 376 386. 2005.

MCBRIDE A.J, SANTOS B.L, QUEIROZ A.; SANTOS A.C.; HARTSKEERL R.A.; REIS M.G. & KO A.I. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. *Clinical Vaccine and Immunology*, Washington D.C., v. 14, n. 9, p. 1245-1248, 2007.

MEEHAN, A.P. Rats and mice: their biology and control. Felcourt (UK): Rentokil, 1984. 383p.

MEITES, E.; JAY, M.T.; DERESINSKI, S. Reemerging leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis* 10:406–412, 2004.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). Brasília, DF; 2010.

MURGIA R.; RIQUELME N.; BARANTON G. & CINCO M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett*;148(1):27–34, 1997.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. & PFALLER, M.A. *Microbiologia Médica*. 3ª edição. Rio de Janeiro; Ed Guanabara Koogan, 2000.

NALAM K.; AHMED A.; MANJULATA D.S., FRANCALACCI P. & BAIG M. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS One*, v. 5, n. 8, p. e12637, 2010.

- OLIVEIRA D.S.; GUIMARAES M.J.; PORTUGAL J.L. & MEDEIROS Z. The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology*. Mar;103(2):149-57, 2009.
- OKAZAKI, W. & RINGEN, L.M. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *American Journal of Veterinary Research* 18 (66), 219–223. 1957.
- PAPPACHAN, M.J.; SHEELA, J. & ARAVINDAN, K.P. Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. *J Epidemiol Community Health*, v.58,p1054–5. 2004.
- PARKER J. & WALKER M. Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Vet Microbiol.*;152:146–150. 2011
- PEET, R. L.; MERCY, A.; HUSTAS, L. & SPEED, C. The significance of leptospira isolated from the kidneys of slaughtered pigs. *Australian Veterinary Journal*. 60:226-227. 1983.
- PEREIRA, N. Tecnologia de bioprocessos / Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bon, Maria Antonieta Ferrara. – Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.
- PEREIRA, M.M.; MATSUO M.G.; BAUAB A.R.; VASCONCELOS S.A. & MORAES Z.M. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J Clin Microbiol* 38: 450–452. 2000.
- PLANK R. & DEAN D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2(10):1265 76. 2000.
- POCOCK, M.J.O.; SEARLE, J.B. & WHITE, P.C.L. Adaptations of animals to commensal habitats: population dynamics of house mice *Mus musculus domesticus* on farms. *Journal of Animal Ecology*, Oxford, v. 73, n. 5, p. 878-888, 2004.
- PORTO, M.F.A.; BRANCO, S.M. & LUCA, S.J. Caracterização da qualidade de água. In: BRANCO, S. M. *Hidrologia ambiental*. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo / ABRH, cap. 2, p. 27-66, 1991.

- PORTO, E. & CARVALHO, E. Concentração e descentralização na Região Metropolitana de Salvador. In: Revista de Desenvolvimento Econômico. Salvador, Ano III, nº. 4, semestral p. 73-89. 2001,
- REIS R.B.; RIBEIRO G.S. & FELZEMBURGH R.D. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. PLoS Negl. Trop. Dis., v2, n4, p-e228, 2008
- RIBEIRO G.S. Estudo longitudinal da leptospirose urbana: investigação de fatores de risco para infecção e para o desenvolvimento de formas graves após a infecção. 2008.
- RIEDIGER, I.N. Comparação dos diagnósticos sorológico e molecular da leptospirose humana na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.
- ROMERO, E.C.; BERNARDO, C.C.D.M. & YASUSA, P.H. Human leptospirosis: A twenty-nine year serological study in São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.45, n.5., p.245- 8., 2003.
- SARKAR, U.; NASCIMENTO, S.F.; BARBOSA R.; MARTINS, R. & NUEVO, H. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am J Trop Med Hyg 66: 605–610, 2002.
- SAMPAIO, P.G.; WANDERLEY, M.R.; CASSEB, G.B. & NEGREIROS, M.A.M.P. Descrição epidemiológica dos casos de leptospirose em hospital terciário de Rio Branco. Rev Bras Clin Med. São Paulo, v. 9 n. 5, p.338-42, 2011.
- SAWYER, W.A. & BAUER, J.H. Survival of *Leptospira icteroides* in Various Environments. Amer. J. Trop. Med. 8: 17, 1928.
- SCHREIER, S.; DOUNGCHAWEE G.; TRIAMPO D.; WANGROONGSARB P.; HARTSKEERL R.A.; TRIAMPO W. Development of a magnetic bead fluorescence microscopy immunoassay to detect and quantify *Leptospira* in environmental water samples. Acta Trop, 2012.
- SIEGEL, S. & CASTELLAN, JR, N.J. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. Edição, Artimed, 2006. 448p.

SILVA, E.F.; BROD, C.S.; CERQUEIRA, G.M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A.; SANTOS, C.S.; KO, A.I. & DELLAGSTIN, O.A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 121, n.1-2, p.144-149, 2007.

SMITH, D. J. & SELF, H. R. Observations on the survival of *Leptospira australis* A in soil and water. *The Journal of Hygiene*, v. 53, n. 4, p. 436-444, 1955.

SMITH, C.E.G. & TURNER L.H. The effect of pH on the survival of leptospire in water. *Bull. W.H.O.* 24:35-43. 1961.

SOINI, H.; BÖTTGER, E.C. & VILJANEN, M.K. Identification of Mycobacteria by PCR-Based Sequence Determination of the 32-Kilodalton Protein Gene, *Journal of Clinical Microbiology* 32(12): 2944-2947, 1994.

SONGER J.G. & THIERMANN A.B. Leptospirosis. *JAVMA* 193: 1250-1254, 1988.

STALHEIM, O. H. V. & J. B. WILSON. Cultivation of leptospirae. I. Nutrition of "Leptospira canicola". *Journal of Bacteriology*. 88:48-54. 1964.

SUNBUL, M.; ESEN, S.; LEBLEBICIOGLU, H.; HOKELEK, M.; PEKBAY, A. & EROGLU, C.. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea Region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.33,p.896-8, 2001.

TANGKANAKUL W.; THARMAPHORNPII P.; PLIKAYTIS B.D.; BRAGG S. & POONSUKSOMBAT D. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 63: 204–208. 2000.

TASSINARI, W.S.; PELLEGRINI, D.C.; SÁ, C.B.; REIS, R.B.; KO, A.I. & CARVALHO, M.S. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int Health*. Apr;13(4):503-12. 2008.

TOLEDO, G.L. & OVALLE, I.I. *Estatística Básica*. 2 ed. São Paulo: Atlas, 1985.

TORTEN, M.; SHENBERG, E.; GERICHTER, C.B.; NEUMAN, P. & KLINGBERG, M.A. A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and serologic evaluation of a field trial with volunteers. *J Infect Dis* 128(5):647-51. 1973.

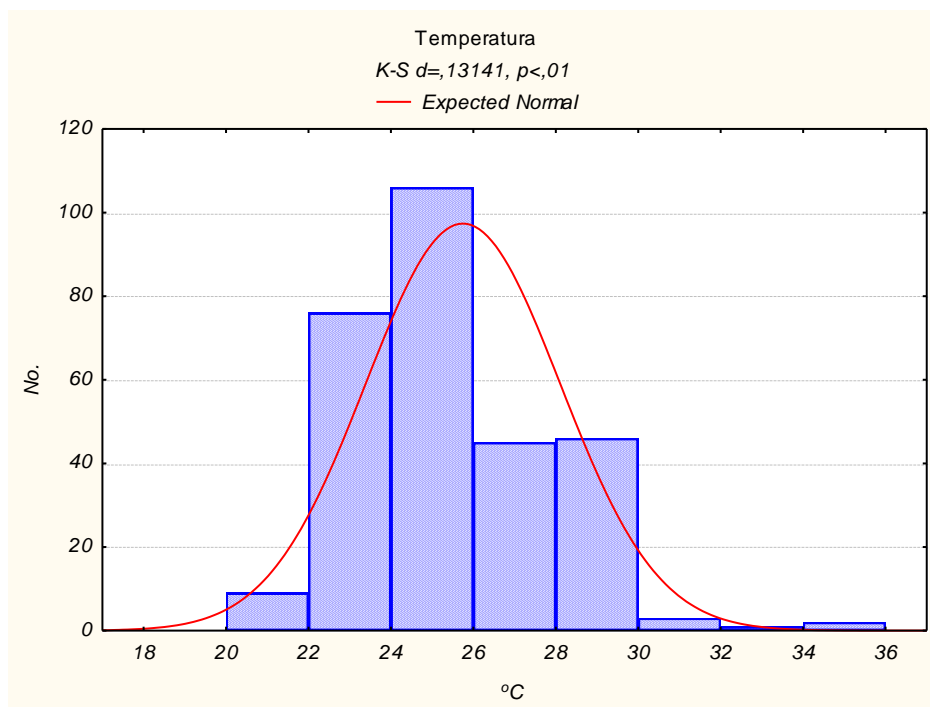
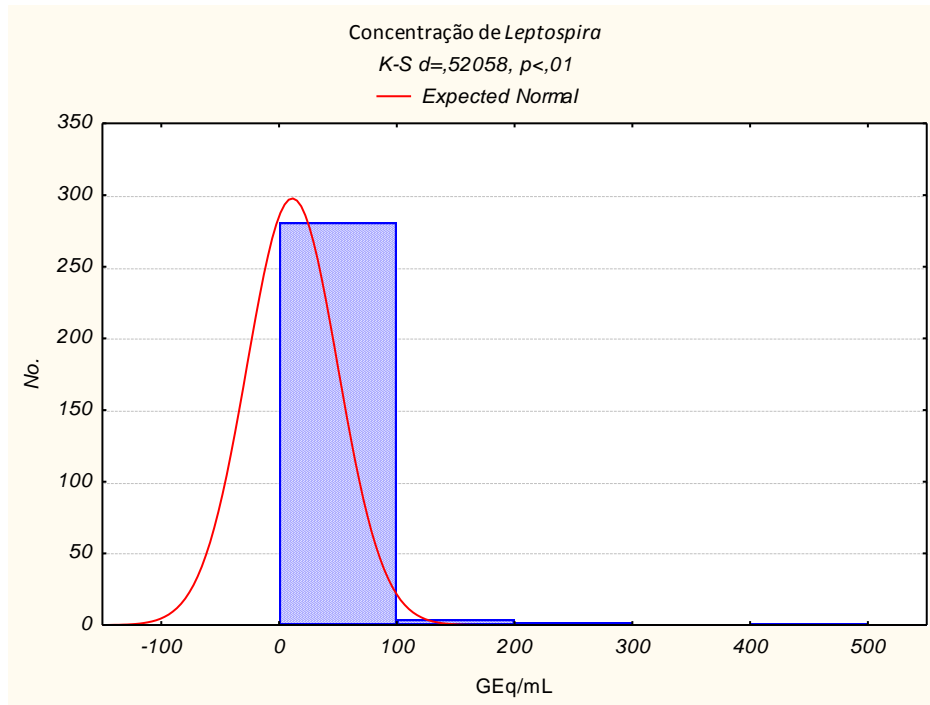
- TUNDISI, J. G. & MATSUMURA TUNDISI, T. Limnologia. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 632 p.
- TURNER, L.H. Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. Trans R Soc Trop Med Hyg; 64(4): 623–46. 1970.
- VASCONCELOS, C.H.; FONSECA, F.R.; LISE, M.L.Z. & ARSKY, M.L.N. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001–2009. Cad. Saúde Colet., Rio de Janeiro, 2012.
- VIAU, E. J. & BOEHM, A. B. Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams. Journal of Water and Health, v. 9, n. 4, p. 637-646, 2011.
- VINETZ J.M.; GLASS G.E.; FLEXNER C.E.; MUELLER P. & KASLOW D.C. Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med 125: 794–798. 1996.
- VITAL-BRAZIL, J.M.; BALASSIANO, I.T.; OLIVEIRA, F.S.; COSTA, A.D.; HILLEN L. & PEREIRA M.M. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 353-355, 2010.
- VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 1.) 1996. 243p
- WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, 2003
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. 2011.

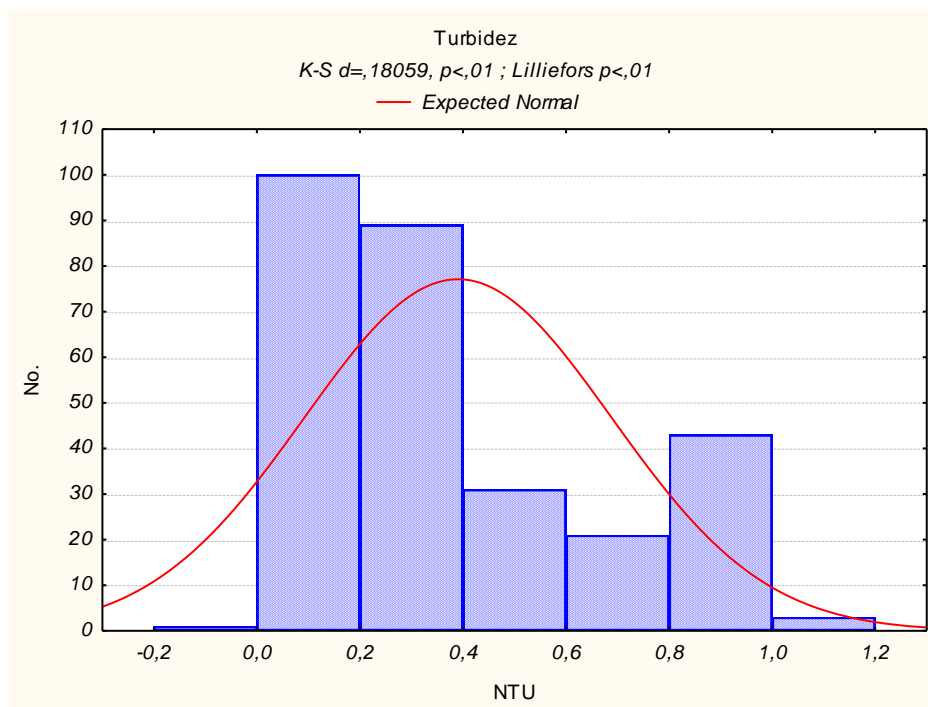
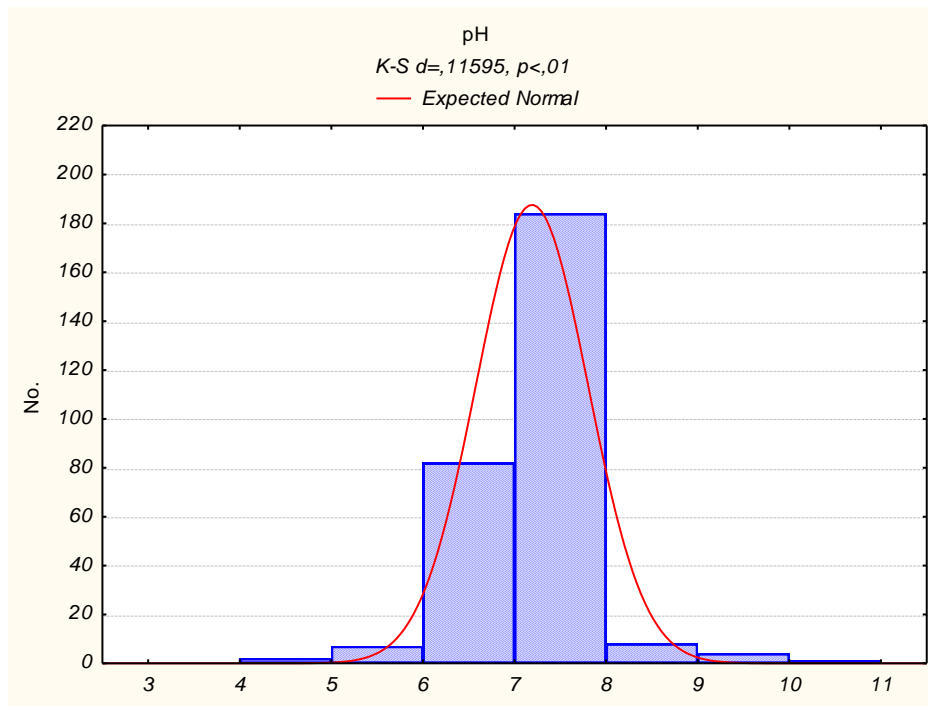
YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F. & BRENNER, D. J. "Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New Leptospira Species". *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 (4): 407–415. 1987.

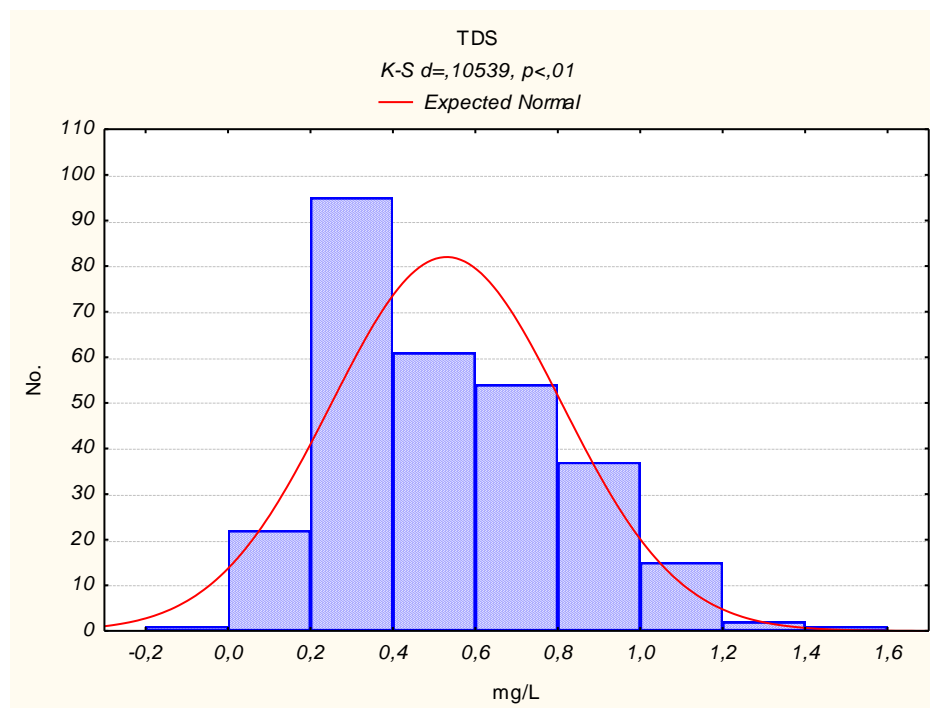
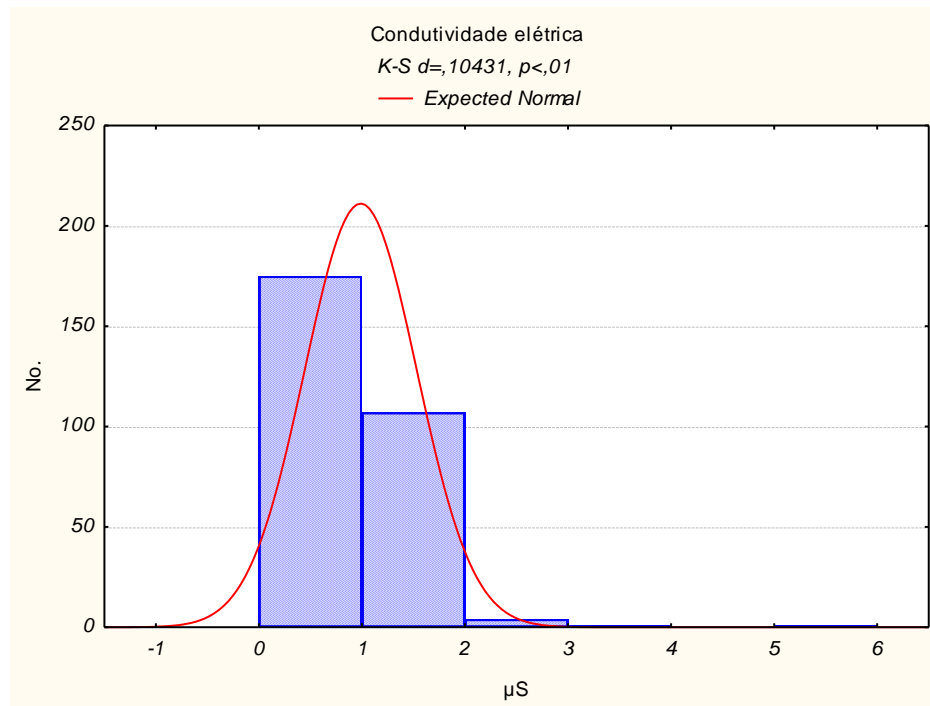
ZUMACH, R. Enquadramento de curso de água Rio Itajaí- Açú e seus principais afluentes em Blumenau. Florianópolis. 2003. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, 2003.

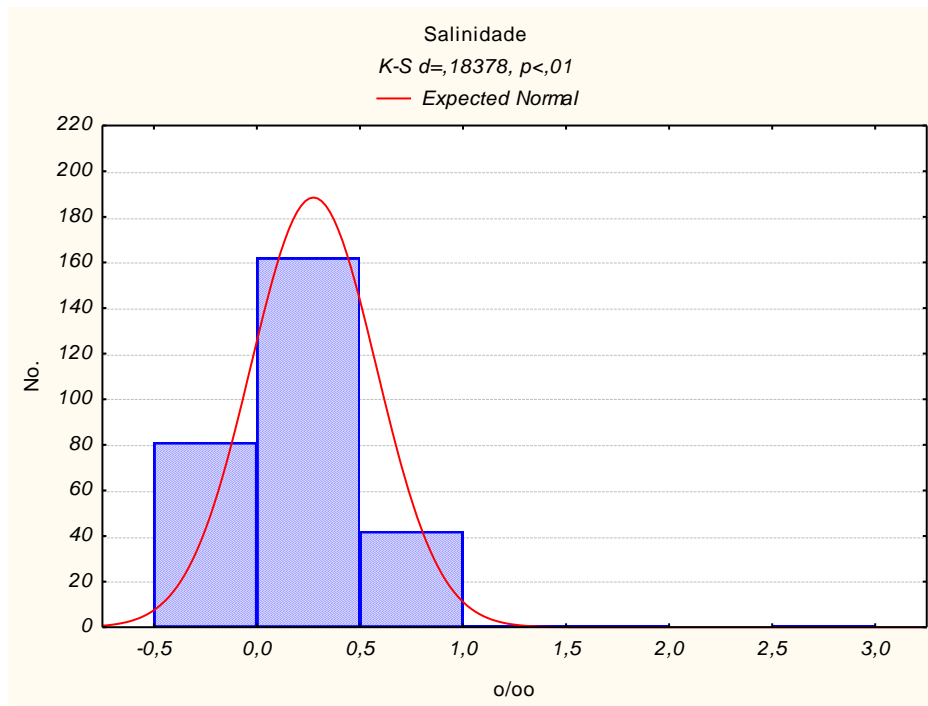
ANEXO A

TESTES DE NORMALIDADE DOS DADOS









ANEXO B

CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE TURNOS

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho (manhã).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,385*				
Turbidez	-0,016	-0,268*			
Condutividade elétrica	0,221	0,417*	-0,009		
TDS	0,142	0,486*	-0,079	0,923*	
Salinidade	0,197	0,447*	-0,046	0,975*	0,897*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho (tarde).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,503*				
Turbidez	-0,182	-0,085			
Condutividade elétrica	-0,268*	0,532*	-0,014		
TDS	-0,269*	0,533*	-0,014	0,999*	
Salinidade	-0,229	0,542*	-0,051	0,983*	0,983*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (manhã).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,017				
Turbidez	0,442*	-0,235*			
Condutividade elétrica	0,077	0,322*	-0,148		
TDS	0,177	0,371*	-0,002	0,831*	
Salinidade	0,170	0,430*	-0,003	0,800*	0,972*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (tarde).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,068				
Turbidez	-0,085	0,158			
Condutividade elétrica	-0,365*	0,552*	0,021		
TDS	-0,390*	0,564*	0,024	0,992*	
Salinidade	-0,329*	0,555*	0,056	0,976*	0,979*

* significativo ($p < 0,05$)

CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE NÍVEIS

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho (nível alto).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	0,265				
Turbidez	-0,100	-0,2592			
Condutividade elétrica	0,665*	0,459*	0,206		
TDS	0,409	0,709*	0,002	0,750*	
Salinidade	0,697*	0,440*	0,203*	0,990*	0,738*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho (nível médio).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	0,282				
Turbidez	-0,091	-0,657*			
Condutividade elétrica	0,016	-0,155	0,383*		
TDS	0,016	-0,155	0,3836	1,000*	
Salinidade	0,055	-0,085	0,326	0,982*	0,982*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho (nível baixo).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,543*				
Turbidez	-0,022	-0,242*			
Condutividade elétrica	0,019	0,392*	-0,302*		
TDS	0,018	0,393*	-0,303*	1,000*	
Salinidade	0,021	0,391*	-0,326*	0,972*	0,972*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (nível alto).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,345				
Turbidez	-0,060	-0,049			
Condutividade elétrica	-0,100	0,382	0,225		
TDS	0,190	0,196	0,539*	0,656*	
Salinidade	0,183	0,205	0,539*	0,635*	0,983*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (nível médio).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,503*				
Turbidez	0,509*	-0,325			
Condutividade elétrica	0,315	-0,267	0,199		
TDS	0,224	-0,220	0,186	0,977*	
Salinidade	0,157	-0,262	0,192	0,949*	0,966*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (nível baixo).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,160				
Turbidez	0,042	0,015			
Condutividade elétrica	0,036	0,296*	-0,044		
TDS	-0,072	0,414*	0,025	0,913*	
Salinidade	0,028	0,446*	0,042	0,860*	0,938*

* significativo ($p < 0,05$)

CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE MATRIZ

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho
(córrego com esgoto).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,669*				
Turbidez	-0,479*	0,513*			
Condutividade elétrica	-0,660*	0,782*	0,724*		
TDS	-0,659*	0,781*	0,722*	1,000*	
Salinidade	-0,655*	0,773*	0,702*	0,985*	0,985*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de julho
(água empoçada).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,466*				
Turbidez	0,138	-0,407*			
Condutividade elétrica	-0,092	0,149	0,117		
TDS	-0,170	0,212	0,059	0,917*	
Salinidade	-0,062	0,266*	0,007	0,840*	0,741*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (córrego com esgoto).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	-0,525*				
Turbidez	-0,096	0,056			
Condutividade elétrica	-0,057	0,531*	0,114		
TDS	-0,167	0,603*	0,122	0,984*	
Salinidade	-0,145	0,600*	0,152	0,955*	0,962*

* significativo ($p < 0,05$)

Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis físico-químicas do mês de janeiro (água empoçada).

	Temperatura	pH	Turbidez	Condutividade elétrica	TDS
pH	0,082				
Turbidez	0,380*	0,019			
Condutividade elétrica	-0,077	0,032	0,008		
TDS	-0,088	0,119	0,219	0,757*	
Salinidade	-0,016	0,283*	0,243	0,547*	0,826*

* significativo ($p < 0,05$)