

U

LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Leptospirose: revisão da literatura

Ana Correia Matos

Julho'2020



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Leptospirose: revisão da literatura

Ana Correia Matos

Orientado por:

Dra. Ana Mouzinho

Julho'2020

Tese realizada de acordo com o acordo ortográfico em vigor à data.

Resumo

A leptospirose é uma infeção multissistémica causada pela bactéria *Leptospira*. É neste momento considerada uma zoonose reemergente, com elevada distribuição mundial, sendo endémica em países de clima tropical e subtropical. No nosso país, o arquipélago dos Açores é considerado uma região endémica. Esta doença é transmitida pelo contacto direto com fluidos de animais infetados com a bactéria, ou pelo contacto indireto com o solo e a água (locais onde a bactéria sobrevive por vários meses). Os reservatórios naturais mais comuns são os roedores, mas canídeos, bovinos e suínos também podem ser afetados. Deste modo, fatores de risco incluem: trabalhadores agrícolas, pastores, trabalhadores de matadouros ou atividades recreativas de lazer perto de fontes de água parada (como seja a pesca, a canoagem ou a natação).

Clinicamente, manifesta-se, na maioria das vezes, por uma síndrome gripal *like* com sinais e sintomas inespecíficos que podem incluir febre, mialgias, cefaleias e náuseas. Contudo, numa minoria dos casos, evolui para insuficiência renal, insuficiência hepática, meningite, insuficiência respiratória, diátese hemorrágica ou choque séptico. Estas alterações poderão ser fatais.

O diagnóstico baseia-se em testes diretos que detetam a bactéria ou os seus componentes, como por exemplo, culturas, microscopia ou técnicas de amplificação de DNA. E em testes indiretos serológicos como por exemplo o MAT e o ELISA.

O tratamento inclui medidas sintomáticas, nomeadamente na presença de insuficiência renal ou insuficiência respiratória; e antibioterapia com penicilina, ceftriaxona ou doxiciclina.

Medidas de prevenção são essenciais no combate a esta zoonose. Estas medidas incluem: isolamento, diagnóstico e tratamento de animais infetados, melhorias habitacionais que diminuam o contacto entre humanos e ratos e deteção e tratamento de águas contaminadas.

Esta revisão procura documentar a transmissão, a clínica e as descobertas a nível da patogénese desta doença.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Palavras – chave: leptospirose, *Leptospira*.

Abstract

Leptospirosis is a multisystemic infection caused by the bacteria *Leptospira spp.* At this moment, it is considered a re-emerging zoonosis, with a worldwide distribution, being endemic in countries that have a tropical or subtropical climate. In our country, the Azores archipelago is considered an endemic region. This disease is transmitted through direct contact with bacteria-infected animal fluids, or through indirect contact with the soil and water (places where *Leptospira* can survive for several months). Common natural reservoirs are rodents. However, canids, cattle and swines can also be affected. In this way, risk factors include agrarian workers, shepherds, slaughterhouses' workers or recreational leisure activities that occur near sources of standing water (such as, fishing, canoeing and swimming).

In most cases, leptospirosis clinically manifests as flu-like syndrome with non-specific signals or symptoms that can include fever, myalgia, headache and nausea. However, in a minority of the cases it evolves into kidney failure, liver failure, meningitis, respiratory failure, hemorrhagic diathesis or septic shock; all these alterations can be fatal.

The diagnosis is based on direct assays that detect the bacteria, or other components, such as bacterial cultures, microscopy or PCR assays; the diagnosis can also be based on indirect serological assays such as MAT or ELISA.

Treatment includes support measures, namely in the presence of kidney or respiratory failure, and antibiotherapy with penicillin, ceftriaxone or doxycycline.

In order to fight this zoonosis, prevention measures are essential. These measures include isolation, diagnosis and treatment of infected animals, housing improvements that reduce human contact with rodents, and detection and treatment of contaminated water sources. Still, there is room for immunization and prophylaxis before and after contact.

The Final Paper expresses the opinion of the author and not of the FML.

Key words: Leptospirosis, *Leptospira*.

Índice

Resumo	I
Abstract	II
Lista de abreviaturas	III
1. Introdução	1
2. Características taxonómicas e classificação	2
3. Epidemiologia	3
3.1 Leptospirose em Portugal	3
4. Reservatórios	5
5. Transmissão	6
6. Patogénese	8
7. Leptospirose como doença bifásica	10
7.1. Fase leptospirémica	10
7.2. Fase imunogénica ou fase leptospirúrica	10
8. Manifestações clínicas	12
8.1. Manifestações hemodinâmicas	12
8.2. Manifestações neurológicas	12
8.3. Manifestações músculo-esqueléticas	13
8.4. Manifestações oculares	13
8.5. Manifestações cutâneas	13
8.6. Manifestações cardíacas	14
8.7. Manifestações gastrointestinais	14
8.8. Manifestações pulmonares	14

8.9. Manifestações nefrológicas -----	15
8.10. Leptospirose grave e mortalidade -----	16
9. Fase de convalescença -----	18
10. Achados laboratoriais -----	19
11. Diagnóstico -----	20
11.1 Fase leptospirémica -----	20
11.2 Fase imunogénica ou fase leptospirúrica -----	20
12. Terapêutica -----	22
13. Reação de Jarisch Herxheimer -----	23
14. Prevenção -----	24
15. Conclusão -----	25
Agradecimento -----	26
Bibliografia -----	27

Lista de abreviaturas

ADH – Hormona antidiurética

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARDS – Síndrome da dificuldade respiratória aguda

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

DC – Débito cardíaco

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

HLA – Antígeno leucocitário humano

IgG – Imunoglobulinas G

IgM – Imunoglobulinas M

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LPS – Lipopolissacarídeo

MAT – Teste de aglutinação microscópica

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PA – Pressão arterial

PL – Punção lombar

RJH – Reação de Jarisch Herxheimer

RVP – Resistência vascular periférica

SHPG – Síndrome hemorrágico pulmonar grave

SNC – Sistema nervoso central

TCP – Tubulo contornado distal

TLR 2 – Recetor do tipo Toll 2

TLR 4 – Recetor do tipo Toll 4

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa TNF-alfa

1. Introdução

A leptospirose é uma doença infecciosa febril endémica em climas tropicais e subtropicais. Em Portugal o arquipélago dos Açores é a única região endémica ⁽¹⁾. A sua prevalência real é desconhecida, mas estima-se que possa aumentar nos próximos anos ⁽²⁾. Esta infeção resulta da exposição direta a fluidos de animais infectados pela bactéria *Leptospira* ou da exposição indireta a água ou ao solo infetados com urina de ratos portadores da bactéria ^(3, 4). Existe penetração das mucosas ou da pele, com consequente disseminação hematogénica com colonização da bordadura em escova do TCP do rim ⁽⁵⁾. A micção do animal infetado perpetua o ciclo de vida da bactéria.

O ser humano é um hospedeiro acidental ⁽⁶⁾. As manifestações clínicas variam entre uma síndrome gripal *like* até manifestações fulminantes de insuficiência renal, hepática ou pulmonar.

Nas formas leves a moderadas o tratamento poderá restringir-se a terapêuticas de suporte e antibioterapia em ambulatório. Contudo em casos graves antibioterapia endovenosa deverá ser iniciada o mais rapidamente possível. Medidas de suporte, como diálise e ventilação, são *life –saving* ⁽⁷⁾.

O diagnóstico é realizado perante uma clínica suspeita, contexto epidemiológico e exames complementares de diagnóstico. Importa referir que no início da sintomatologia o quadro é altamente inespecífico e é necessário um alto grau de suspeição. Numa fase inicial, a bactéria é identificada diretamente através de amplificação de DNA, hemoculturas ou cultura do líquido LCR. Numa fase posterior os métodos de diagnóstico incluem urocultura, MAT e ELISA ^(8, 9).

Para a realização deste trabalho foram pesquisados artigos nas plataformas PubMed e GoogleScholar recorrendo às palavras-chave leptospirose, *Leptospira*, RJH e leptospirose em Portugal.

2. Características taxonómicas e classificação

A leptospirose é uma infecção causada por um dos diversos serotipos patogénicos da bactéria *Leptospira*. Esta bactéria pertence à família das Spirochaetes ⁽¹⁰⁾.

Existem duas classificações que permitem categorizar a *Leptospira*. Uma classificação antiga que divide todos os serogrupos da *Leptospira* em: *Leptospira biflexa* (inclui todas as espécies não patogénicas isoladas) e *Leptospira interrogans* (inclui todas as espécies patogénicas conhecidas para o homem e para os animais) ^(11,12). A classificação genotípica, é mais recente, baseia-se na análise de hibridação do DNA ^(13, 14). Sabe-se atualmente que existem seis espécies de *Leptospira* não patogénica e treze espécies de *Leptospira* patogénica; destas treze, sete são consideradas as principais causadoras de leptospirose no ser humano: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. Kirschneri* e *L. alexanderi* ⁽¹⁵⁾.

A *Leptospira* é uma bactéria aeróbia obrigatória; possui dois flagelos, o que lhe confere grande mobilidade e facilidade em penetrar nas mucosas ⁽¹⁶⁾.

O isolamento da *Leptospira* em meio de cultura pode ser utilizado no diagnóstico de leptospirose. Contudo há que ter em conta dois fatores a *Leptospira* é um microrganismo exigente e de crescimento lento e, como tal, as culturas devem ser verificadas até às 14 semanas ⁽¹⁷⁾ e só é visualizável em microscopia de campo escuro e após impregnação com prata.

Informações sobre a sobrevivência da bactéria no meio ambiente são essenciais para diminuir a incidência desta infecção e delinear medidas preventivas de contágio. Sabe-se que a duração da sobrevivência da *Leptospira*, após excreção no meio ambiente, depende de inúmeros fatores que podem ser classificados em abióticos e bióticos:

- Fatores abióticos - solo húmido e alcalino (pH até 8), água doce com alto teor de oxigénio e baixas concentrações de sal ^(14, 18, 19);
- Fatores bióticos - a presença de outras bactérias altera as características do meio e, portanto, algumas destas interações vão ser benéficas e levar à multiplicação de bactérias patogénicas e outras terão o efeito inverso ⁽²⁰⁾.

3. Epidemiologia

A leptospirose é reconhecida como a zoonose mais difundida no mundo. É considerada uma emergência mundial na área da saúde pública.

Afeta populações em todos os continentes, exceto nos pólos terrestres ⁽⁴⁾, tendo uma maior prevalência nos países desenvolvidos e em áreas de clima tropical ou subtropical com elevada precipitação, causando epidemias após fortes chuvas, inundações ^(5, 21-24) e desastres naturais ⁽¹⁶⁾.

A incidência precisa desta zoonose é desconhecida, uma vez que a grande maioria dos países onde esta doença é endêmica não possui um sistema de notificação obrigatória ⁽²⁵⁾. Contudo estima-se que a incidência seja:

- 0,1 a 1 caso por 100.000 por ano em climas temperados ⁽²⁶⁾;
- 10 a 100 casos por 100.000 por ano em regiões húmidas ⁽²⁶⁾;
- 100 casos por 100.000, por ano, quando ocorre secundária a surtos ⁽¹⁶⁾.

Além dos fatores climáticos, a magnitude do problema deve-se a fatores ambientais, nomeadamente: falta de saneamento básico e casas sem condições habitacionais ^(10, 27-29).

A longo prazo, estima-se que a carga global de leptospirose aumente devido ao crescimento populacional em regiões tropicais, sendo que estas regiões estarão também sujeitas a agravamento das inundações devido às mudanças climáticas ^(2, 5, 21-24).

3.1 Leptospirose em Portugal

A leptospirose em Portugal é uma zoonose de importância crescente, principalmente nas últimas décadas, ocorrendo casos fatais no Arquipélago dos Açores, onde a infeção é endêmica ⁽¹⁾. A taxa média de incidência anual é muito superior nesta região (11,1 casos por 10 000 habitantes) quando comparada com as restantes regiões do país. Várias causas contribuem para esta discrepância ⁽⁴⁾: a atividade económica nestas ilhas depende do trabalho rural e do gado, para além disso, as condições de humidade e temperaturas médias anuais são considerados fatores favoráveis.

A distribuição da incidência da infecção por idades e sexo apoia o argumento de que a infecção por *Leptospira* é maior em trabalhadores ativos e que exercem a sua profissão no meio rural ⁽⁴⁾: 70% dos infetados tinha entre 25 e 64 anos, 9% tinha menos de 25 anos e os restantes, mais de 65 anos. Ficou ainda assente que na maioria das faixas etárias os homens eram mais afetados que as mulheres.

4. Reservatórios

Segundo a OMS, são portadores da bactéria *Leptospira* ⁽²⁶⁾: pequenas espécies de mamíferos, nomeadamente, roedores selvagens (ratos, ratazanas, musaranhos e ouriços) e animais domésticos, como sejam bovinos, suínos, cães e mais raramente cabras, ovelhas, cavalos e búfalos.

Embora muitos animais selvagens e domésticos, em particular bovinos e suínos ⁽⁴⁾, possam servir de reservatório, pensa-se que o rato, da espécie *Rattus norvegicus*, constitua a maior fonte de infeção para o ser humano ⁽⁵⁾.

O ciclo da vida da *Leptospira* inclui: a micção de um animal infetado, a sobrevivência no meio ambiente, aquisição por um novo hospedeiro através de uma porta de entrada, e a disseminação da bactéria por via hematogénica até aos capilares glomerulares ou peri tubulares dos rins, onde é novamente excretada para o meio ambiente.

5. Transmissão

O homem é um hospedeiro acidental e terminal da bactéria. A infecção pode resultar da exposição direta à urina ou ao sangue de animais infetados com leptospirose ou da exposição indireta, através da água, solo, vegetação ou alimentos contaminados ^(3, 4). Estas condições de transmissão refletem-se nas designações que esta doença tem nas diferentes regiões do mundo: febre do campo de arroz, doença dos suínos, febre da fazenda do gado e febre da lama ⁽²⁶⁾.

Grupos de risco para infecção por *Leptospira* incluem ⁽²⁶⁾:

- Criadores de gado bovino e suíno;
- Agricultores de campos de arroz, de cana de açúcar, de campos de bananeiras e de abacaxi;
- Médicos veterinários, donos de animais de estimação ou trabalhadores de abrigos de animais;
- Trabalhadores de matadouros;
- Trabalhadores de esgotos;
- Mineiros;
- Participantes de desportos aquáticos;
- Vilas inteiras podem ser infetadas, caso os seus reservatórios de água potável sejam contaminados;
- Equipas envolvidas no diagnóstico e pesquisa de leptospirose.

A importância dos desportos radicais como meio de exposição aumentou muito nos últimos anos ⁽²⁾. Eventos desportivos podem ser a causa de grandes surtos de leptospirose. A corrida Eco-challenge de 2000 realizada na Malásia levou à infecção de 80 pessoas ⁽³⁰⁾.

A leptospirose tem maior prevalência em homens do que em mulheres, possivelmente refletindo as exposições ocupacionais acima descritas ⁽³¹⁻³³⁾; pelo mesmo motivo, é também mais frequente em jovens em comparação com idosos e crianças mais pequenas ⁽²⁶⁾.

Importa salientar que a transmissão de leptospirose de pessoa para pessoa já foi descrita, ocorre por contacto sexual ou através da amamentação materna, mas é extremamente rara ⁽³⁴⁻³⁶⁾.

A leptospirose é uma doença com sintomas extremamente inespecíficos, como tal, torna-se essencial apurar o contexto epidemiológico do doente.

6. Patogênese

A *Leptospira* infeta o organismo humano através das mucosas como por exemplo a conjuntiva, mucosa oral ou nasal ⁽⁵⁾ e cortes na pele ⁽¹²⁾. A importância da cavidade oral como via de entrada é indicada pelos inúmeros estudos que confirmam que engolir água contaminada durante a prática de natação é um fator de risco ⁽³⁷⁻³⁹⁾. O primeiro passo na patogênese é a penetração na barreira mucosa, com perda da integridade das células endoteliais, com consequente disseminação hematogênica.

O período de incubação é altamente variável. O mais frequente é durar entre sete a doze dias, embora estejam descritos períodos de três dias ou de um mês completo ⁽⁴⁰⁾. Uma forte evidência desta alta variabilidade foi o surto de leptospirose que ocorreu na sequência da prova de triatlo de Springfield de 1998. Todos os noventa e oito doentes foram infectados no mesmo dia e os períodos de incubação variaram entre seis e vinte e nove dias ⁽⁴⁰⁾.

Após a entrada na corrente sanguínea, ocorre vasculite de pequenos vasos, com edema endotelial, necrose e infiltração linfocitária ^(9, 41). As toxinas bacterianas exercem efeitos diretos sobre o endotélio e causam aumento da permeabilidade vascular ⁽⁴²⁾.

A primeira linha de defesa contra a leptospirose é a imunidade humoral, com ação do complemento e destruição pelos macrófagos. Numa fase inicial, entre o terceiro e o quinto dia após os sintomas, há um aumento das IgM, que dificultam a multiplicação da bactéria. Dias mais tarde existe elevação dos níveis das IgG que fornecem imunidade protetora e eliminam as bactérias que tenham sobrevivido. A imunidade humoral parece ter um papel efetivo através do TNF-alfa ⁽⁴¹⁾.

O TLR4 tem um papel central na patogênese da leptospirose. Este recetor é responsável pelo reconhecimento dos LPSs das bactérias gram negativas. No entanto não reconhece o LPS da *Leptospira* ⁽⁴³⁾ por este apresentar um resíduo fosfato metilado único que não é encontrado em mais nenhum lípido A ^(43, 44).

Por outro lado, o TLR4 do ratinho reconhece o LPS da *Leptospira* ⁽⁴³⁾: o sistema imune inato deste animal está adaptado a esta infeção. Assim o ratinho é um reservatório natural, resistente à infeção. Por outro lado, o humano é um hospedeiro acidental e que raramente transmite infeção ⁽⁶⁾. Outros estudos corroboram a importância do TLR4: foi

demonstrado que ratinhos jovens, quando infetados *L. interrogans* morriam na ausência deste recetor ⁽⁴⁵⁾.

Sabe-se que a lesão tecidual resultante desta infeção poderá ser o resultado de dois fatores: acção direta da bactéria que pelas suas características de motilidade, aderência e tropismo para certos órgãos, infeta locais pouco usuais (LCR, humor aquoso e túbulos renais proximais) ⁽⁴⁶⁾ e da produção de mediadores - endotoxinas (determinantes no desenvolvimento da infeção) e hemolisinas (responsáveis pela anemia hemolítica) ^(41, 47). Para além destes mediadores, existe a produção de citocinas inflamatórias como seja a IL-6 e o TNF-alfa (a sua produção está dependente dos TLR2) ⁽⁴⁸⁾.

O rim é o principal órgão afetado durante a leptospirose. Neste local os TLR2 reconhecem LPSs patogénicos com indução da produção de óxido nítrico sintase ⁽⁴⁹⁾. A nefrite intersticial é caracterizada por edema e infiltração de linfócitos e, ocasionalmente, neutrófilos ^(50, 51).

Doentes com falência de órgão apresentam uma “tempestade de citocinas” com níveis altíssimos de IL-6 e TNF-alfa ⁽⁵²⁾. Em particular, os níveis de IL-6 e IL-10 foram preditores independentes de morte. O HLA DQ6 é um fator de risco independente para o desenvolvimento de leptospirose após a exposição ⁽³⁸⁾.

7. Leptospirose como doença bifásica

Depois do período de incubação começa a fase sintomática que na leptospirose tem uma apresentação bifásica: fase leptospirémica e fase imunogénica.

7.1 Fase leptospirémica

Nesta fase existe disseminação hematogénica com multiplicação da *Leptospira* em vários órgãos ⁽⁵⁵⁾.

Caracteriza-se por um início súbito de febre (38°C a 39°C), calafrios, mialgias, artralgias, astenia, dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, anorexia, fotofobia, dor ocular, tosse e hemoptises. Dura aproximadamente uma semana, ao final da qual começa a produção de anticorpos anti – *Leptospira* ⁽⁵⁵⁾.

Em 90% dos casos, esta fase é anictérica e indolente. Se a infeção for grave, a icterícia poderá estar presente ⁽⁵³⁾.

Os sinais e sintomas são inespecíficos nesta fase e como tal, por vezes, a doença é confundida com outras causas de síndrome febril agudo (influenza, dengue ou malária). É essencial ter presente achados mais específicos de leptospirose que possam apontar para um diagnóstico mais precoce: sufusão conjuntival (presente em 30%), cefaleia retro orbitária ⁽⁵⁴⁾ e hipocaliemia (presente no quadro desde cedo) ⁽²⁶⁾.

7.2 Fase imunogénica ou fase leptospirúrica

A fase imunogénica ocorre na sequência da fase leptospirémica após um período assintomático de três a quatro dias ^(10, 42).

Nesta fase ocorre a produção de anticorpos anti-*Leptospira* com consequente opsonização e eliminação das bactérias que se encontram na circulação sanguínea ⁽⁵³⁾. Contudo, as bactérias vão alojar-se em locais onde os anticorpos têm menor acesso: olho (causando uveíte), meninges (causando meningite) e rim. Esta fase poderá manifestar-se por febre de curta duração e compromisso do SNC ^(10, 42).

O número de anticorpos após a infecção aguda pode ser extremamente alto e pode levar meses ou até anos até negativar. Títulos superiores a 100 são uma evidência de exposição no passado ^(55, 56).

8. Manifestações clínicas

Estudos prospectivos de vigilância sugerem que a maioria das infecções leptospíricas em humanos em áreas endêmicas são ligeiras ou assintomáticas ⁽⁵⁾.

8.1 Manifestações hemodinâmicas

A hipotensão é comum, uma vez que existe diminuição da RVP e diminuição do volume intravascular ⁽⁵⁷⁾.

Um estudo realizado na Tailândia divide as alterações hemodinâmicas da leptospirose em três padrões ⁽⁵⁷⁾: em 60% dos doentes existe alto DC e redução da RVP com conseqüente hipotensão e vasodilatação periférica que resulta da liberação de mediadores como sejam as citocinas e o óxido nítrico. Em 20% dos doentes o DC e a RVP mantem-se normais, mas há um aumento da resistência da vasculatura pulmonar, causado por edema perivascular e fatores humorais, como leucotrienos e tromboxano. Nos restantes, há aumento da RVP e diminuição do DC e da resistência da vasculatura pulmonar. A diminuição do débito cardíaco poderá resultar da desidratação ou da miocardite presente nas formas severas de leptospirose.

8.2 Manifestações neurológicas

A cefaleia é uma manifestação muito comum, presente entre 75% a 100% dos doentes ⁽⁵⁸⁾. É geralmente incapacitante e descrita como latejante, bitemporal ou frontal, e acompanhada por dor retro ocular ou fotofobia ⁽⁵⁾. Poderá ser acompanhada por sinais meníngeos, o que implica frequentemente a realização de uma PL com posterior análise do LCR.

A meningite asséptica pode ocorrer em até 25% dos casos de leptospirose ictérica e é mais frequente em jovens. Um estudo provou que o acometimento das meninges atinge 62% dos doentes abaixo dos 14 anos, 31% dos doentes entre 15 e 29 anos e apenas 10% dos doentes com mais de 30 anos. Em algumas regiões, o quadro de meningite asséptica é a manifestação predominantemente ⁽⁵⁹⁾.

Alterações do estado mental poderão indicar meningoencefalite. Outras alterações neurológicas incluem: confusão, delírios, alucinações, paralisias focais, espasticidade, nistagmo, convulsões, neurite periférica, paralisia dos pares cranianos, radiculite, hemiplegia, mielite transversa e síndrome de Guillain-Barré ^(14, 60).

8.3 Manifestações músculo-esqueléticas

Quando as espiroquetas invadem o músculo esquelético, têm a capacidade de provocar edema, vacuolização das miofibrilas e necrose focal ⁽⁶¹⁾, com consequentes mialgias e aumento da sensibilidade muscular sobretudo na região gemelar e lombar ⁽⁵⁾.

A rabdomiólise está descrita em 45% a 62% dos casos ^(42, 62, 63).

8.4 Manifestações oculares

Uma das características presentes na leptospirose, e rara nas restantes síndromes febris, é a hemorragia conjuntival (dilatação dos vasos conjuntivais sem exsudado purulento) ⁽⁶⁴⁾. Sintomas oculares incluem ainda escleróticas ictéricas e hemorragias subconjuntivais ⁽⁵⁾.

8.5 Manifestações cutâneas

A alteração cutânea característica da leptospirose é a icterícia, esta é um sinal característico desta doença. Apresenta-se geralmente num tom alaranjado muito intenso, designada por ictéria rubínica, aparece vulgarmente entre o terceiro e sétimo dia de doença ⁽⁶⁰⁾.

Erupções cutâneas são incomuns na leptospirose, quando ocorrem deve ser considerado um diagnóstico alternativo, como o dengue. Contudo, e apesar da raridade (10% a 20%), um *rash* transitório macular, papular, urticariforme ou purpúrico poderá estar presente ⁽⁵⁾. O surto de “Fort Bragg fever” (causado pelo serotipo *L. interrogans Autumnalis*) que atingiu soldados da Carolina do Norte ficou caracterizado por cefaleias, mal-estar geral, esplenomegalia e um eritema que se limitava à região pré tibial de ambas as pernas ⁽⁶⁵⁾.

8.6 Manifestações cardíacas

Na leptospirose grave, o envolvimento cardíaco é comum e subestimado. Pode afetar o coração na forma de ⁽⁵⁾ miocardite (em aproximadamente 50% dos casos), arritmias (potenciadas pelas alterações eletrolíticas, nomeadamente a hipocaliemia) e aortite, semelhante à aortite secundária à sífilis, uma vez que não apresentam vasculite obstrutiva dos *vasa varum* e não há alterações na camada média da parede vascular.

8.7 Manifestações gastrointestinais

Os sintomas gastrointestinais são frequentes e incluem náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, hepatomegália e esplenomegália ⁽⁵⁾.

A dor abdominal pode ser o resultado de colecistite não litiásica e/ou pancreatite. Contudo um aumento da lipase e da amilase é comum nos doentes infetados com leptospirose mesmo na ausência destas patologias ⁽⁶⁶⁾. Na maioria dos casos, a pancreatite é autolimitada.

O fígado é um dos principais órgãos afetados. Na biópsia e conseqüente avaliação anátomo-patológica, é possível encontrar: sinusóides congestionados, distensão do espaço de Disse, fixação da bactéria no espaço de Disse e invasão peri juncional entre os hepatócitos com conseqüente apoptose dos mesmos ^(50, 67). A apoptose dos hepatócitos, juntamente com o extravasamento da bÍlis nos canalículos biliares explica os elevados níveis de bilirrubina direta e a icterícia que poderá estar presente ^(50, 67).

8.8 Manifestações pulmonares

Os sintomas respiratórios podem incluir dispneia, hemoptises e tosse não produtiva em 20% a 75% dos doentes infetados ⁽⁵⁾.

A lesão vascular causa aumento da permeabilidade capilar com conseqüentes hemorragias pulmonares (petéquias pulmonares e pleurais já foram descritas), um fenómeno potenciado pela trombocitopenia ⁽⁵⁴⁾. Como descrito em detalhe na secção leptospirose grave a hemorragia pulmonar maciça poderá ser fatal.

Histologicamente, verifica-se hemorragia nos espaços intra alveolares e nos septos alveolares ⁽⁵⁰⁾, e estudos imuno-histoquímicos, realizados em doentes que apresentavam SHPG ⁽⁶⁸⁾ revelaram a presença de antigénio leptospiral no interior dos macrófagos alveolares.

A telerradiografia do tórax poderá revelar pequenas opacidades difusas ou concentradas numa determina área ⁽⁶⁹⁾.

8.9 Manifestações nefrológicas

O rim é um dos órgãos mais afetados, uma vez que a bactéria coloniza o epitélio em bordadura de escova do TCP, com conseqüente leptospirúria. Este acometimento renal ocorre tipicamente na fase tardia e o diagnóstico é estabelecido pelo aumento rápido da ureia e da creatinina ⁽⁷⁰⁾.

A LRA resulta da ação nefrotóxica direta da bactéria e da resposta imune que originam nefrite intersticial e necrose tubular aguda. Histologicamente encontra-se distensão do lúmen tubular por resíduos celulares e hialinos ⁽⁵⁰⁾.

Por outro lado, a infeção *per si*, causa hiperbilirrubinémia, rabdomiólise e hipovolémia (potenciada pela febre e vômitos) o que agrava a função renal: na presença destes fatores a LRA é frequentemente oligúrica ou anúrica ⁽⁷⁰⁾.

A LRA não oligúrica está presente em 41% a 45% dos doentes ⁽⁷¹⁾ e é caracteristicamente acompanhada por hipocaliemia. Tipicamente, existe diminuição da reabsorção de sódio ao nível do TCP, por diminuição da expressão do canal 3 sódio-hidrogénio com conseqüente aumento do ião sódio no nefrónio distal e aumento da excreção de potássio (a excreção deste ião é potenciada pela resistência à ADH e pelo aumento da aldosterona) ^(72, 73). A excreção de ácido úrico e de fosfato também está diminuída ⁽⁶²⁾.

Assim, nas fases iniciais da insuficiência renal, não existe oligúria. Com a progressão da doença e pela diminuição do volume intravascular, a insuficiência renal evolui para LRA intrínseca. A persistência deste quadro culmina em necrose tubular aguda que não irá responder à reposição de fluidos pela fluidoterapia, tornando-se a

diálise essencial para o tratamento ⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾. Em países onde esta opção não é viável, esta manifestação poderá ser fatal.

Outra característica renal precoce, é o aumento do tamanho dos rins na ecografia renal, sem alterações da ecogenicidade do parênquima, indicando nefrite tubulointersticial ⁽⁷⁸⁾. Os rins recuperam o seu tamanho normal após a resolução da infecção ⁽⁷⁹⁾.

8.10 Leptospirose grave e mortalidade

A mortalidade aumenta em doentes com mais do que 60 anos de idade e altos níveis de bacteriemia estão associados a maus resultados clínicos. Em modelos animais, foi provado que este fator se deve a um fraco reconhecimento do TLR 4 para o LPS da *Leptospira*.

A leptospirose icterica representa apenas 10% dos doentes e está associada a manifestações graves e potencialmente fatais ^(7, 54, 60):

- Compromisso da homeostase, com tendência hemorrágica (petéquias, equimoses, hemorragia em locais de venopunção, epistaxis, melenas e hematémeses);
- Insuficiência hepática;
- Insuficiência renal;
- Insuficiência respiratória;
- Alterações neurológicas.

Importa reter que estas manifestações poderão ocorrer na ausência de icterícia, e como tal, não se deve esperar o aparecimento desta para se suspeitar de um quadro de maior gravidade ⁽⁶⁰⁾. Os sintomas surgem habitualmente ao fim de uma semana, mas poderão ser mais precoces, nomeadamente em apresentações fulminantes.

Quando está presente a tríade de icterícia, insuficiência renal e diátese hemorrágica, estamos perante um quadro de leptospirose grave, conhecido como mal de Weil ⁽⁸⁰⁾.

O aumento da permeabilidade dos capilares pulmonares poderá em última instância culminar numa hemorragia alveolar extensa, o SHPG. Numa hemorragia alveolar extensa, o SHPG apresenta uma mortalidade de 50%, contrastando com a taxa

de mortalidade global na leptospirose grave que ronda os 10% ⁽⁸¹⁾. É considerada uma síndrome sistêmica, uma vez que, os seus fatores de risco incluem o aumento da frequência respiratória, mas também: hipocaliemia, creatinina sérica elevada e choque ⁽⁸²⁾. Quando a sua apresentação surge em contexto de surtos, o diagnóstico poderá ser atrasado, pois é facilmente confundido com um diagnóstico de pneumonite viral ^(83, 84). Por exemplo o surto de 1995, que ocorreu no Nicarágua, foi inicialmente interpretado como síndrome pulmonar caudada por *Hantavírus* ⁽⁸⁴⁾.

Informações sobre a mortalidade da *Leptospira* são incongruentes, uma vez que, nas áreas endêmicas não existem sistemas de notificação obrigatória. Segundo o CDC ⁽⁸⁵⁾, a mortalidade varia entre 5% a 15% em casos de doença grave. Contudo, outros estudos estimam que a mortalidade global varie entre 1% a 20% ⁽⁷⁾.

9. Fase de convalescença

A maioria dos doentes infetados recupera totalmente ⁽⁸⁶⁾. Contudo estão descritos sintomas crónicos que incluem fadiga, mialgias, mal-estar geral e cefaleias, que podem durar até vinte e quatro meses após a infeção ⁽⁸⁷⁾.

Doentes que desenvolveram insuficiência renal com necessidade de diálise, geralmente recuperam totalmente, porém alguns permanecem com insuficiência renal residual por atrofia tubular e fibrose intersticial ⁽⁸⁸⁾. A leptospirúria pode continuar por semanas ou meses após o desaparecimento dos sintomas ⁽⁸⁹⁾.

Envolvimento ocular como uveíte é comum nesta fase. A uveíte pode ser unilateral ou bilateral, sendo caracterizada por irite, iridociclite e coriorretinite, e pode ter um carácter ondulante no tempo ou surgir como um evento único. Esta manifestação pode ocorrer até dezoito meses após a infeção ^(89, 90). Um estudo revelou que 80% dos doentes tinha DNA bacteriano no humor aquoso ⁽⁸⁹⁾.

10. Achados laboratoriais

Pacientes com leptospirose apresentam-se com as seguintes alterações laboratoriais (5, 26, 54, 91- 93):

- Aumento dos níveis de transaminases;
- Aumento dos níveis de bilirrubina direta e indireta (devido à anemia hemolítica);
- Leucocitose;
- Trombocitopenia (como manifestação isolada está presente em 50% dos casos e é sinal de mau prognóstico);
- Leucopenia, trombocitopenia e anemia poderão estar presentes em caso de supressão da medula óssea;
- Prolongamento do tempo de protrombina;
- Aumento dos níveis de ureia e creatinina;
- Hipocaliemia.

Na análise do sedimento urinário, podemos encontrar: piúria, hematúria ou elevação das proteínas (inferior a 1g em 24h) e eventualmente pigmentos biliares (70).

A análise do LCR revela alterações citoquímicas idênticas à da meningite asséptica, e a sua realização com carácter urgente pode ser necessária.

11. Diagnóstico

O diagnóstico de leptospirose é nos seus estádios iniciais clínico e baseia-se num alto índice de suspeição juntamente com as informações epidemiológicas do doente. A confirmação da presença da bactéria é essencial para o diagnóstico definitivo, uma vez que, como descrito anteriormente, as manifestações clínicas são extremamente inespecíficas.

11.1 Fase leptospirémica

Nesta fase existe disseminação hematogénica e, portanto, é possível identificar a bactéria em circulação. O diagnóstico faz-se por:

- Detecção direta do organismo através de microscopia - a *Leptospira* só é visualizável em microscopia de campo escuro e após impregnação com prata. Assim, este método apresenta baixa sensibilidade e baixa especificidade ⁽⁹⁴⁾;
- Hemocultura e cultura do LCR – a *Leptospira* é um microrganismo de crescimento lento e exigente que requer meios de cultura específicos (meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) ^(8, 47);
- PCR – é mais provável que a determinação por esta técnica seja positiva nos primeiros oito dias de febre antes da eliminação da bactéria ⁽⁹⁵⁾. A sua principal desvantagem é a sua incapacidade em identificar serovares ⁽⁹⁶⁾. Não obstante, este detalhe não é essencial na prática clínica, tendo apenas utilidade no contexto epidemiológico.

Comparando os diferentes métodos, conclui-se que a PCR é mais sensível que os meios de cultura tradicionais, contudo deteta menos casos que o MAT ⁽⁹⁶⁾.

11.2 Fase imunogénica ou fase leptospirúrica

Nesta segunda fase da doença (evolução superior a dez dias) há seroconversão e a bactéria aloja-se nos túbulos renais. Nesta etapa utiliza-se:

- Urocultura – este método é de fácil execução e a excreção de *Leptospira* pela urina é altamente variável podendo demorar várias semanas a resolver ⁽⁹⁷⁾;

- MAT – permite detectar a seroconversão da infecção e como tal são precisas duas amostras. O intervalo entre amostras depende dos sintomas, se os sintomas presentes forem típicos, os anticorpos podem ser detetados ao fim de 3 a 5 dias. Contudo, se a data de início do quadro clínico for desconhecida recomenda-se que as amostras sejam recolhidas num intervalo entre 10 e 14 dias. O aumento em pelo menos quatro vezes o título de anticorpos faz o diagnóstico, independentemente do tempo entre as amostras. O MAT é de elevada especificidade, mas também de elevada complexidade ^(5, 98);

- ELISA – a deteção de IgM e IgG pelo uso de imunoensaios enzimáticos apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas numa fase aguda precoce a sensibilidade diminui ⁽¹⁰⁾.

Os testes serológicos de diagnóstico precoce requerem uma segunda amostra e a sua confirmação requer outro teste de referência ^(87, 99, 100).

12. Terapêutica

Na presença de sinais e sintomas leves semelhantes a uma síndrome gripal, a terapêutica sintomática poderá ser suficiente e em primeira instância a re-hidratação oral deverá ser tentada ⁽⁷⁾.

A *Leptospira* é suscetível a beta lactâmicos, macrólidos, tetraciclina, fluoroquinolonas e estreptomicina ^(17, 101). A antibioterapia recomendada em adultos com indicação para ambulatório é:

- Amoxicilina 0,5 a 1 grama quatro vezes por dia;
- Doxiciclina via oral 100 miligramas duas vezes dia durante sete dias - reduz a duração da febre, mialgias, mal-estar geral e cefaleias em dois dias e também impede a libertação da bactéria na urina ⁽¹⁰²⁾;
- Azitromicina 500 miligramas uma vez dia ^(8, 103, 104).

A leptospirose grave é acompanhada por insuficiência renal e hipocaliemia. Em 80% dos casos é necessário a suplementação de potássio juntamente com a fluidoterapia endovenosa. Em caso de insuficiência renal oligúrica, o início precoce de diálise pode ser *life-saving* ⁽¹⁰⁵⁾: reduziu a mortalidade de 67% para 17% em doentes graves ⁽¹⁰⁶⁾. Doentes com insuficiência respiratória apresentam-se com baixa *compliance* pulmonar e como tal beneficiam de volumes correntes baixos (< 6mL/Kg) e alta pressão expiratória final positiva ⁽²⁶⁾.

Em caso de infeção grave e necessidade de hospitalização, os antibióticos recomendados são ⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾:

- Penicilina 1,5 milhão de unidades intravenosa a cada 6 horas - diminui a duração da febre, a duração da insuficiência renal, a hospitalização e a excreção urinária de *Leptospira*;
- Ampicilina 0,5-1 grama intravenosa a cada 6 horas;
- Ceftriaxona 1 grama intravenosa a cada 24 horas - eficácia igual comparativamente à penicilina;
- Cefotaxima 1 grama intravenosa a cada 6 horas.

Na mulher grávida, a azitromicina e a amoxicilina podem ser utilizadas.

13. Reação de Jarisch Herxheimer

A RJH tem sido descrita após a utilização de penicilina ⁽¹¹⁰⁾ e está associada a um agravamento das lesões e das características clínicas da doença. A sua gravidade e frequência dependem do processo infeccioso subjacente: é grave se secundária a sífilis ou febre recorrente com transmissão pelo piolho ⁽¹¹¹⁾.

A RJH é caracterizada por uma sequência fisiopatológica com elevação da temperatura corporal (1-2°C), seguida de uma queda na mesma; hiperventilação, vasoconstrição com aumento da PA e DC; seguida de vasodilatação maciça com consequente hipotensão ^(112, 113). A sua patogénese não está bem estabelecida, pondera-se que seja precipitada pela libertação maciça de toxinas (nomeadamente endotoxina-like) pela bactéria, em consequência da morte celular ⁽¹¹⁴⁾. Estudos mais recentes postulam que esta reação seja a consequência da ativação da cascata de inflamação, nomeadamente com a produção maciça de citocinas pró inflamatórias ⁽¹¹⁵⁾.

A RJH é pouco descrita no contexto de leptospirose por vários motivos, nomeadamente ⁽¹¹⁶⁾ por ser menos exuberante quando comparativamente à RJH secundária ao tratamento da sífilis (o que reflete a baixa bacteriémia desta zoonose), pela possibilidade de ser interpretada como um agravamento natural da infeção e por não estarem descritos critérios diagnósticos específicos ou a utilização de um marcador biológico para o diagnóstico desta reacção.

O tratamento desta reação consiste em terapêutica de suporte.

14. Prevenção

A prevenção deve ter em conta o local endémico da infeção, uma vez que as características sociais e económicas são diferentes. Em locais em que a leptospirose está relacionada com a pobreza socio-económica medidas de prevenção incluem ⁽¹¹⁷⁾:

- Eliminação de lixeiras ao ar livre;
- Saneamento básico que impeça a aproximação dos roedores;
- Educação e equipamento para os trabalhadores de risco (óculos, botas e luvas de borracha);
- Avaliação e conseqüente tratamento de águas.

Rodenticidas não são boas soluções a longo prazo.

Nos Açores, uma das principais vias de transmissão é a realização de atividades profissionais com gado. Assim, a prevenção passará pelas seguintes medidas ⁽¹¹⁸⁾:

- Otimização das condições sanitárias;
- Imunização e assistência veterinária do gado;
- Isolamento e tratamento dos animais doentes e desinfeção do material que entrou em contacto com esse animal.

A utilização de vacinas requer o conhecimento dos serovares mais prevalentes numa determinada região. A imunização em seres humanos tem sido justificada pela grande prevalência da infeção em certos países. No Japão milhares de mineiros foram vacinados com sucesso ⁽¹¹⁹⁾ e em Cuba, foi testada uma vacina em mais de cem mil pessoas, designada por vax-SPIRAL, cuja a eficácia foi de 78,1% ⁽¹²⁰⁾. Na Europa, França comercializa a vacina SpiroleptTM ⁽¹²¹⁾.

A utilização de doxicilina como quimioprofilaxia não impede o risco de infeção por *Leptospira* nas regiões endémicas, mas poderá ser útil em viajantes ^(122, 123).

15. Conclusão

A leptospirose é uma infeção pouco comum em Portugal continental, mas nos Açores é considerado um problema de saúde pública. É uma infeção com inúmeras manifestações, algumas potencialmente fatais sobretudo nos países em desenvolvimento. Os seus reservatórios estão bem estabelecidos o que permite determinar medidas de prevenção adequadas. No que à fisiopatologia diz respeito, existem áreas bem esclarecidas como as manifestações nefrológicas e outras que pela sua raridade (anemia hemolítica e pancitopenia) não estão tão bem estudadas.

Em suma é necessário continuar a investigar mecanismos patogénicos que não estão tão bem desvendados. Em termos globais é essencial capacitar os países mais afetados, que são também os mais pobres, com sistemas de vigilância epidemiológica, com MCDs, com medidas de suporte de vida e antibioterapia tendo em conta as potenciais manifestações fatais da leptospirose.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à minha maravilhosa família pelo apoio que me deu ao longo deste percurso, não só académico, como em todo o caminho que é a minha vida. Em primeiro lugar, um especial agradecimento à minha mammy, mãe dos afetos. Afetos e abraços que repúdio tantas vezes, mas que na realidade têm um efeito placebo milagroso em mim. É nos teus braços que encontro conforto nas horas mais difíceis. Uma palavra para a minha vóvó Maria do Carmo, a verdadeira matriarca da família, primeira mulher da linhagem a saber ler e escrever e ainda dotada com a magnífica capacidade de ensinar aos outros. Gosto sempre de lembrar que o meu percurso académico começou numa apanha de merujes para a salada, quando me ensinaste as tabuadas. Ao meu tio, homem de força, que me ensinou que com dedicação e disciplina tudo se alcança. Por fim, mas não menos importante, um agradecimento muito especial à minha titi Célia que me acolheu em sua casa de braços abertos. Ensinaste-me que, longe da minha impulsividade, a matemática é uma maneira de se ver e de se viver a vida.

Um beijinho muito especial para o David Van der Kellen, companheiro de boas horas.

Ao Diogo Domingos, mais do que um companheiro de faculdade, um tutor e um amigo. Obrigada por estares sempre pronto a ajudar, obrigada pelas tuas palavras sábias e honestas e obrigada pela tua serenidade quando estou a fugir dos eixos.

À Dra. Ana Mouzinho, por toda a disponibilidade e paciência demonstrada ao longo da realização desta tese.

Bibliografia

1. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. (2020) Leptospirose. <http://ihmt.unl.pt/glossary/leptospirose/>. Consultado no dia 27 de março de 2020.
2. Lau, C., Smythe, L., and Weinstein, P. (2010) Leptospirosis: An emerging disease in travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease* 8:33-39.
3. Evangelista, K., and Coburn, J. (2010) *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology* 5:1413-1425.
4. Vieira, M., Gama-Simões, M., and Collares-Pereira, M. (2006) Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases* 10:378-386.
5. Haake, D., and Levett, P. (2015) Leptospirosis in humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387:65-97.
6. Nahori, M., Fournié-Amazouz, E., Que-Gewirth, N., Ballov, V., Chignard, M., Raetz, C., Saint Girons, I., and Werts, C. (2005) Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *Journal of Immunology* 175:6022-6031.
7. Kobayashi, Y. (2001) Clinical observation and treatment of leptospirosis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 7:59-68.
8. Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J., and Loscalzo, J. Leptospirosis. *Harrison's principles of internal medicine*. 18ª Edição. Nova Iorque, NY: McGraw-Hill; 2012, 663-670.
9. Gerrant, R., Walker, D., and Weller, P. Leptospirosis. *Tropical Infectious Diseases Principle, Pathogens and Practice*. 3ª Edição. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2011, 303-307.
10. Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Matthias, M., Diaz, M., Lovett, M., Levett, P., Gilman, R., Willig, M., Gotuzzo, E., Vinetz, J., and Peru-United States Leptospirosis Consortium (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 3: 757-771.
11. Kmety, E., and Dikken, H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and its serovars. Groningen, The Netherlands: University Press; 1993.

12. Plank, R., and Dean, D. (2000) Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection* 2:1265-1276.
13. Brenner, D., Kaufman, A., Sulzer, K., Steigerwalt, A., Rogers, F., and Weyant, R. (1999) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:839-858.
14. Levett, P. (2001) Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 14:296–326.
15. Ahmed, N., Devi, S., de los Á Valverde, M., Vijayachari, P, Machang'u, R., Ellis, W., and Hartskeerl, R. (2006) Multilocus sequence typing methods for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5:28-38.
16. McBride, A., Athanazio, D., Reis, M. and Ko, A. (2005) Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18:376-386.
17. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., and Perolat, P. *Leptospira and Leptospirosis*. Medisci Press, Melbourne; 1999.
18. Chang, S., Buckingham, M., and Taylor, M. (1948) Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*; survival in water and sewage; destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *Journal of Infectious Diseases* 82:256–266.
19. Karaseva, E., Chernukha, Y., and Piskunova, L. (1973) Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 17:339–345.
20. Barragan, V., Mejia, M., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R., Haake, D., and Trueba, G. (2011) Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from surface water. *Current Microbiology* 62:1802–1806.
21. Ahern, M., Kovats, R., Wilinon, P., Few, R., and Matthies, F. (2005) Global health impacts of floods: Epidemiologica evidence. *Epidemiologic Reviews* 27:36-46.
22. Dechet, A., Parsons, M., Rambaran, M., Mohamed-Rambaran, P., Florendo-Cumbermack, A., Persaud, S., Baboolal, S., Ari, M., Shadomy, S., Zaki, S., Paddock, C., Clark, T., Harris, L., Lyon, D., and Mintz, E. (2012) Leptospirosis

- outbreak following severe flooding: A rapid assessment and mass prophylaxis campaign; Guyana, January-February 2005. *PLoS One* 7:e39672.
23. Ko, A., Reis, M., Dourado, C., Johnson, W., and Riley, L. (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador leptospirosis study group. *Lancet* 354:820-825.
 24. Zaki, S., and Shieh, W. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The epidemic working group at ministry of health in Nicaragua. *Lancet* 347:535-536.
 25. Ahmed, A., Grobusch, M., Klatser, P., and Hartskeerl, R. (2012). Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *Journal of Bacteriology and Parasitology* 3:2-14.
 26. World Health Organization. (2003) Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42667>.
 27. Felzemburgh, R., Ribeiro, G., Costa, F., Reis, R., Hagan, J., Melendez, A., Fraga, D., Santana, F., Mohr, S., dos Santos, B., Silva, A., Santos, A., Ravines, R., Tassinari, W., Carvalho, M., Reis, M., and Ko, A. (2014) Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: Role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8:e2927.
 28. Hotez, P., Bottazzi, M., Franco-Paredes, C., Ault, S., and Periago, M. (2008) The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2: e300.
 29. Reis, R., Ribeiro, G., Felzemburgh, R., Santana, F., Mohr, S., Melendez, A., Queiroz, A., Santos, A, Ravines, R., Tassinari, W., Carvalho, M., Reis, M., and Ko, A. (2008) Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2:e228.
 30. Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, Kaiser, R., Maranhó, N., Popovic, T., Tappero, J., Ashford, D., Mascola, L., Vugia, D., Perkins, B., Rosenstein, N., and Eco-Challenge Investigation Team.

- (2003) Leptospirosis in “eco-challenge” athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerging Infectious Diseases* 9:02-707.
31. Everard, C., Bennett, S., Edwards, C., Nicholson, G., Hassell, T., Carrington, D., and Everard, J. (1992) An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95:13-22
 32. Guerra-Silveira, F., and Abad-Franch, F. (2013) Sex bias in infectious disease epidemiology: Patterns and processes. *PLoS One* 8: e62390.
 33. Katz, A., Buchholz, A., Hinson, K., Park, S., and Effer, P. (2011) Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999-2008. *Emerging Infectious Diseases* 17:221-226.
 34. Doeleman, F. (1932) Ziekte van Weil, rechtstreeks overgebracht van mensch op mensch. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 76:5057.
 35. Harrison, N., and Fitzgerald, W. (1988) Leptospirosis-can it be a sexually transmitted disease? *Postgraduate Medical Journal* 64:163-164.
 36. Bolin, C., and Koellner, P. (1988) Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *Journal of Infectious Diseases* 158:246-247.
 37. Corwin, A., Ryan, A., Bloys, W., Thomas, R., Deniega, B., and Watts, D. (1990). A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. *International Journal of Epidemiology* 19:743-748.
 38. Lingappa, J., Kuffner, T., Tappero, J., Whitworth, W., Mize, A., Kaiser, R., and McNicholl, J. (2004) HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. *Genes & Immunity* 5:197-202.
 39. Stern, E., Galloway, R., Shadomy, S., Wannemuehler, K., Atrubin, D., Blackmore, C., Wofford, T., Wilkins, P., Ari, M., Harris, L., and Clark, T. (2010). Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida, 2005. *Clinical Infectious Diseases* 50:843-849.
 40. Morgan, J., Bornstein, S., Karpati, A., Bruce, M., Bolin, C., Austin, C., Woods, C., Lingappa, J., Langkop, C., David, B., Graham, D., Proctor, M., Ashford, D., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K. and Perkins, B., and Tappero, J. (2002) Outbreak

- of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clinical Infectious Diseases* 34:1593-1599.
41. Haake, D. (2000) Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146:1491-1504.
 42. Daher, E., Zanetta, D., Cavalcante, M., and Abdulkader, R. (1999) Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61:630-634.
 43. Werts, C., Tapping, R., Mathison, J., Chuang, T., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D., Godowski, P., Havashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D., Kirschning, C., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P., and Ulevitch, R. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2dependent mechanism. *Nature Immunology* 2:346-352.
 44. Que-Gewirth, N., Ribeiro, A., Kalb, S., Cotter, R., Bulach, D., Adler, B., Girons, I., Werts, C., and Raetz, C. (2004) A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *Journal of Biological Chemistry* 279:25420-25429.
 45. Viriyakosol, S., Matthias, M., Swancutt, M., Kirkland, T., and Vinetz, J. (2006) Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infection and Immunity* 74:887-895.
 46. Faine, S., and Stallman, N. (1982) Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 32:461-463.
 47. Vieira, M. (2006) Aspectos da caracterização antigénica e molecular da leptospirose em áreas endémicas. Tese doutoramento, IHMT-UNL.
 48. Goris, M., Wagenaar, J., Hartskeerl, R., van Gorp, E., Schuller, S., Monahan, A., Nally, J., van der Poll, T., and van 't Veer, C. (2011). Potent innate immune response to pathogenic leptospira in human whole blood. *PLoS One* 6:e18279.

49. Yang, C., Hung, C., Wu, M., Tian, Y., Chang, C., Pan, M., and Vandewalle, A. (2006) Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney International* 69:815-822.
50. Areal, V. (1962) The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *American Journal of Pathology* 40:393-423.
51. Sitprija, V., and Evans, H. (1970) The kidney in human leptospirosis. *American Journal of Medicine* 49:780-788.
52. Reis, E., Hagan, J., Ribeiro, G., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O., Montgomery, R., Shaw, A., Ko, A., and Reis, M. (2013) Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:e2457.
53. Johnson, R. *Leptospira*. Medical Microbiology. 4^a Edição. Gaveston, TX: University of Texas Medical Branch; 1996.
54. Edwards, C., Nicholson, G., and Everard, O. (1982) Thrombocytopenia in leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31:827-829.
55. Cumberland, P., Everar, C., Wheeler, J., and Levett, P. (2001) Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989. *European Journal Epidemiology* 17:601-608.
56. Romero, E., Caly, C., and Yasuda, P. (1998) The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40:183-184.
57. Siriwanij, T., Suttinont, C., Tantawichien, T., Chusil, S., Kanjanabuch, T., and Sitprija, V. (2005) Haemodynamics in leptospirosis: effects of plasmapheresis and continuous venovenous haemofiltration. *Nephrology* 10:1-6.
58. Jauréguiberry, S., Roussel, M., Brinchault-Rabin, G., Gacouin, A., Le Meur, A., Arvieux, C., Michelet, C., and Tattevin, P. (2005) Clinical presentation of leptospirosis: A retrospective study of 34 patients admitted to a single institution in metropolitan France. *Clinical Microbiology and Infection* 11:391-394.
59. Alston, J., and Broom, J. *Leptospirosis in man and animals*. Edinburgh: E. & S. Livingstone; 1958, 3-8.

60. Ramos-Morales, F., Ríaz-Rivera, R., Cintrón-Rivera, A., Rullán, J., Benenson, A., and Acosta-Matienzo, J. (1959) The pathogenesis of leptospiral jaundice. *Annals of Internal Medicine* 51: 861-878.
61. Mendoza, M., Tan, S., Torres, D., and Tupasi, T. (1979) Human leptospirosis: clinical and laboratory diagnosis. *Philippine Medical Association* 5:219-124.
62. Daher, E., Zanetta, D. and Abdulkader, R. (2004) Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. *Nephron Clinical Practice* 98:c8-c14.
63. Lecour, H., Miranda, M., Magro, C., Rocha, A., and Gonçalves, V. (1989) Human leptospirosis – a review of 50 cases. *Infection* 17:8-12.
64. Vanasco, N., Schmeling, M., Lottersberger, J., Costa, K., Ko, A., and Tarabla, H. (2008) Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Tropica* 107:255-258.
65. Gochenour, W., Smadel, J., Jackson, E., Evans, L., and Yager, R. (1952) Leptospiral etiology of Fort Bragg fever. *Public Health Reports* 67:811-813.
66. O'Brien, M., Vicent, J., Person, D., and Cook, B. (1998) Leptospirosis and pancreatitis: a report of ten cases. *Pediatric Infectious Disease Journal* 17:436-438.
67. Miyahara, S., Saito, M., Kanemaru, T., Villanueva, S., Gloriani, N., and Yoshida, S. (2014) Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of leptospira causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. *International Journal of Experimental Pathology* 95:271-281.
68. Silva, J., Dalston, M., Carvalho, J., Setúbal, S., Oliveira, J., and Pereira, M. (2002) Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* 35:395-399.
69. Gonçalves, A., de Carvalho, J., Guedes e Silva, J., Rozembaum, R., and Vieira, A. (1992) Hemoptysis and the adult respiratory distress syndrome as the causes of death in leptospirosis. Changes in the clinical and anatomicopathological patterns. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* 25:261-270.
70. Sitprija, V., Losuwanrak, K., and Kanjanabuch, T. (2003) Leptospiral nephropathy. *Seminars in Nephrology* 23:42-48.

71. Seguro, A., Lomar, A., and Rocha, A. (1990) Acute renal failure of leptospirosis: Nonoliguric and hypokalemic forms. *Nephron* 55:146-151.
72. Abdulkader, R., Seguro, A., Malheiro, P., Burdmann, E., and Marcondes, M. (1996) Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54:1-6.
73. Araújo, E., Seguro, A., Spichler, A., Magaldi, A., Volpini, R., and De Brito, T. (2010) Acute kidney injury in human leptospirosis: An immunohistochemical study with pathophysiological correlation. *Virchows Archiv* 456:367-375.
74. Niwattayakul, K., Homvijitkul, J., Niwattayakul, S., Khaw, O., and Sitprijia, V. (2002). Hypotension, renal failure, and pulmonary complications in leptospirosis. *Renal Failure* 24:297–305.
75. Abdulkader, R. (1997) Acute renal failure in leptospirosis. *Renal Failure* 19:191-198.
76. Daher, E., and Nogueira, C. (2000). Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42:327-332.
77. Raoult, D., Jeandel, P., Mailloux, M., and Rougier, Y. (1983) Thrombocytopenia and renal failure in leptospirosis. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 32:1464-1464.
78. Yang, C., Wu, M., and Pan, M. (2001) Leptospiral renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*; 16:73-77.
79. Yang, H., Hsu, P., Pan, M., Wu, M., Lee, C., Yu, C., Hung, C., and Yang, C. (2005). Clinical distinction and evaluation of leptospirosis in Taiwan- a case-control study. *Journal Nephrology* 18:45-53.
80. Weil, A. (1886) Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumo, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* 39:209-232.
81. Gouveia, E., Metcalfe, J., de Carvalho, A., Aires, T., Villasboas-Bisneto, J., Queiroz, A., Santos, A., Salgado, K., Reis, M., and Ko, A. (2008) Leptospirosis-associated severe pulmonar hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 14:505-508.

82. Marotto, O., Ko, A., Murta-Nascimento, C., Seguro, A., Prado, R., Barbosa, M., Cleto, S., and Eluf-Neto, J. (2010) Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *Journal of Infection* 60:218-223.
83. Sehgal, S., Murhekar, M., and Sugunan, A. (1995) Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north Andaman. *Indian Journal of Medical Research* 102:9-12.
84. Trevejo, R., Rigau-Pérez, J., Ashford, D., McClure, E., Jarquín-González, C., Amador, J., de los Reves, J., Gonzales, A., Zaki, S., Shieh, W., McLean, R., Nasci, R., Weyant, R., Bolin, C., Bragg, S., Perkins, B., and Spiegel, R. (1998) Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *Journal of Infectious Diseases* 178:1457-1463.
85. Centers for Disease Control and Prevention. (2020) Technical information for leptospirosis. https://cdc.gov/leptospirosis/health_care_workers/index.html. Consultado no dia 18 de março de 2020.
86. Spichler, A., Athanazaio, D., Seguro, A., and Vinetz, J. (2011) Outpatient follow-up of patients hospitalized for acute leptospirosis. *International Journal of Infectious Diseases* 15:e486–e490.
87. Goris, M., Kikken, V., Straetemans, M., Alba, S., Goeijenbier, M., van Gorp, E., Boer, K., Wagenaar, J., and Hartskeerl, R. (2013) Towards the burden of human leptospirosis: duration of acute illness and occurrence of post-leptospirosis symptoms of patients in the Netherlands. *PLoS One* 8: e76549.
88. Herath, N., Kularate, S., Weerakoon, K., Wazil, A., Subasinghe, N., and Ratnatunga, N. (2014) Long term outcome of acute kidney injury due to leptospirosis? A longitudinal study in Sri Lanka. *BMC Research Notes* 7:398-402.
89. Chu, K., Rathinam, R., Namperumalsamy, P., and Dean, D. (1998) Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India. *Journal of Infectious Diseases* 177:1314-1321.
90. Rathinam, S. (2005) Ocular manifestations of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medical* 51:189-194.

91. Katz, A., Ansdell, V., Effler, O., Middleton, C., and Sasaki, D. (2001) Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii. 1974-1998. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1834-1841.
92. Avdeeya, M., Moissova, D., Gorodin, V., Kostomarov, A., Zotov, S., and Cherniavskaia, O. (2002) The role glucose-6-phosphate dehydrogenase in pathogenesis of anemia in leptospirosis. *Klinicheskaia Meditsina* 80:42-44.
93. Wagenaar, J., Goris, M., Partiningrum, D., Isbandrio, B., Hartskeerl, R., Brandjes, D., Meijers, J., Gasem, M., and van Gorp, E. (2010) Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Tropical Medicine & International Health* 15:152-159.
94. Merien, F., Baranton G., and Perolat, P. (1995) Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases* 172:281-285.
95. Agampodi, S., Matthias, M., Moreno, A., and Vinetz, J. (2012) Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clinical Infectious Diseases* 54:1249-1255.
96. Brown, P., Gravekamp, C., Carrington, D., Kemp, H., Hartskeerl, R., Edwards, C., Everard, C., Terpstra, W., and Levett, P. (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 43:10-114.
97. Bal, A., Gravekamm, C., Hartskeerl, R., De Meza-Brewster, J., Korver, H., and Terpstra, W. (1994). Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1894-1898.
98. Blackmore, D., Schollum, K., and Moriarty, K. (1984) The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *New Zealand Medical Journal* 97:83-86.
99. Goris, M., Leeflang, M., Boer, K., Goeijenbier, M., van Gorp, E., Wagenaar, J., and Hartskeerl, R. (2011) Establishment of valid laboratory case definition for human leptospirosis. *Journal of Bacteriology and Parasitology* S5-001:1-8.
100. Signorini, M., Lottersberger, J., Tarabla, H., and Vanasco, N. (2013) Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: A meta-analysis of the published literature. *Epidemiology & Infection* 141:22-32.

101. Alexander, A., and Rule, P. (1986) Penicillins, cephalosporins, and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal leptospirosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30:835-839.
102. McClain, J., Ballou, W., Harrison, S., and Steinweg, D. (1984) Doxycycline therapy for leptospirosis. *Annals of Internal Medicine* 100:696-698.
103. Hospenthal, D., and Murray, C. (2003) In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2646-2648.
104. Ressler, R., Griffith, M., Beckius, M., Pimentel, G., Miller, R., Mende, K., Fraser, S., Galloway, R., Hospenthal, D., and Murray, C. (2008) Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of *Leptospira*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:2750-2754.
105. Andrade, L., Daher, E., and Seguro, A. (2008). Leptospiral nephropathy
106. Andrade, L., Cleto, S., and Seguro, A. (2007) Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2:739-744.
107. Watt, G., Padre, L., Tuazon, M., Calubaquib, C., Santiago, E., Ranoa, C., and Laughlin, L. (1988) Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet* 1:433-435.
108. Panaphut, T., Domrongkithaporn, S., Vibhagool, A., Thinkamrop, B., and Susanengrat, W. (2003) Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 36:1507-1513.
109. Pappas, G., and Cascio, A. (2006) Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28:491-496.
110. Emmanouilides, C., Kohn, O., and Garibaldi, R. (1994) Leptospirosis complicated by a Jarisch-Herxheimer reaction and adult respiratory distress syndrome: case report. *Clinical Infectious Diseases* 18:1004-1006.
111. Bryceson, A. (1976) Clinical pathology of the Jarisch-Herxheimer reaction. *Journal of Infectious Diseases* 133:696-704.

112. Vaughan, C, Cronin, C., Walsh, E., and Whelton, M., (1994) The Jarisch – Herxheimer reaction in leptospirosis. *Postgraduate Medical Journal* 70:118-121.
113. Warrell, D., Pope, H., Parry, E., Perine, P., and Bryceson, A. (1970) Cardiorespiratory disturbances associated with infective fever in man: studies of Ethiopian louse-borne relapsing fever. *Clinical Science* 39:123-145.
114. Mergenhagen, S., Hampp, E., and Scherp, H. (1961) Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *Journal of Infectious Diseases* 108:304-310.
115. Negussie, Y., Remick, D., DeForge, L., Kunkel, S., Eynon, A., and Griffin, G. (1992) Detection of plasma tumour necrosis factor, interleukins 6 and 8 during the Jarisch-Herxheimer reaction of relapsing fever. *Journal of Experimental Medicine* 175:1207-1212.
116. Friedlang, J., and Warrel, D. (1991) The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: Possible pathogenesis and review. *Reviews of Infectious Diseases* 13:207-210.
117. Heath, S., and Johnson, R. (1994) Leptospirosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 205:1518-1523.
118. Direção Geral de Saúde. (2007) Leptospirose Experiência de 2 anos (2005-2006). <https://dgs.pt/diversos/leptospirose-pdf.aspx>. Consultado no dia 21 de março de 2020.
119. Wani, H. (1933) Über die prophylaxes der pirochaetosis icterohaemorrhagica Inada (Weilschen Krankheit) durch Schutzimpfung. *Zeitschr Immunforsch Exp Therap* 79:1-26.
120. Martinez, R., Perez, A., Quinones, C., Cruz, R., Alvarez, A., Arnesto, M., Fernandez, C., Menendez, J., Rodriguez, I., Baro, M., Diz, M., Rodriguez, J., Sierra, G., Obregon, A., Toledo, M., and Fernandez, N. (2004) Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Revista Panamericana de Salud Pública* 15:249-255.
121. Mailloux, M., Lambert, R., and Chenu, M. (1983) Human vaccination against leptospirosis icterohaemorrhagiae. *Medicine and Hygiene (Geneve)* 41:1025-1030.

122. Gonsalez, C., Casseb, Monteiro, F., Paula-Neto, J., Fernandez, R., Silva, M., Camargo, E., Mairinque, J., and Tavares, L. (1988) Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40:59-61.
123. Sehgal, S., Sugunan, A., Murhekar, M., Sharma, S., and Vijayachari, P. (2000) Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13:249-255.